

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



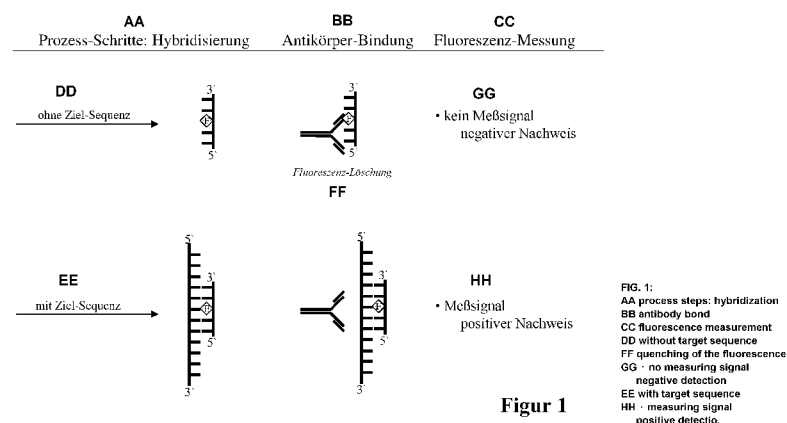
(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
9. Februar 2012 (09.02.2012)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2012/016936 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation:  
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/063174
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
31. Juli 2011 (31.07.2011)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
PCT/EP2010/061167 31. Juli 2010 (31.07.2010) EP  
10 2010 033 107.4  
2. August 2010 (02.08.2010) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **AJ INNUSCREEN GMBH** [DE/DE]; Robert-Roessle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE). **UNIVERSITÄT POTSDAM** [DE/DE]; Am neuen Palais 10, 14469 Potsdam (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SELLRIE, Frank** [DE/DE]; Reiherbergstrasse 15 B, 14476 Potsdam (DE). **HILLEBRAND, Timo** [DE/DE]; Bogenstrasse 29, 15366 Hoppegarten (DE).
- (74) Anwälte: **WEHLAN, Helmut** et al.; WEHLAN & WEHLAN, Moellendorffstrasse 49, 10367 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

- (54) Title: DETECTION OF SPECIFIC NUCLEIC ACID SEQUENCES BY MEANS OF FLUORESCENCE QUENCHING
- (54) Bezeichnung : NACHWEIS SPEZIFISCHER NUKLEINSÄURESEQUENZEN MITTELS FLUORESCENZ - QUENCHING



(57) Abstract: The invention relates to the detection of specific nucleic acid sequences by means of fluorescence quenching. The basic principle of the detection is the steric exclusion of an antibody bond as the result of a nucleic acid target hybridizing to a nucleic acid probe to form a double strand. Once hybridization has taken place, the fluorophore of the probe is no longer accessible to a fluorescence-quenching antibody. The fluorescence which can be measured in the system is coupled directly to the presence, in the test sample, of a DNA sequence which is complementary to the probe.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft den Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen mittels Fluoreszenzlöschung. Das Grundprinzip des Nachweises besteht im sterischen Ausschluss einer Antikörper-Bindung durch die Hybridisierung eines Nukleinsäuretargets mit einer Nukleinsäuresonde zum Doppelstrang. Das Fluorophor der Sonde ist nach erfolgter Hybridisierung für einen fluoreszenz-löschenden Antikörper nicht mehr zugänglich. Die im System messbare Fluoreszenz ist direkt an das Vorhandensein einer zur Sonde komplementären DNA-Sequenz in der Messprobe gekoppelt.



WO 2012/016936 A1



**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)

## NACHWEIS SPEZIFISCHER NUKLEINSÄURESEQUENZEN MITTELS FLUORESZENZ-QUENCHING

**Beschreibung**

5 **[0001]** Das vorgestellte Verfahren dient dem spezifischen Nachweis von Nukleinsäuresequenzen und damit der molekularen Diagnostik. Das Grundprinzip des Nachweises besteht im sterischen Ausschluss einer Antikörper-Bindung durch die Hybridisierung eines Nukleinsäuretargets mit einer Nukleinsäuresonde zum Doppelstrang. Das Fluorophor der Sonde ist nach erfolgter Hybridisierung für einen fluoreszenz-löschenden  
10 Antikörper nicht mehr zugänglich. Die im System messbare Fluoreszenz ist direkt an das Vorhandensein einer zur Sonde komplementären DNA-Sequenz in der Messprobe gekoppelt.

Stand der Forschung

15 **[0002]** Die Gendiagnostik ist zu einem unverzichtbaren Bestandteil der modernen medizinischen Labordiagnostik, der forensischen Diagnostik, der veterinärmedizinischen Labordiagnostik oder der Lebensmittel- und Umweltdiagnostik geworden.

**[0003]** Revolutioniert wurde die genetische Diagnostik mit der Erfindung der PCR-Technologie, die es gestattet, jede beliebige Nukleinsäuresequenz spezifisch zu vervielfachen.

20 **[0004]** Diese Technologie besitzt aber neben ihren eindeutigen Vorteilen (wie Sensitivität, Spezifität) auch ihre Nachteile. Für die Durchführung der Amplifizierung werden teurere Geräte benötigt, die den schnellen Temperaturwechsel gewährleisten können, die Ergebnisse der Amplifizierung bzw. mit der Amplifizierung gekoppelten Sondenhybridisierung müssen gleichfalls mittels teurerer und aufwendig zu bedienender Labortechnik ausgewertet werden.  
25 Hierbei ist eine „einfache“ Visualisierung mittels Gelelektrophorese manchmal wegen ihrer Ungenauigkeit unzureichend.

**[0005]** Eine weit verbreitete Methode zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuren ist z.B. die Light Cycler Technologie (Fa. Roche). Die Firma Roche entwickelte dazu spezielle Hybridisierungssonden bestehend aus zwei verschiedenen Oligonukleotiden, die jeweils mit  
30 nur einem Fluorochrom markiert sind. Am 3'-Ende der einen Sonde befindet sich der Akzeptor, das andere Oligonukleotid ist am 5'-Ende mit einem Donor versehen. Die Sonden werden so gewählt, dass sie beide an den gleichen DNA-Strang binden, wobei der Abstand zwischen Akzeptor und Donor nur maximal 1 bis 5 Nukleotide betragen darf, damit es zum

sog. FRET-Effekt kommen kann. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt während des Annealingschrittes, wobei nur Licht dieser Wellenlänge nachweisbar ist, solange beide Sonden an die DNA gebunden sind. Der Schmelzpunkt beider Sonden sollte bei diesem System identisch sein. Durch die Verwendung zweier hybridisierender Sonden zusätzlich zu den verwendeten Primern ist die Spezifität dieses Detektionssystems äußerst hoch.

**[0006]** Eine weitere Real Time PCR Anwendung zum Nachweis spezifischer Nukleinsäure-Targets kann mit sog. Double-Dye-Sonden, welche in der Patentschrift US 5210015 und US 5487972 offenbart sind (TaqMan-Sonden), durchgeführt werden. Double-Dye-Sonden tragen zwei Fluorochrome auf einer Sonde. Der Reporterfarbstoff befindet sich hier am 5'-Ende, der Quencherfarbstoff am 3'-Ende. Zusätzlich befindet sich am 3'-Ende der Sonde eventuell noch eine Phosphatgruppe, damit die Sonde bei der Elongation nicht als Primer fungieren kann. Solange die Sonde intakt ist, ist die freigesetzte Lichtstärke gering, da fast die gesamte Lichtenergie, die nach der Anregung des Reporters entsteht, aufgrund der räumlichen Nähe vom Quencher aufgenommen und umgeformt wird. Das emittierte Licht des Reporterfarbstoffes wird „gequenched“, d.h. gelöscht. Dieser FRET-Effekt bleibt auch erhalten, nachdem die Sonde an den komplementären DNA-Strang gebunden hat. Während der Elongationsphase trifft die Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert sie. Man bezeichnet die Fähigkeit der Polymerase, ein Oligonukleotid (bzw. eine Sonde) während der Strangsynthese zu hydrolysieren, als 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Nicht alle Polymerasen haben eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität (Taq- und Tth-Polymerase). Als erstes wurde dieses Prinzip für die Taq-Polymerase beschrieben. Das Prinzip wird als TaqMan-Prinzip bezeichnet. Nach Sondenhydrolyse befindet sich der Reporterfarbstoff nicht mehr in räumlicher Nähe zum Quencher. Die emittierte Fluoreszenz wird jetzt nicht mehr umgeformt, dieser Fluoreszenzanstieg wird gemessen.

**[0007]** Eine weitere Möglichkeit zum spezifischen Nachweis von Amplifikationsprodukten mittels Real-Time-PCR-Technologie besteht in der Nutzung von interkalierenden Farbstoffen (Ethidiumbromid, Hoechst 33258, Yo-Pro-1 oder SYBR Green™ u.ä.). Eine klare Differenzierung zwischen spezifischem Amplifikationsereignis bzw. Artefakt ist aber zwingend notwendig. Um dies dennoch zu erreichen, nutzt man eine sog. Schmelzpunktanalyse am Ende der eigentlichen PCR- Reaktion.

**[0008]** Mittels Real-Time-PCR-Anwendungen ist es darüber hinaus auch möglich, eine Quantifizierung der nachzuweisenden Targets durchzuführen.

[0009] Ein großer Nachteil besteht allerdings darin, dass sie auf sehr teuren Geräteplattformen implementiert sind, welche den Prozess sowohl der Amplifikation als auch nachfolgenden, der Fragestellung entsprechenden optischen Detektion in einer Hardware-Lösung vereinen müssen. Weiterhin basieren viele dieser beschriebenen Nachweisverfahren immer auf der Echtzeitverfolgung des Amplifikationsprozesses. Auf dieser Strategie basierend, erfolgt auch die Aufarbeitung der gemessenen Fluoreszenzwerte im Verlauf der Amplifikationsreaktion. Dem Fachmann ist klar, dass damit verbunden auch ein enorm hoher Grad an Analysealgorithmen in Real-Time-Systeme integriert sein muss. Dies erklärt letztlich den hohen finanziellen Aufwand, der für die Nutzung von Real-Time-PCR-Systemen betrieben werden muss. Letztlich ist auch die Bedienung solcher Gerätesysteme an ein hohes Maß an Expertise gebunden.

[0010] Neben den dargestellten Real-Time-PCR-basierten diagnostischen Nachweisen existieren aber auch alternative Varianten zum spezifischen Nachweis von Nukleinsäuren, z.B. PCR-ELISA. Bei dieser Methode wird die zu untersuchende DNA-Sequenz amplifiziert und das erzeugte DNA-Fragment nachfolgend an einer festen Phase (z.B. Mikrotiterplatte oder Streifen) kovalent immobilisiert, nachfolgend zu einem Einzelstrang denaturiert und mit einer sequenzspezifischen Sonde hybridisiert. Die erfolgreiche Anbindung der Sonde kann durch eine antikörpervermittelte Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Eine andere Variante basiert darauf, dass man die Sonden an eine feste Phase immobilisiert und nach erfolgter Denaturierung des PCR-Produktes dieses in Kontakt mit der immobilisierten Sonde bringt. Der Nachweis eines erfolgten Hybridisierungsereignisses erfolgt in Analogie zur ersten Verfahrensvariante.

[0011] Eine deutliche Reduktion von Arbeitsschritten wird in der Patentschrift KR 1020060099022 A (Method and kit for rapid and Accurate detection and analysis of nucleotide sequence with naked eye by using membrane lateral flow analysis) offenbart.

[0012] Hierbei wird ein Lateral-Flow-Verfahren genutzt, um Nukleinsäuren zu detektieren. Auch dieses Verfahren bedient sich der Technologie der Hybridisierung von Nukleinsäuren an einer festen Phase. Vorteilhaft ist, dass es sich bei einem Lateral-Flow-Verfahren um eine kleines handliches Testformat handelt (Streifentest).

[0013] Alle diese Verfahren nutzen eine enzymatische Vervielfältigungsreaktion und basieren nicht auf einer direkten Nachweisreaktion einer spezifischen Nukleinsäure. Dabei muss berücksichtigt werden, dass eine Amplifizierungsreaktion immer zeitaufwendig ist und im

Falle des Nachweises von RNA sogar zusätzlich noch die Umschreibung der RNA in die komplementäre DNA benötigt wird.

[0014] Daraus kann abgeleitet werden, dass bei einer Vielzahl von Anwendungen ein direkter Nachweis einer Zielnukleinsäure, also ein Nachweis ohne eine Amplifizierungsreaktion, deutlich schneller und einfacher sein könnte. Damit verbunden könnte der benötigte gerätetechnische Aufwand deutlich reduziert werden, ebenso wie die Reagenzienkosten sowie der Arbeitsaufwand. Das bekannte Problem von Kreuzkontaminationen während durchzuführender Amplifizierungsreaktionen würde nicht gegeben sein.

[0015] Insbesondere für Nachweisreaktionen, bei denen es nicht nur um den Nachweis weniger Kopien an nachzuweisenden Molekülen geht, könnten auch ohne Amplifizierungsreaktionen diagnostisch nachgewiesen werden (z.B. ribosomale RNA's, mitochondriale RNA's und DNA's, - Plasmidmoleküle, nichtkodierende repetitive Sequenzen usw.).

Das molekularbiologische Nachweise auch ohne Amplifikationsreaktionen erfolgreich eingesetzt werden können, wird in der Patentschrift (WO 2006125050 20061123) offenbart.

[0016] Diese Patentschrift beschreibt einen sensitiven DNA-Nachweis ohne eine Amplifikation in Form eines Bio-Barkode-Assays. Das dargestellte Verfahren ist aber sehr aufwendig und bedarf sowohl einer Vorrichtung zur Trennung der an das Zielmolekül gebundenen Nanopartikel von nicht an das Zielmolekül gebundenen Nanopartikeln und weiterhin ein Reading-Out-System zur Signalauswertung. Weitere Verfahren zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuren ohne Amplifizierungsreaktionen basieren auf klassischen Hybridisierungstechniken von an Membranen gebundenen Nukleinsäuren. Diese Verfahren sind zeit- und arbeitsaufwendig und können somit nicht für eine alternative Routinediagnostik eingesetzt werden (Dot Blots, Southern Blots, etc.). Dies betrifft auch die Anwendung von Biochip-Technologien. Auch hier ist der gerätetechnische Aufwand immens und diese Technologie nicht universell einsetzbar und oftmals auch nur für die Untersuchung von Genexpressionsmustern (Untersuchung von RNA) nicht aber für den diagnostischen Nachweis von z.B. pathogenen Mikroorganismen (auf der Basis von DNA) einsetzbar.

### **Aufgabe der Erfindung**

[0017] Die Aufgabe der Erfindung bestand darin, die Nachteile der oben beschriebenen Lösungen zu beseitigen.

## Lösung der Aufgabe

[0018] Die Aufgabe wurde gemäß den Merkmalen der Patentansprüche gelöst. Erfindungsgemäß wurde mit der vorliegenden Erfindung ein universell nutzbares Verfahren zum spezifischen Nachweis von Targetnukleinsäuren bereitgestellt, das sehr schnell durchführbar sowie einfach ist und darüber hinaus keine teuren Gerätesysteme benötigt. Das Verfahren eignet sich als molekulargenetischer Schnelltest und trägt den Vorgaben der diagnostischen Spezifitätssicherung Rechnung. Entscheidend dabei ist, dass die Unterscheidung zwischen einer gebundenen und einer ungebundenen Sonde ohne zusätzliche Wasch- und Separationsschritte stattfindet und damit das Problem der Patentschrift WO 2006125050 20061123 löst.

[0019] Überraschenderweise wird das Problem dadurch gelöst, dass man für die spezifische Nachweisreaktion einer Targetnukleinsäure in einem Reaktionsansatz eine Fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde (komplementär zur nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz) und einen den Fluorophor bindenden und dabei dessen Fluoreszenz löschenden Antikörper einsetzt. Das erfindungsgemäße Verfahren realisiert sich über den sterischen Ausschluss der Antikörperbindung durch die Hybridisierung von Probe und Sonde zu einem Doppelstrang. Der Fluorophor der Sonde ist nach erfolgter Hybridisierung für den Fluoreszenz-löschenden Antikörper nicht mehr zugänglich – im Ergebnis dieses Effektes bleibt die Fluoreszenz des Fluorophors erhalten. Im Gegensatz hierzu wird der Fluorophor einer nicht hybridisierten Sonde durch den Antikörper gebunden und dabei dessen Fluoreszenz gelöscht. Damit ist die im System messbare Fluoreszenz direkt an das Vorhandensein einer zur Sonde komplementären DNA-Sequenz in der Messprobe gekoppelt. Das beschriebene Verfahren gliedert sich in die folgenden Prozessschritte:

### A. Bereitstellung eines einzelsträngigen Target-Nukleinsäure-Moleküls :

[0020] Die zu testenden Nukleinsäuren liegen vollständig oder partiell als Einzelstrang-Nukleinsäure vor (z.B. diverse RNA- Moleküle, einzelsträngige Virusgenome, asymmetrisch amplifizierte DNA's, cDNA's etc.). Die Nukleinsäuremoleküle, die doppelsträngig vorliegen, müssen für die Sondenhybridisierung mittels laborüblichen Techniken (z.B. Erhitzung, denaturierende Substanzen etc.) in die Einzelstrang- Form überführt werden.

**B. Hybridisierung mit einer sequenzspezifischen Sonde, an welche mindestens ein Fluorophor gekoppelt ist:**

[0021] Die Targetnukleinsäure wird mit einer definierten Menge der fluorophorgekoppelten Sonde in Kontakt gebracht und bei einer für eine spezifische Hybridisierung berechneten Temperatur inkubiert.

**C. Nachweis des Hybridisierungsereignisses:**

[0022] Das Hybridisierungsereignis (und damit der Nachweis der gesuchten Zielnukleinsäure) wird mittels eines Antikörpers, welcher in der erfindungsgemäßen Ausführung gleichzeitig den Fluorophor bindet und dessen Fluoreszenz quencht, nachgewiesen. Das Fluorophor auf der mit der Targetsequenz hybridisierten Sonde ist für die Antikörperbindung sterisch verhindert und kann daher von dem Antikörper nicht gequencht werden. Die Bindung des Antikörpers an das Fluorophor ist durch die Hybridisierung von Targetsequenz und Sonde sterisch behindert und daher eine Löschung der Fluoreszenz ausgeschlossen.

[0023] Dieser Prozess kann mittels der Messung der Fluoreszenzintensität der Probe im Vergleich zu den Negativ- und Positiv- Kontrollen (Initialpunktmessung vs. Endpunktmessung) qualitativ und quantitativ ausgewertet werden. Auch die Nutzung eines im System mitgeführten Standards ist möglich.

[0024] Der Quencher kann nicht nur ein von sich aus quenchender Antikörper sein, sondern auch ein das Fluorophor bindender Antikörper, der durch Konjugation mit einem quenchemdem Molekül (z.B. BHQ 1) erst zu einem solchen gemacht wurde.

[0025] Es ist möglich, parallele multiplexe Messungen durchzuführen, d.h. zwei oder mehr mit unterschiedlichen Fluorophoren markierte Sonden werden parallel in einem Ansatz zum Nachweis der entsprechenden Templates eingesetzt.

[0026] Nicht nur Antikörper sind geeignet, sondern auch andere bindende Moleküle (rekombinante Antikörper, Aptamere, Intercaline).



[0027] Der sterische Ausschluss der Antikörper-Bindung (Fluoreszenz-Quenching) kann auch durch andere hybridisierende Moleküle außer DNA möglich sein (PNA, RNA vielleicht auch Proteine).

5 [0028] Das oben beschriebene Verfahren kann sowohl manuell als auch automatisiert durchgeführt werden.

[0029] Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens kann jeder Typ an Nukleinsäure nicht nur spezifisch detektiert, sondern auch quantifiziert werden. Mit dem erfindungsgemäßen  
10 Verfahren kann sowohl eine aus dem Probenmaterial isolierte Nukleinsäureprobe direkt bestimmt werden (also ohne Amplifikationsreaktion auf der Basis von PCR oder NASBA etc.), als auch ein initiativ amplifiziertes oder in einer anderer Weise in vitro verändertes (z.B. durch die cDNA- Synthese) generiertes Nukleinsäuremolekül.

[0030] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren steht ein extrem einfaches und universelles  
15 Nachweisverfahren für spezifische Nukleinsäuren zur Verfügung. Im Unterschied zu Real-Time-PCR-Verfahren erfolgt die Detektion des spezifischen Nachweissignals nicht mittels FRET-Effektes (EP 0972 848 A2), sondern durch eine Bindung des fluoreszenzquenchenden Antikörpers. Das erfindungsgemäße Verfahren unterscheidet sich auch von der Patentschrift (EP 0 826 066 B1), welche ebenfalls eine Kombination von PCR und Hybridisierung  
20 darstellt. Auch bei diesem Verfahren wird wiederum ein durch FRET-Effekt vermitteltes Fluoreszenzsignal detektiert. Dieses entsteht während des Amplifikationsvorganges durch die Hybridisierung einer Sonde, die eine niedrigere Annealingtemperatur hat, als die Primer. Die Freisetzung der Fluoreszenz erfolgt dabei nicht durch Hydrolyse der Sonde in Folge der Exonukleaseaktivität der Polymerase, sondern dadurch, dass bei der Hybridisierung die  
25 sekundäre Struktur der Sonde aufgelöst wird und die Fluoreszenz weniger gequenchet wird.

[0031] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist erstmals ein extrem einfaches, schnelles und universelles Verfahren zum spezifischen Nachweis und zur Quantifizierung von Nukleinsäuren verfügbar, welches gerätetechnisch lediglich einen Fluoreszenzreader benötigt.  
30 Damit stellt das erfindungsgemäße Verfahren ein Testformat dar, welches prinzipiell auch unter Feldbedingungen realisiert werden kann. Das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung spezifischer Nukleinsäuresequenzen erlaubt die Testdurchführung in nicht einmal einer Stunde. Das Verfahren eignet sich in hervorragender

Weise auch für den Nachweis von Zielnukleinsäuren ohne vorangegangene Amplifizierungsreaktion, also direkt für den Nachweis von Nukleinsäuren einer Probe.(DNA oder RNA).

- 5 **[0032]** Das erfindungsgemäße Verfahren zur quantitativen Bestimmung mindestens einer spezifischen Nukleinsäure- Sequenz (Zielsequenz) umfasst die Schritte
- Hybridisierung mit mindestens einer zu der Zielsequenz ganz oder partiell komplementären Sonde und
  - Nachweis der Hybridisierungsreaktion mittels eines Fluoreszenz- löschenden
  - 10 Antikörpers,
  - Auswertung des Hybridisierungs- Ereignisses mittels Fluoreszenz- Messung

**[0033]** Die Hybridisierung zum Doppelstrang verhindert sterisch die Bindung des Fluoreszenz löschenden Antikörpers. Infolge dieses Bindungsausschlusses bleibt die

15 Fluoreszenz der Sonde erhalten. Nicht hybridisierte Sonden werden durch den Binder (z.B. Antikörper) gebunden und dabei wird deren Fluoreszenz gelöscht.

**[0034]** Möglich ist die Durchführung einer Endpunkt-Fluoreszenz-Messung zum Nachweis und zur Konzentrationsbestimmung der spezifischen Nukleinsäure- Sequenz in der

20 Messprobe.

**[0035]** Die Nachweisreaktion erfolgt frei von Separation- Schritten in einem Ansatz. Die nachzuweisende Zielsequenz kann eine beliebige Nukleinsäure, insbesondere DNA oder RNA, sein. Es ist auch möglich, dass die Zielsequenz ein Amplifikationsprodukt ist.

**[0036]** Das erfindungsgemäße Verfahren funktioniert so gut, dass es überraschenderweise

25 möglich ist, auch eine Titration des nachzuweisenden DNA-Strangs (Template) durchzuführen. Damit ist der Nachweis von 0,1µM Template gut möglich.

**[0037]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist es möglich, Sonde und Antikörper gemeinsam als eine Lösung zum Template zu geben und dann zu hybridisieren. Das

30 Messprinzip wird dadurch noch einfacher.

**[0038]** Die Sonde ist eine zur Zielsequenz ganz oder teilweise komplementäre Nukleotid-Sequenz, die mindestens ein Fluorophor enthält. Das oder die Fluorophore können in Form

eines derivatisierten Nukleotids in der Sonde enthalten sein. Als Fluorophor jedes Fluorophor verwendet werden kann, insbesondere Fluoreszein und 5-TAMRA (5-Carboxy-teramethylrhodamin).

- 5 **[0039]** Die Erfindung soll nachfolgend anhand eines Beispiels näher erläutert werden, ohne sie auf dieses Beispiel zu reduzieren.

### **Ausführungsbeispiel**

10 Materialien:

1. Fluorophor-markierte Oligonukleotid-Sonde (im folgenden als Sonde bezeichnet)
2. Fluorophor-bindender und dessen Fluoreszenz löscher Antikörper (im folgenden als Antikörper bezeichnet)
- 15 3. Nachzuweisender zu Sonde komplementärer DNA-Einzelstrang (im folgenden als Template bezeichnet)

Durchführung:

- 20
1. Vereinen von Template und Sonde
  2. Hybridisierung zum Doppelstrang bei geeigneter Temperatur
  3. Zugabe des Antikörpers
  4. Fluoreszenz-Messung

25 **Erklärung zu den Figuren:**

**[0040]** Figur 1 zeigt die DNA- Analytik mittels Fluoreszenz-Löschung durch einen sequenzspezifisch bindenden monoklonalen Antikörper - schematische Darstellung des Testprinzips sowie der Prozessschritte .

30

**[0041]** In Figur 2 steigt die Fluoreszenz mit zunehmender Konzentration des Templates an. Nach Hybridisierung von Sonde und Template zum Doppelstrang ist das Fluorophor nicht länger für eine Bindung durch den Antikörper zugänglich – somit bleibt auch dessen

Fluoreszenz unverändert erhalten. Zu erkennen ist die Erhöhung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration der Zielsequenz (Oligonukleotid).

### Biotez(Lumiprobe)-TAMRA-Sonde - Verdünnungsreihe Template

Sonde Biotez 26445-21  
 Template metabion 00205B23-0147C01  
 Antikörper G71-DC7

5

Sonde 0,1 µM	Template µM	Antikörper 0,1 µM	Counts 592 nm			
			Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Mittelwert
+	-	-	55	27	36	39
+	-	-	8219	8480	7248	7982
+	-	+	325	297	247	290
+	0,267	+	8484	7534	8737	8252
+	0,133	+	7738	7149	6716	7201
+	0,067	+	5672	5431	4865	5323
+	0,033	+	2958	3012	2850	2940
+	0,017	+	1582	1636	1645	1621
+	0,008	+	947	786	1001	911
+	0,004	+	717	620	568	635

**[0042]** Figur 3 zeigt die Erhöhung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration der PCR-Probe(PCR-Probe mit Zielsequenz aus nativer DNA (schwarz) – PCR-Probe ohne Zielsequenz (weiß)).

10

**[0043]** Figur 4 (A bis C) zeigt den reproduzierbaren Effekt des Verfahrens

Ansatz: 75 µl Sonde  
 + 75 µl Template  
 150 µl

15

Ablauf: 1.) Sonde + Template                      Messung: Ex. 541 nm  
 2.) Hybridisierung 40°C 20 min                      Em. 550 – 650 nm  
 3.) Zugabe Antikörper

Materialien:

Sonde	Biotez 26445-21	0,1 µM (Endkonz.)
Template	meabion 00205B23-0147C01	0,2 µM (Endkonz.)
Antikörper	5-TAMRA Quencher G71-DC7 OD: 1,060	+ 1µl
	5-TAMRA Binder G71-BE11 OD: 0,956	+ 1µl

- 5 **[0044]** Erfolgt in Abwesenheit des Templates eine Bindung der Fluorophor-markierten Sonde durch den Antikörper, so wird die Fluoreszenz des Fluorophors gelöscht.

**[0045]** Es existieren Fluoreszenz-löschende Antikörper für:

- 10 a) Fluorescein (*F. Sellrie, A. Warsinke, B. Micheel (2006) Homogeneous indirect fluorescence quenching immunoassay for the determination of low molecular weight substances. Anal Bioanal Chem. 386(2):206-10.*)
- b) Europium-Kryptat (EuTBP)
- 15 *F. Sellrie, M. Beck, N. Hildebrandt, B. Micheel (2010) A homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) using antibody mediated luminescence quenching. Analytical Methods, 2 : 1298-1301.*
- c) Terbium-Chelat
- 20 d) 5- TAMRA (5-Carboxy-tetramethylrhodamin)

## Definitionen

### 25 Sonde

**[0046]** Unter dem Begriff "Sonde" wird im Sinne der Erfindung verstanden: Ein Oligonukleotid, welches ganz oder partiell zu einer Targetnukleinsäure komplementär ist und mit mindestens einem Fluorophor versehen ist.

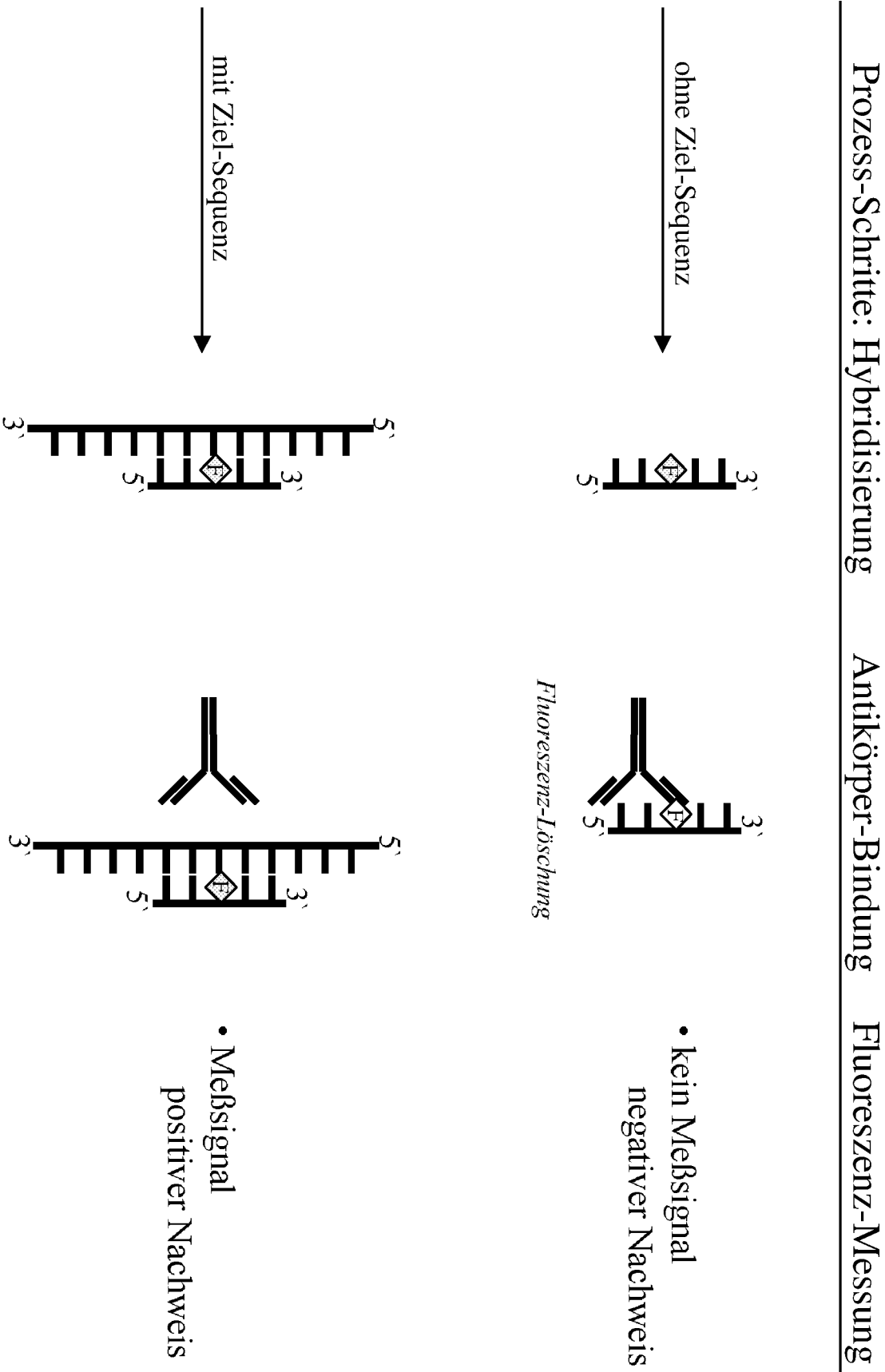
**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Bestimmung mindestens einer spezifischen Nukleinsäure-Sequenz (Zielsequenz) mit den Schritten:
  - 5 a) Hybridisierung der einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure mit mindestens einer Sonde, die mit mindestens einem Fluorophor markiert ist
  - b) gleichzeitige oder nachfolgende Zugabe eines den Fluorophor bindenden und dessen Fluoreszenz löschenden Bindungsmoleküls
  - c) Nachweis des Hybridisierungs-Ereignisses durch Messung der Fluoreszenz,  
10 wobei nicht-hybridisierte Sonde durch das Bindungsmolekül (Binder) gebunden und dabei dessen Fluoreszenz gelöscht wird und hybridisierte Sonde aufgrund der Hybridisierung und der damit verbundenen sterischen Hinderung nicht durch den Binder gebunden wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sich bei dem  
15 Bindungsmolekül um einen Antikörper handelt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sowohl zur qualitativen als auch zur quantitativen Bestimmung der Ziel-Nukleinsäure dient.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonde zu der spezifischen Nukleinsäure-Sequenz (Zielsequenz) ganz oder partiell komplementär ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der  
25 Nachweis der spezifischen Nukleinsäure-Sequenz und die Konzentrationsbestimmung der spezifischen Nukleinsäure-Sequenz in der Messprobe durch Endpunkt-Fluoreszenz-Messung erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der  
30 Nachweis der spezifischen Nukleinsäure-Sequenz und die Konzentrationsbestimmung der spezifischen Nukleinsäure-Sequenz in der Messprobe durch Titration erfolgt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der zu bestimmenden spezifischen Nukleinsäure-Sequenz um RNA, einzelsträngige

Virusgenome, asymmetrisch amplifizierte DNA's, cDNA's oder doppelsträngig vorliegende Nukleinsäuremoleküle, die in die Einzelstrang- Form überführt wurden, handelt.

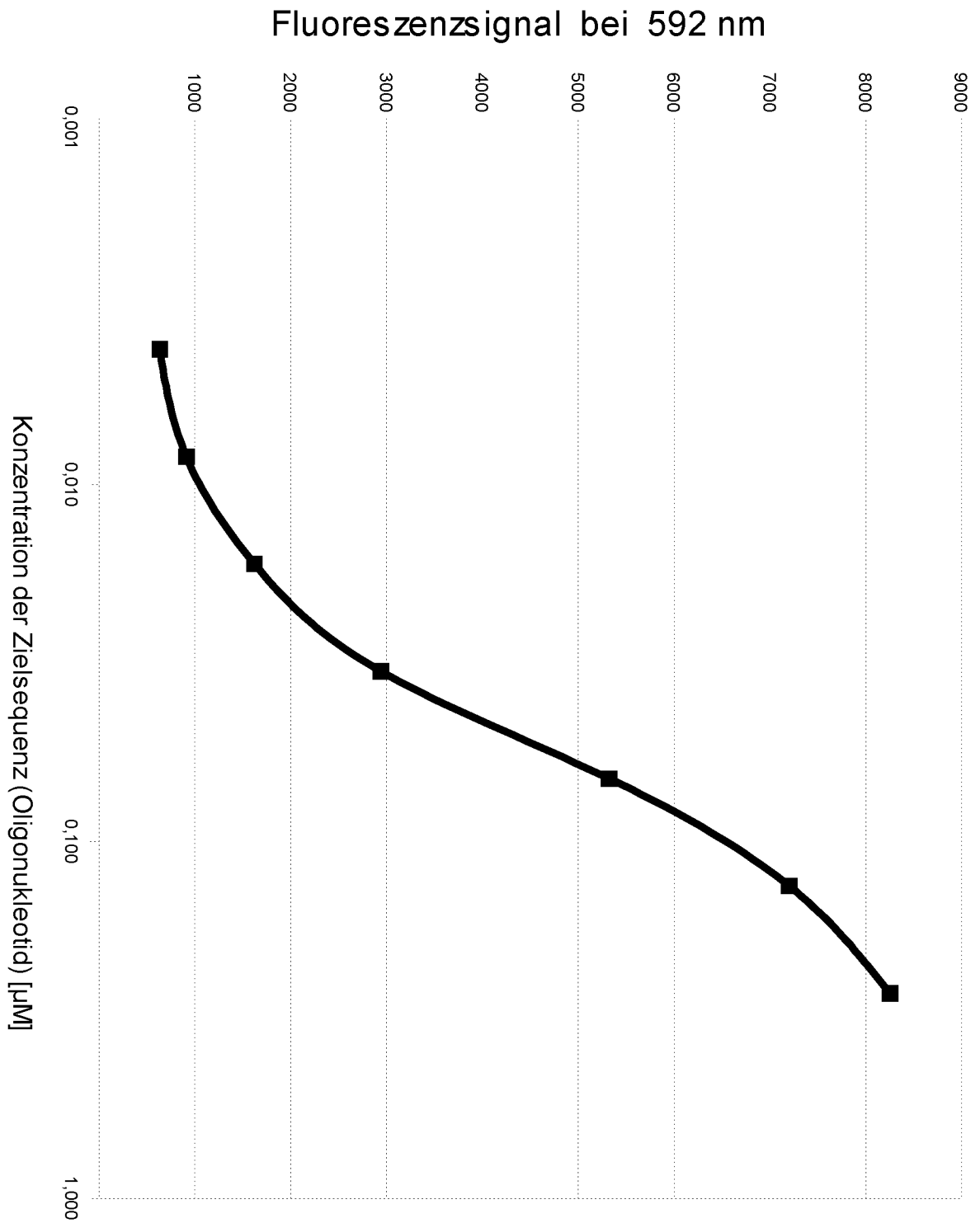
- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Zielsequenz ein Amplifikationsprodukt ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das oder die Fluorophore in Form eines derivatisierten Nukleotids in der Sonde enthalten sind.
- 10 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Fluorophor Fluoreszein oder 5-TAMRA (5-Carboxy-teramethylrhodamin) verwendet wird.
- 15 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Binder ein monoklonaler Antikörper ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Messung der Fluoreszenz mittels eines Fluoreszenz-Readers erfolgt.
- 20 13. Testkit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorangegangenen Ansprüche, umfassend:
- a) mindestens eine Sonde, die mit mindestens einem Fluorophor markiert ist
  - b) einen den Fluorophor bindenden und dessen Fluoreszenz löschenden Antikörper
  - 25 c) ein Gerät zur Messung der Fluoreszenz.
14. Automat zur automatisierten Durchführung des Testkits nach Anspruch 13 zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12.

# Figur 1

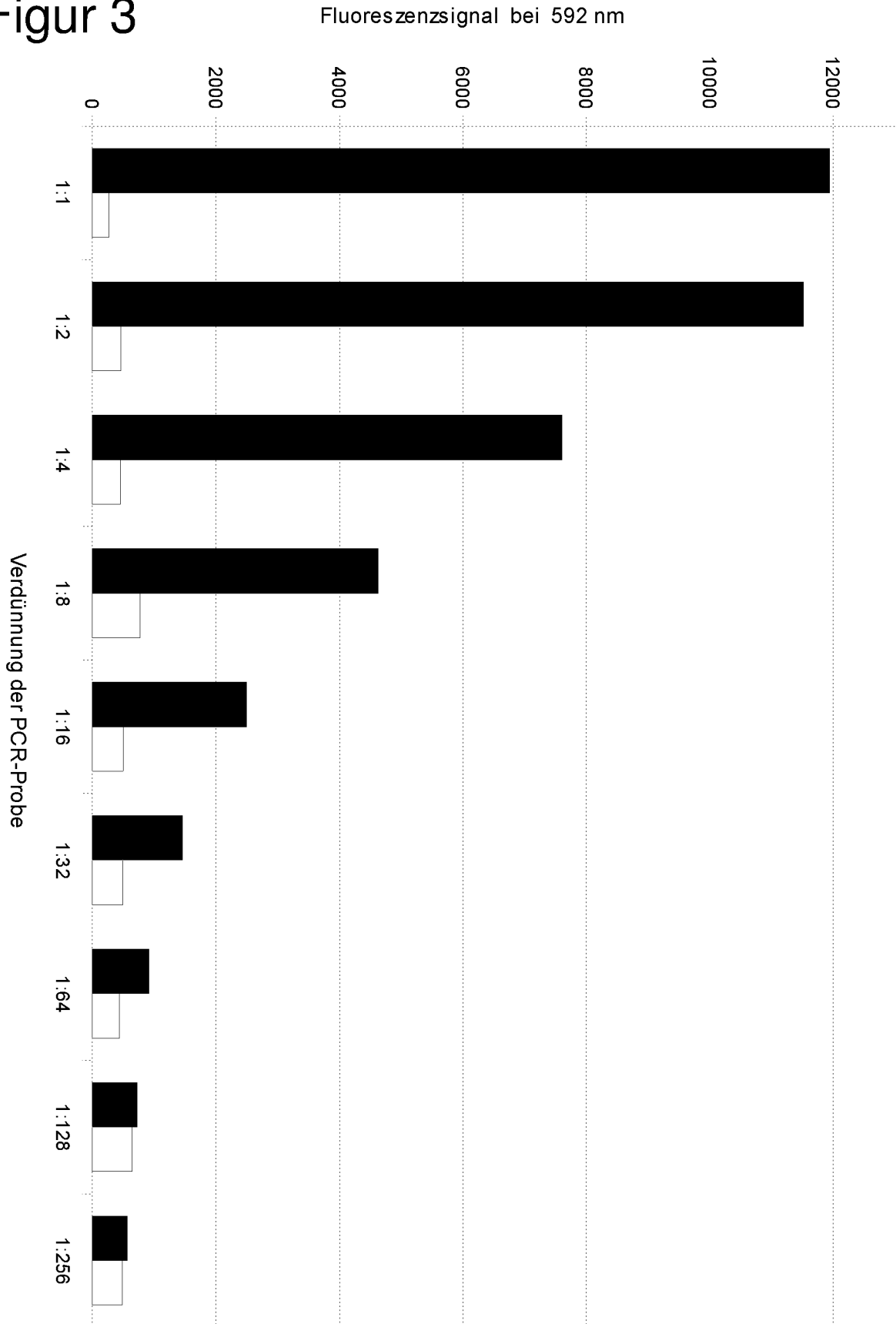




# Figur 2



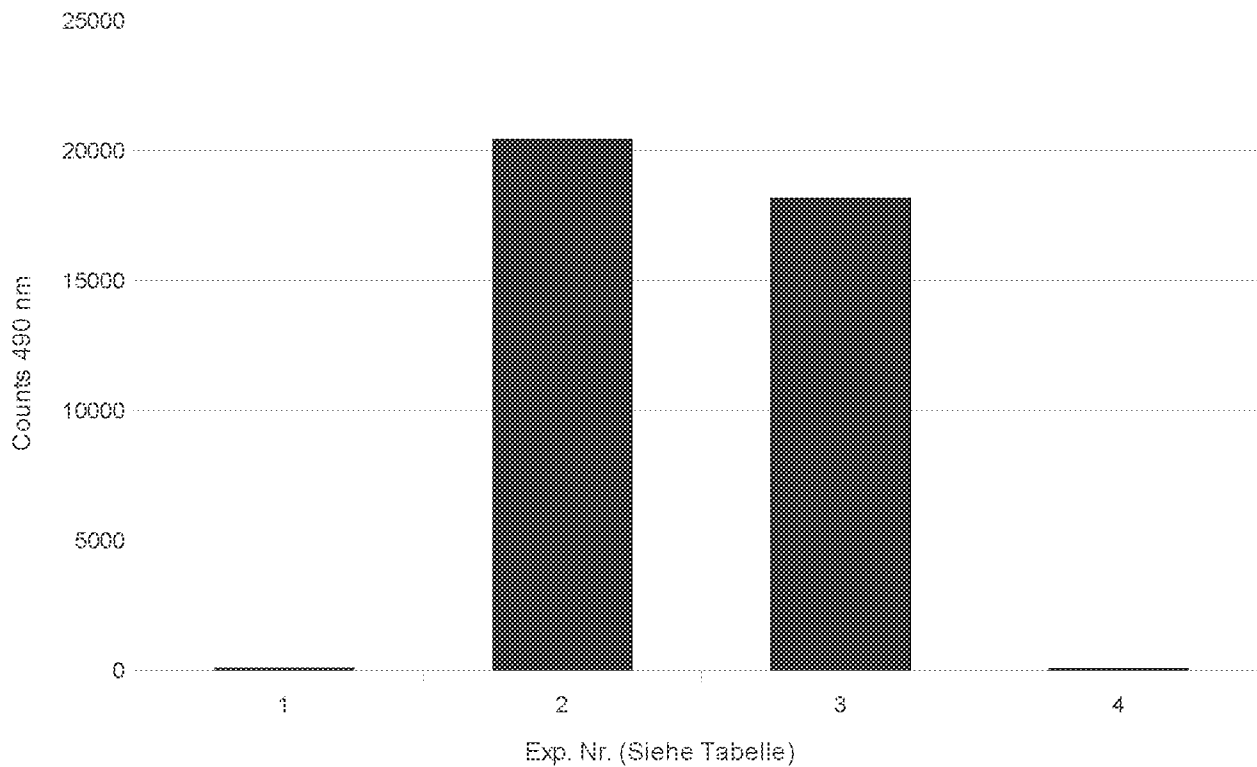
# Figur 3



## Figur 4A

**Wdh. Biotex-Sonde (Lumiprobe 5-Tamra-Derivat)****ohne Anikörper**

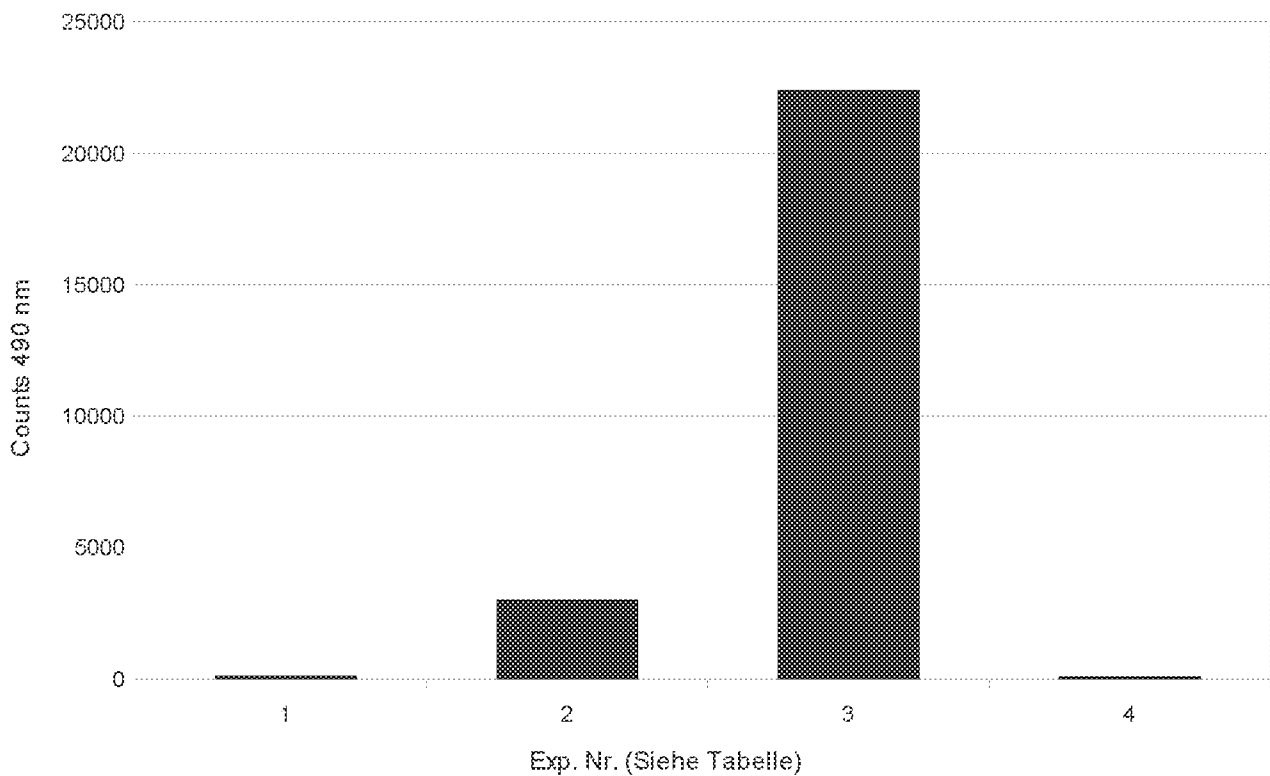
Exp. Nr. I	1	2	3	4
Sonde	-	+	+	-
Template	-	-	+	+
Antikörper	-	-	-	-
Counts 590 nm	<b>76,75</b>	<b>20420</b>	<b>18150</b>	<b>53,82</b>



# Figur 4B

**mit Antikörper** *5-TAMRA-Binder und Quencher G71-DC7*

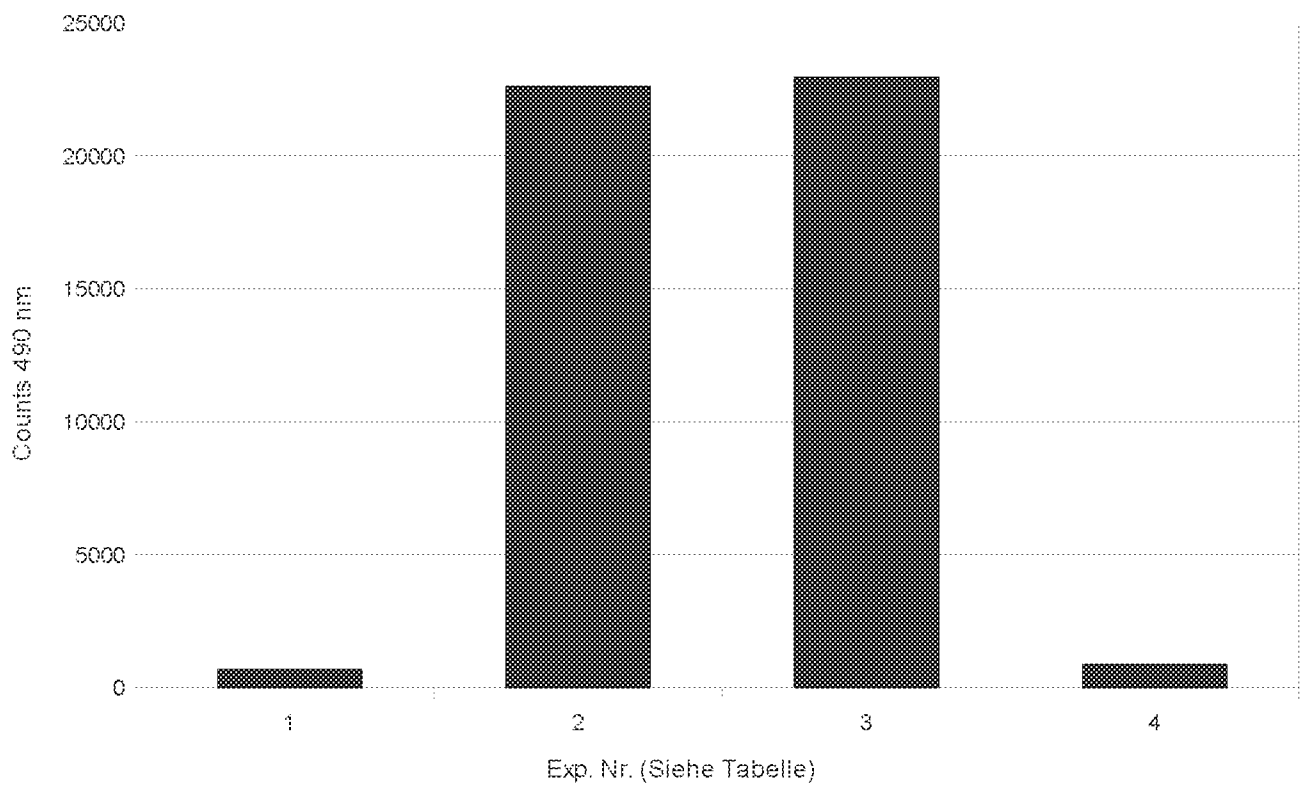
Exp. Nr. II	1	2	3	4
Sonde	-	+	+	-
Template	-	-	+	+
Antikörper	+	+	+	+
Counts 590 nm	<b>98,49</b>	<b>2989</b>	<b>22390</b>	<b>57,07</b>



# Figur 4C

## mit Antikörper 5-TAMRA-Binder G71-BE11

Exp. Nr. III	9	10	11	12
Sonde	-	+	+	-
Template	-	-	+	+
Antikörper	+	+	+	+
Counts 590 nm	698,1	22610	22950	875,2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/063174
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12Q1/68 ADD.				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	EP 0 763 601 A2 (BEHRINGWERKE AG [DE] DADE BEHRING MARBURG GMBH [DE]) 19 March 1997 (1997-03-19) page 2, line 30 - page 3, line 39; figure 4; example 4	1-14		
X	EP 0 144 913 A2 (MILES LAB [US]) 19 June 1985 (1985-06-19) abstract page 6, line 14 - page 7, line 7 page 20, line 5 - line 18 page 22, line 29 - page 23, line 4 page 33, line 24 - line 33; figure 2 page 26, line 1 - line 31 page 36, line 22 - page 37, line 17 page 41 - page 42; example II ----- -/--	1-14		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.</td> <td style="width: 50%; border: none;"><input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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	Date of mailing of the international search report			
2 December 2011	08/12/2011			
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Werner, Andreas			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/063174

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 200 313 A (CARRICO ROBERT J [US]) 6 April 1993 (1993-04-06) the whole document -----	1-14
A	US 5 279 937 A (ROWE GERALD E [CA]) 18 January 1994 (1994-01-18) the whole document -----	1-14
A	EP 0 492 570 A1 (ENZO DIAGNOSTICS INC [US]) 1 July 1992 (1992-07-01) abstract page 5, line 53 - line 55 -----	1-14
A	DIRKS R W ET AL: "3'-End fluorochromized and hapttenized oligonucleotides as in situ hybridization probes for multiple, simultaneous RNA detection", EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, ACADEMIC PRESS, US, vol. 194, no. 2, 1 June 1991 (1991-06-01), pages 310-315, XP024789807, ISSN: 0014-4827, DOI: 10.1016/0014-4827(91)90370-A [retrieved on 1991-06-01] the whole document -----	1-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2011/063174
---

Patent document cited in search report	Publication date	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0763601	A2	19-03-1997	AT 382709 T	15-01-2008
			AU 6560096 A	20-03-1997
			CA 2185516 A1	15-03-1997
			DE 19534122 A1	20-03-1997
			EP 0763601 A2	19-03-1997
			ES 2297834 T3	01-05-2008
			JP 4286334 B2	24-06-2009
			JP 9220100 A	26-08-1997
			US 5858668 A	12-01-1999
EP 0144913	A2	19-06-1985	DK 591684 A	13-06-1985
			EP 0144913 A2	19-06-1985
			ES 8607559 A1	01-11-1986
			FI 844869 A	13-06-1985
US 5200313	A	06-04-1993	NONE	
US 5279937	A	18-01-1994	NONE	
EP 0492570	A1	01-07-1992	DE 69132765 D1	15-11-2001
			DE 69132765 T2	21-02-2002
			EP 0492570 A1	01-07-1992
			US 5989809 A	23-11-1999



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/063174

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 INV. C12Q1/68  
 ADD.

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

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherhierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 C12Q

Recherhierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherhierten Gebiete fallen

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 763 601 A2 (BEHRINGWERKE AG [DE] DADE BEHRING MARBURG GMBH [DE]) 19. März 1997 (1997-03-19) Seite 2, Zeile 30 - Seite 3, Zeile 39; Abbildung 4; Beispiel 4 -----	1-14
X	EP 0 144 913 A2 (MILES LAB [US]) 19. Juni 1985 (1985-06-19) Zusammenfassung Seite 6, Zeile 14 - Seite 7, Zeile 7 Seite 20, Zeile 5 - Zeile 18 Seite 22, Zeile 29 - Seite 23, Zeile 4 Seite 33, Zeile 24 - Zeile 33; Abbildung 2 Seite 26, Zeile 1 - Zeile 31 Seite 36, Zeile 22 - Seite 37, Zeile 17 Seite 41 - Seite 42; Beispiel II ----- -/--	1-14



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" älteres Dokument, 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 anderen 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

2. Dezember 2011

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08/12/2011

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

Werner, Andreas

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2011/063174

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 200 313 A (CARRICO ROBERT J [US]) 6. April 1993 (1993-04-06) das ganze Dokument -----	1-14
A	US 5 279 937 A (ROWE GERALD E [CA]) 18. Januar 1994 (1994-01-18) das ganze Dokument -----	1-14
A	EP 0 492 570 A1 (ENZO DIAGNOSTICS INC [US]) 1. Juli 1992 (1992-07-01) Zusammenfassung Seite 5, Zeile 53 - Zeile 55 -----	1-14
A	DIRKS R W ET AL: "3'-End fluorochromized and haptенized oligonucleotides as in situ hybridization probes for multiple, simultaneous RNA detection", EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, ACADEMIC PRESS, US, Bd. 194, Nr. 2, 1. Juni 1991 (1991-06-01), Seiten 310-315, XP024789807, ISSN: 0014-4827, DOI: 10.1016/0014-4827(91)90370-A [gefunden am 1991-06-01] das ganze Dokument -----	1-14

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/063174

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0763601	A2	19-03-1997	AT 382709 T 15-01-2008
			AU 6560096 A 20-03-1997
			CA 2185516 A1 15-03-1997
			DE 19534122 A1 20-03-1997
			EP 0763601 A2 19-03-1997
			ES 2297834 T3 01-05-2008
			JP 4286334 B2 24-06-2009
			JP 9220100 A 26-08-1997
			US 5858668 A 12-01-1999
			-----
EP 0144913	A2	19-06-1985	DK 591684 A 13-06-1985
			EP 0144913 A2 19-06-1985
			ES 8607559 A1 01-11-1986
			FI 844869 A 13-06-1985
-----			
US 5200313	A	06-04-1993	KEINE
-----			
US 5279937	A	18-01-1994	KEINE
-----			
EP 0492570	A1	01-07-1992	DE 69132765 D1 15-11-2001
			DE 69132765 T2 21-02-2002
			EP 0492570 A1 01-07-1992
			US 5989809 A 23-11-1999
-----			