

(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  
30. Dezember 2021 (30.12.2021)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2021/259406 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:  
G01N 33/543 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2021/000084

(22) Internationales Anmeldedatum:  
07. Mai 2021 (07.05.2021)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2020 003 794.1  
25. Juni 2020 (25.06.2020) DE

(71) Anmelder: **FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH** [DE/DE]; 52425 Jülich (DE).

(72) **Erfinder: BANNACH, Oliver**; Elsa-Brandström-Str. 34, 40595 Düsseldorf (DE). **KULAWIK, Andreas**; Peter-Rossegger-Str. 31, 40699 Erkrath (DE). **ZAFIU, Christian**; Wassergasse 31/3, 1030 Wien (DE). **WILLBOLD, Dieter**; Theodor-Heuss-Str. 179, 52428 Jülich (DE). **Bujnicki, Thi Tuyen**; Nordstr. 13, 52428 Jülich (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, 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,

(54) **Title:** METHOD, USE OF THE METHOD AND KIT FOR DETECTING BIOINDICATORS IN A SAMPLE

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN, VERWENDUNG DES VERFAHRENS SOWIE KIT ZUM NACHWEIS VON BIOINDIKATOREN IN EINER PROBE

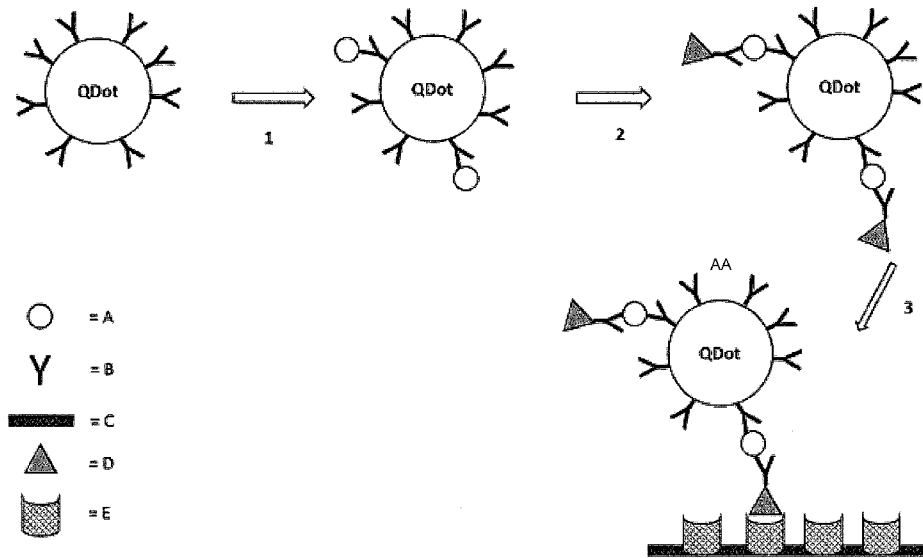


Fig. 3

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for detecting bioindicators in a sample, said method comprising the following steps: a) applying the sample containing bioindicators to a substrate; b) adding probes which are suitable for the detection and which mark the bioindicators by specifically binding thereto; and c) detecting the bioindicators by measuring a specific probe signal, wherein step b) can be carried out prior to step a). The invention also relates to the use of the method for detecting a disease or for checking the effectiveness of active substances and/or therapeutic methods and to a kit for detecting bioindicators in a sample.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis Bioindikatoren in einer Probe, umfassend folgende Schritte: a) Aufbringen der Probe enthaltend Bioindikatoren auf ein Substrat, b) Hinzufügen von für den Nachweis geeigneten Sonden,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 2021/259406 A1

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

**Erklärungen gemäß Regel 4.17:**

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

---

die durch spezifische Bindung an die Bioindikatoren diese markieren und c) Nachweis der Bioindikatoren durch Messen eines spezifischen Signals der Sonde, wobei Schritt b) vor Schritt a) durchgeführt werden kann. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung des Verfahrens zum Nachweis einer Erkrankung oder der Überprüfung der Wirksamkeit von Wirkstoffen und/oder Heilverfahren sowie ein Kit zum Nachweis von Bioindikatoren in einer Probe.

## B e s c h r e i b u n g

Verfahren, Verwendung des Verfahrens sowie Kit zum Nachweis von Bioindikatoren  
in einer Probe

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren sowie ein Kit zum Nachweis von Bioindikatoren in einer Probe, sowie die Verwendung des Verfahrens zum Nachweis einer  
5 Erkrankung oder der Überprüfung der Wirksamkeit von Wirkstoffen und/oder Heilverfahren.

### Stand der Technik

Gegenwärtig werden Bioindikatoren wie beispielsweise Proteine, Viren, Hormone, Toxine oder Pestizide standardmäßig mit ELISA-ähnlichen Verfahren nachgewiesen.  
10 Ist eine besonders niedrige Konzentration des Bioindikators gegeben, kann das sogenannte SIMOA-Verfahren eingesetzt werden.

### ELISA-Verfahren:

Mit Hilfe des ELISA können Proteine (z. B. Antikörper) und Viren, aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin etc.) nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft  
15 spezifischer Antikörper zunutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. Ein Antikörper wird zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Reporterenzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das sog. Substrat wird vom Enzym umgesetzt, das Reaktionsprodukt kann üblicherweise  
20 durch Farbumschlag, eventuell auch durch Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist eine mit einem Photometer sehr genau bestimmbare Funktion der Antigenkonzentration, so dass ELISA für Mehrfachmessungen ausgeführt und auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann. Als Reporterenzyme werden meistens die Meerrettichperoxidase (HRP, von engl. horseradish peroxidase), die Alkalische Phosphatase (AP) oder seltener auch die Glucose-Oxidase  
25 (GOD) verwendet. Im Falle der Alkalischen Phosphatase wird als Farbstoffsubstrat (synonym: Chromogen) z. B. p-Nitrophenylphosphat (pNPP) zugegeben, während bei der Peroxidase meistens o-Phenylendiamin (oPD) verwendet wird. Die alkalische Phosphatase spaltet den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat ab und

es entsteht p-Nitrophenol, welches schwach gelb ist. Die Konzentrationsänderung des durch die enzymatische Reaktion entstandenen Farbstoffs kann nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz mit einem Photometer verfolgt werden. Die Intensität der Farbe steigt dabei mit der Konzentration des entstandenen Nitrophenols und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe im Vergleich mit einer Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen (Standardreihe).

SIMOA-Verfahren:

Der SIMOA Analyzer kombiniert die Einzelmolekülanalyse mit digitaler ELISA-Anzeige. Analyte werden in Lösung von antikörperbeladenen Kügelchen anstelle von Target-Antikörper-Interaktion an einer Antikörper-immobilisierten Festphase eingefangen. Perlen - mit Target beladen oder nicht - werden in Mikrokavitäten mit Femtolitergröße eingefangen und liefern ein digitales Signal (ein / aus) zur Analyse.

Der entscheidende Nachteil der Verfahren nach dem Stand der Technik liegt darin begründet, dass zum einen große Probenmengen benötigt werden, um eine Detektion durchführen zu können. Zum anderen verfügen die Verfahren nur über einen geringen dynamischen Messbereich. Die bisher bekannten Verfahren können nur eine maximale Sensitivität im picomolaren Bereich erzielen. SIMOA hat weiterhin den Nachteil, dass spezielle Reagenzien (Beads) zum Nachweis erforderlich sind und technisch aufwendige Apparaturen benötigt werden. Weiterhin ist mit SIMOA nur ein indirekter Nachweis des Analyten durch enzymatische Sekundärreaktionen möglich, wodurch viele Einflussgrößen zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen können.

#### Aufgabe der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein alternatives Verfahren zum Nachweis für Bioindikatoren bereit zu stellen, mit dem insbesondere die Nachteile des Stands der Technik überwunden werden können.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Kit zur Durchführung des alternativen Verfahrens zum Nachweis für Bioindikatoren bereit zu stellen. Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf die Verwendung des Verfahrens zum Nachweis einer Erkrankung oder der Überprüfung der Wirksamkeit von Wirkstoffen und/oder Heilverfahren.

### Lösung der Aufgabe

Die Aufgabe wird gelöst mit dem Verfahren des Hauptanspruchs, dem Kit nach dem Nebenanspruch sowie der Verwendung des Verfahrens gemäß Nebenansprüchen. Vorteilhaft ausgestaltungen hierzu ergeben sich jeweils aus den hierauf rückbezo-

5 genen Patentansprüchen.

### Beschreibung der Erfindung

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung von Bioindikatoren, umfassend folgende Schritte:

- 10 a) Immobilisieren von Fängermolekülen für die Bioindikatoren auf einem Substrat,
- b) In-Kontaktbringen der Bioindikatoren einer Probe mit den Fängermolekülen,
- c) Immobilisieren der Bioindikatoren auf dem Substrat durch Bindung an Fängermoleküle,
- d) In-Kontaktbringen der Bioindikatoren mit Sonden, die mindestens ein
- 15 Detektionsmolekül enthalten, und
- e) Entfernen von nicht spezifisch gebundenen Molekülen und Partikeln z. B. durch Waschen,
- f) Binden der Sonden an die Bioindikatoren,

wobei die Sonden in der Lage sind, ein spezifisches Detektionssignal zu emittieren

20 und die Schritte b) und d) gleichzeitig oder d) vor b) erfolgen können und wobei Sonden und Fängermoleküle eingesetzt werden, die affine Moleküle oder Molekülteile aufweisen, die an wenigstens eine spezifische Bindungsstelle der Bioindikatoren binden und diese affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden und Fänger nicht untereinander überlappen.

25

Auch die Schritte c) und f) können vorteilhaft gleichzeitig durchgeführt werden.

In der weiteren Variante des Verfahrens, in welchem die Bioindikatoren mit den Sonden in Kontakt gebracht werden, bevor diese mit den Fängermolekülen in Kontakt gebracht werden, kann eine Immobilisierung von mit Sonden markierten Bioindikatoren auf dem Substrat erfolgen.

30

Mithin können die Sonden an die Bioindikatoren gebunden werden, bevor die Bioindikatoren mit den Fänger-molekülen in Kontakt gebracht werden und an das Substrat immobilisiert werden.

Damit ist die Aufgabe der Erfindung gelöst.

5 Im Rahmen der Erfindung werden unter der Bezeichnung Bioindikator zum einen Substanzen und Moleküle verstanden, deren Konzentration abhängig ist vom Zustand eines Organismus. Die Über- oder Unterschreitung eines Konzentrationsgrenzwertes des Bioindikators erlaubt dabei Rückschlüsse auf eine Zustandsänderung des Organismus (z.B.: Erkrankung, Heilung). Zu den Substanzen und Molekülen können  
10 beispielhaft Zellen, Gene, Genprodukte, Proteine, Hormone, DNA, RNA oder auch Enzyme genannt werden. Zum anderen wird unter der Bezeichnung Bioindikator auch eine Substanz oder ein Molekül verstanden, das in Grenzwert-überschreitenden-Konzentrationen den Zustand eines Organismus verändern kann. Hierzu können beispielhaft Hormone genannt werden.

15 Eine weitere Klasse von Bioindikatoren, die den Zustand eines Organismus beschreiben sind Metaboliten. Diese sind bereits von körpereigenen Enzymen veränderte Proteine oder kleine organischen Moleküle. Die Veränderung am Metabolit kann direkte Rückschlüsse auf bestimmte Erkrankungen erlauben.

In einer Ausgestaltung der Erfindung ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet,  
20 dass vor Schritt a) eine Immobilisierung von Fänger-molekülen für die Bioindikatoren auf dem Substrat erfolgt.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung und des erfindungsgemäßen Verfahrens können durch In-Kontaktbringen der Bioindikatoren mit Fänger-molekülen diese auf dem Substrat durch Bindung an die Fänger-moleküle immobilisiert werden.

25 In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung und des erfindungsgemäßen Verfahrens können nach dem In-Kontaktbringen der Bioindikatoren mit den Sonden nicht spezifisch gebundene Moleküle und Partikel beispielsweise durch Waschen entfernt werden.

Es können vorteilhaft Sonden gewählt werden, welche an die Bioindikatoren binden, wobei die Sonden, z. B. auch erst nach der Bindung, in der Lage sein können, ein spezifisches Detektionssignal zu emittieren.

5 Das In-Kontaktbringen der Bioindikatoren mit den Fänger-molekülen und den Sonden kann gleichzeitig erfolgen.

Das In-Kontaktbringen der Bioindikatoren mit den Sonden kann auch vor dem In-Kontaktbringen mit den Fänger-molekülen erfolgen.

10 Eine Aufgabe der Erfindung ist es weiterhin, die Bioindikatoren vorzugsweise in ihrer monomeren Ausgestaltung nachzuweisen. Die Sonden und/oder Fänger-moleküle weisen affine Moleküle oder Molekülteile auf, welche spezifische Bindungsstellen der Bioindikatoren erkennen und an diese binden. Um die Bioindikatoren in ihrer monomeren Ausgestaltung nachweisen zu können, sollten diese affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden und Fänger-moleküle an unterschiedliche, spezifische Bindungsstellen der Bioindikatoren binden, so dass die Sonden und Fänger eine gerichtete spezifische Bindung an die Bioindikatoren aufbauen. Dazu sollten diese jeweiligen spezifischen affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden und Fänger vorzugsweise nicht überlappen. Die Bindungsstelle der Bioindikatoren für die Sonden und die Fänger sollte sich daher in ihrer Peptidsequenz um wenigstens 5 Aminosäuren unterscheiden.

20 Mit dem vorliegenden Verfahren gelingt der Nachweis der Bioindikatoren in beliebigen Proben und in einem geringen Konzentrationsbereich dieser Bioindikatoren in einer Probe, vorzugsweise in einem Bereich, der im femtomolaren oder sogar auch im sub-femtomolaren Bereich liegen kann. Es kann mithin auch ein Einzelnachweis erfolgen, ohne die Probe aufwändig reinigen zu müssen.

25 Außerdem kann das Verfahren vorteilhaft einen qualitativen Nachweis von Bioindikatoren und/oder auch eine Quantifizierung und Charakterisierung in beliebigen Proben ermöglichen. Dadurch wird einerseits eine direkte und absolute Quantifizierung der Anzahl an Bioindikatoren und andererseits eine Charakterisierung der Größenverteilung von Bioindikatoren vorteilhaft gewährleistet.

Mit dem Verfahren kann weiterhin auch ein semi-quantitativer Nachweis von Bioindikatoren erfolgen, wenn die Konzentration des Bioindikators im Vergleich zum Referenzzustand unterhalb oder oberhalb eines vorher jeweils bestimmten Grenzwerts liegt.

5 Der Nachweis der Bioindikatoren erfolgt mit einfachen Schritten unmittelbar an beliebigen Proben. Mit dem Begriff „beliebiger Probe“ sind auch Puffer mit unterschiedlichen Zusätzen oder Kulturmedien gemeint. Außerdem kann die Probe ex vivo aus Körperflüssigkeiten entnommen sein bzw. eine solche sein. Es können Proben aus der Umwelt, wie z. B. Wasser-, Pflanzen- und Bodenproben, sowie Lebensmittel direkt untersucht werden und die Bioindikatoren nachgewiesen werden.

10 In einer weiteren Variante des Verfahrens kann auch eine direkte Immobilisierung der Bioindikatoren ohne Fänger-moleküle auf dem Substrat erfolgen. In dieser Verfahrensvariante sollte die Probe mit den Bioindikatoren zunächst vorbehandelt werden, so dass der zu untersuchende Biomarker, beispielsweise durch eine Immunpräzipitation, aus der Probe abgetrennt wurde und homogen vorliegt.

15 In einer anderen möglichen Variante des Verfahrens, wird die Probe mit den Bioindikatoren nach dem In-Kontaktbringen der Bioindikatoren mit den Sonden chemisch fixiert, z. B. durch Formaldehyd.

20 Optional kann die Probe nach oder während oder vor dem Binden der Sonden an die Bioindikatoren zusätzlich mit DNA und RNA bindenden Sonden versetzt werden.

In einer Ausgestaltung der Erfindung kann nach der chemischen Fixierung ein Detergenz eingesetzt werden, um gegebenenfalls die Membran eines Bioindikators durchlässig zu machen und dadurch beispielsweise während des Bindens der Sonden an die Bioindikatoren, Sonden ins Innere der Bioindikatoren vordringen zu lassen.

25 Im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet die „quantitative Bestimmung“ zunächst die Bestimmung der Konzentration der Bioindikatoren, mithin also auch die Bestimmung ihrer An- und oder -Abwesenheit.

30 Bevorzugt bedeutet die quantitative Bestimmung auch die selektive Quantifizierung bestimmter Typen von Bioindikatoren. Eine solche Quantifizierung kann über die entsprechenden spezifischen Sonden nachgewiesen werden.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet die „qualitative Bestimmung“ die Charakterisierung der Bioindikatoren.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass jeweils die affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden und/oder Fängermoleküle an  
5 wenigstens zwei, oder mehr, spezifische Bindungsstellen der Bioindikatoren binden, wobei auch hier wieder diese jeweiligen spezifischen affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden und Fänger vorzugsweise nicht überlappen.

In einer weiter möglichen Ausgestaltung des Verfahrens können diese jeweiligen affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden und/oder Fängermoleküle an wenigstens  
10 zwei, oder mehr, spezifische Bindungsstellen der Bioindikatoren binden, wobei diese jeweiligen affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden und/oder Fängermoleküle dabei zum einen an wenigstens zwei oder mehr identische oder unterschiedliche Bindungsstellen eines Bioindikators derselben Sorte binden können und/oder zum anderen an wenigstens zwei, oder mehr, unterschiedliche Bindungsstellen von wenigstens  
15 zwei unterschiedlichen Bioindikatoren binden können.

Dies hat zum einen die vorteilhafte Wirkung, dass, insbesondere bei wenigstens zwei oder mehr identischen Bindungsstellen an einen Bioindikator, die Spezifität und Stabilität der Bindung der Fänger und/oder Sonden an den Bioindikator erhöht wird.

Bei der möglichen Ausgestaltung von wenigstens zwei oder mehr unterschiedlichen  
20 Bindungsstellen, die an wenigstens zwei unterschiedliche Bioindikatoren binden, besteht die vorteilhafte Wirkung insbesondere darin, dass beispielsweise auch zwei unterschiedliche Bioindikatoren gleichzeitig in einem Verfahrensschritt oder Messprozess nachgewiesen werden können. Dieser besondere Nachweis wird im Folgenden auch als „Multiplex“-Nachweis bezeichnet. Die Auswertung der Signale im Multiplex-  
25 Nachweis für die beiden unterschiedlichen Bioindikatoren kann dann beispielsweise über zwei separate Auswertekanäle für die Sonden signale, insbesondere unterschiedliche Fluoreszenz-Kanäle, erfolgen. Es ist jedoch auch möglich die beiden Bioindikatoren mit Hilfe eines gemeinsamen Auswertesignals nachzuweisen, wenn für  
30 beide Bioindikatoren ein Summenwert als Auswertergebnis gewünscht oder ausreichend ist. Dies kann beispielsweise dann von Interesse sein, wenn zwei Bioindikatoren nachgewiesen werden sollen, die zu einer gemeinsamen Kategorie gehören, wie

beispielsweise zu einem Krankheitsbild, bei dem diese Bioindikatoren gemeinsam auftreten.

Die Bioindikatoren können mit einer oder mehreren für die Detektion dienlichen und/oder spezifischen Sonden markiert werden. Dabei können in einer Ausführung  
5 des Verfahrens beispielsweise Sonden eingesetzt werden, die wenigstens eine spezifische Ausgestaltung eines affinen Moleküls oder Molekülteils umfassen, welche dann wenigstens eine Sorte einer spezifischen Bindungsstelle eines Bioindikators erkennen und daran binden können, wobei diese affinen Moleküle oder Molekülteile wie schon zuvor erläutert nicht mit den affinen Molekülen oder Molekülteilen der Fänger  
10 überlappen sollten.

In einer anderen Ausführung des Verfahrens können Sonden eingesetzt werden, die wenigstens zwei oder mehr gleiche oder unterschiedliche Ausgestaltungen affiner Moleküle oder Molekülteile umfassen, welche wenigstens zwei unterschiedliche oder gleiche Bindungsstellen eines Bioindikators einer Sorte erkennen und daran binden  
15 können.

Die affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden, welche jeweils eine spezifische Bindungsstelle des Bioindikators erkennen und daran binden, können beispielsweise monoklonale Antikörper, Fab-Fragmente, Aptamere, Farbstoffe oder ein Konstrukt aus mehreren dieser sein.

Die affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden, welche jeweils wenigstens zwei unterschiedliche Ausgestaltungen eines affinen Moleküls oder Molekülteils umfassen, welche wenigstens zwei Bindungsstellen eines Bioindikators oder zweier unterschiedlicher Bioindikatoren erkennen und daran binden, können beispielsweise bispezifische Antikörper oder Aptamere sein.

In der folgenden Tabelle 1 werden beispielhaft, jedoch nicht darauf beschränkt, einige mögliche Bioindikatoren mit Bindungsstellen für Sonden und/oder Fängern aufgelistet. Diese Bioindikatoren weisen als Bindungsstellen beispielsweise unterschiedliche Epitope auf. In der Tabelle sind weiterhin beispielhaft einige affine Moleküle oder Molekülteile, insbesondere Antikörper, aufgeführt, die an die Bindungsstellen der  
25 Bioindikatoren, insbesondere Epitope binden können. Die aufgeführten Daten sowie  
30

auch Daten zu hier nicht aufgeführten Bioindikatoren mit ihren jeweiligen Bindungsstellen sind dem Fachmann aus der Literatur oder Produktinformationen von Herstellern von beispielsweise Antikörpern bekannt.

Tabelle 1:

Bioindikator	Epitop 1*	Epitop 2*	Beispiel 1 Antikörper <sup>(1)</sup>	Beispiel 2 Antikörper <sup>(1)</sup>	Quelle/ Verweis Antikörper 1	Quelle/ Verweis Antikörper 2
Alpha-Synuclein	103-108	124-134	4B12	4D6	1)	1a)
ANG-2	38-41	21-40	26-2F	ab8452	2)	
A $\beta$ 40	1-10	C-Terminus	6E10	#9682	3)	3a)
A $\beta$ 42	1-10	C-Terminus	6E10	D3E10	4)	4a)
IL-2	1-30	116 - 122	19B11/beta	basiliximab	5)	5a)
P-Tau 181	210-230	enthaltend P 181	Tau-5	AT270	6)	6a)
P-Tau 231	210-230	Enthaltend P 231	Tau-5	AT180	7)	7a)
Tau	210-230	N-Terminus	Tau-5	Tau 13 (B11E8)	8)	8a)
TDP-43	D 247	203 - 209		6H6E12 (60019-2-Ig)	9)	9a)
TNF $\alpha$	33-44	81-88	10F10	3B10	10)	10a)

5 \*: Aminosäuren Nummer basierend auf der jeweiligen Aminosäuresequenz des Bioindicators

Quellen/ Verweise zur Tabelle 1:

1) <https://www.biolegend.com/en-us/products/purified-anti-alpha-synuclein--103-108-antibody-11222>

10 1a) <https://www.biolegend.com/en-us/products/purified-anti-alpha-synuclein-antibody-11220>

2) [https://absoluteantibody.com/product/anti-angiogenin-26-2f/Ab00400-1.4\\_Mouse\\_IgG1/](https://absoluteantibody.com/product/anti-angiogenin-26-2f/Ab00400-1.4_Mouse_IgG1/);  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7514035/>

- 3) <https://www.biolegend.com/en-us/products/purified-anti-beta-amyloid-1-16-antibody-11228>
- 3a) <https://www.biolegend.com/en-us/products/purified-anti-beta-amyloid--1-40-antibody-11230>
- 4) <https://www.biolegend.com/en-us/products/purified-anti-beta-amyloid-1-16-antibody-11228>
- 4a) <https://www.biolegend.com/en-us/products/purified-anti-beta-amyloid--1-42-antibody-11231>
- 5) <https://europepmc.org/article/med/8544854>
- 5a) <https://absoluteantibody.com/product/anti-il-2r-alpha-cd25-basiliximab/>; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17440057/>
- 6) <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Tau-Antibody-clone-TAU-5-Monoclonal/AHB0042>; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17499212/>
- 10) 6a) <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Phospho-Tau-Thr181-Antibody-clone-AT270-Monoclonal/MN1050>; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7519852/>
- 7) <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Tau-Antibody-clone-TAU-5-Monoclonal/AHB0042>
- 15) 7a) <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Phospho-Tau-Thr231-Antibody-clone-AT180-Monoclonal/MN1040>; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21871442/>
- 8) <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Tau-Antibody-clone-TAU-5-Monoclonal/AHB0042>
- 8a) <https://www.biovision.com/tau-13-antibody-clone-b11e8.html>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4983528/>
- 20) 9) <https://www.nature.com/articles/s41598-018-24463-3>
- 9a) <https://www.ptglab.com/Products/TARDBP-Antibody-60019-2-Ig.htm>; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22133678/>; <https://www.scbt.com/p/tardbp-antibody-h-8>
- 10) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7590909/>
- 10a) [https://www.novusbio.com/products/cd30-tnfrsf8-antibody-3b10\\_nbp2-22206](https://www.novusbio.com/products/cd30-tnfrsf8-antibody-3b10_nbp2-22206)
- 25) Im Folgenden werden beispielhaft weitere, jedoch nicht darauf beschränkt, mögliche Bioindikatoren aufgelistet, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nachgewiesen

werden können. Die Bindungsstellen der Bioindikatoren und die jeweils dazu geeigneten affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden und/oder Fänger, können durch dem Fachmann bekannte Verfahren ermittelt und hergestellt werden.

Bioindikatoren:

Angiogenesis Factor Panel 1 (ANG-2, FGFb, HB-EGF, HGF, PIGF, VEGF, VEGF-C, PDGFBB), BDNF, Biomarker Panel 1 (ICAM-1, MPO, NGAL, RANTES/CCL5, TIMP-1, VCAM-1), c-MET, C-Peptide, CA 19-9, CA-125, Cathepsin S, CCL-11/ Eotaxin Assay Kit, CEA, Chemokine Panel (IP-10, ITAC, MCP-1, MIP-3b), Chemokine Panel 1 (Ratte) (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, MIP-3 $\alpha$ ), CorPlex™ Cytokine Panel (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-22, TNF  $\alpha$ ), CRP, CXCL13, Cytokine 3-Plex A TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 (C3PA), Cytokine 3-Plex B TNF $\alpha$ , IL-6, IL-17A (C3PB), Cytokine Panel 1 (Maus) (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, TNF- $\alpha$ ), Cytokine Panel 1 (nicht menschlicher Primat) (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), Cytokine Panel 1 (Ratte) (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, KC, TNF- $\alpha$ ), FGFb, G-CSF, GFAP, GM-CSF, GM-CSF (Maus), HB-EGF, HE4/ WFDC2, HGF, HIV p24, ICAM-1, IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  (Maus), IFN- $\gamma$  (Nicht menschlicher Primat), IFN- $\gamma$  (Ratte), IFN $\alpha$ , IL-10, IL-10 (Maus), IL-10 (Ratte), IL-12 p70, IL-12 p70 (Maus), IL-12p40/IL-23, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17A (Maus), IL-17A/F (Maus), IL-17C, IL-17F (Maus), IL-18, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  (Maus), IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$  (Maus), IL-1 $\beta$  (Nicht menschlicher Primat), IL-1 $\beta$  (Ratte), IL-2 (Maus), IL-2 (Ratte), IL-22 (Maus), IL-22 (Total), IL-23, IL-23 (Maus), IL-28A, IL-3, IL-33, IL-36 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-6 (Maus), IL-6 (nicht menschlicher Primat), IL-6 (Ratte), IL-7, IL-8, IL-8 (nicht menschlicher Primat), IP-10, ITAC, KC (Ratte), Leptin, LIF, MCP-1, MCP-1 (Ratte), MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2 (Ratte), MIP-3a (Ratte), MIP-3 $\beta$ , MMP Panel (MMP-3, MMP-9), MMP-3, MMP-9, MPO, Neuro 4-Plex B, Neurology 2-Plex A (Tau, A $\beta$ 42), Neurology 3-Plex A (Tau, A $\beta$ 42, A $\beta$ 40), Neurology 4-Plex A (NF-light®, Tau, GFAP\*, UCHL-1\*), NF-light®, NF-light® Advantage Kit (SR-X), NGAL, NSE, NT-proBNP, PD-1, PD-L1, Platelet-derived growth factor BB, PIGF, pNF-Heavy, PSA, RANTES/CCL5, Tau (Maus), TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , TIMP-1, TNF $\alpha$  (Maus), TNF $\alpha$  (nicht menschlicher Primat), TNF $\alpha$  (Ratte), TNF $\beta$ , TRAIL, Troponin-I, UCH-L1, VCAM-1, VEGF, VEGF-C.

Durch die vorteilhafte Ausgestaltung der Sonden mit wenigstens zwei, beispielsweise identischen Bindungsstellen für den einen Bioindikator, kann eine stärkere und spezifischere Bindung der Sonden an den Bioindikator erreicht werden, welches dann beispielsweise eine höhere Stabilität der Bindung gegenüber einer Bindung mit nur einer Bindungsstelle am Bioindikator hervorruft, so dass beispielsweise eine anschließende stärkere Waschung möglich wird, sowie auch eine höhere Spezifität des Nachweises des Bioindikators, da nunmehr gleich wenigstens zwei Bindungsstellen den Bioindikator erkennen und an ihn binden müssen. Sonden mit wenigstens zwei unterschiedlichen Bindungsstellen für den einen Bioindikator sind jedoch ebenfalls geeignet.

In einer weiteren möglichen Ausgestaltung des Verfahrens wird ein Fänger eingesetzt, der wenigstens zwei, vorzugsweise identische, spezifische Bindungsstellen für den Bioindikator aufweist. Wie schon zuvor bei der Sonde mit wenigstens zwei identischen Bindungsstelle beschrieben, führt diese mehrspezifische Bindung des Fängers an den Bioindikator zu einer stabileren und spezifischeren Bindung. Für das Verfahren können dann beispielsweise weitere Verfahrensschritte vorgenommen werden, die unter weniger schonenden Bedingungen für die gebundenen Moleküle durchgeführt werden können. Weiterhin wird auch hier die Nachweisspezifität erhöht. Fänger mit wenigstens zwei unterschiedlichen Bindungsstellen für den einen Bioindikator sind jedoch ebenfalls geeignet.

In einer anderen Ausgestaltung des Verfahrens können sowohl als Sonden als auch als Fänger, Moleküle eingesetzt werden, die über jeweils wenigstens zwei, vorzugsweise unterschiedliche, spezifische Bindungsstellen an den Bioindikator binden.

Durch diese Ausgestaltung kann eine weitere Erhöhung der Bindungsstabilität und Spezifität von Fänger und Sonde gegenüber einer einfachen Bindung der Fänger und Sonden oder auch gegenüber einer bispezifischen Bindung von Sonden oder Fängern mit identischer Bindungsstelle an die Bioindikatoren erreicht werden.

In einer weiter möglichen Ausgestaltung des Verfahrens weist die eingesetzte Sonde wenigstens zwei unterschiedliche spezifische Bindungsstellen auf, die wenigstens zwei unterschiedlichen Bioindikatoren zugeordnet werden können bzw. an wenigstens zwei unterschiedliche Bioindikatoren binden können. Mit Hilfe dieser Sonde können so, in einem Verfahrensschritt, wenigstens zwei unterschiedliche Bioindikatoren

gleichzeitig nachgewiesen werden. Die beiden unterschiedlichen Bioindikatoren werden dabei nicht separat voneinander nachgewiesen, sondern als Summenwert beider Bioindikatoren. Dies ist beispielsweise dann von Interesse, wenn zwei Bioindikatoren, die zum selben Krankheitsbild gehören, nachgewiesen werden sollen. In Kombination zu diesen Sonden, mit den wenigstens zwei unterschiedlichen spezifischen Bindungsstellen, für die wenigstens zwei unterschiedlichen Bioindikatoren, müssen dann vorzugsweise Fänger-moleküle eingesetzt werden, welche jeweils wenigstens zwei unterschiedliche affine Moleküle oder Molekülteile für zwei unterschiedliche Bioindikatoren aufweisen, welche jeweils dann an die wenigstens zwei unterschiedlichen Bioindikatoren binden können. Dadurch können auf dem Substrat mit einem Fänger-molekül wenigstens zwei unterschiedliche Bioindikatoren gleichzeitig auf dem Substrat immobilisiert werden und mit den jeweiligen Sonden, die jeweils spezifisch, mit beispielsweise einer spezifischen Bindungsstelle an jeweils einen der Bioindikatoren binden, markiert und in einem Verfahrensschritt nachgewiesen werden.

Alternativ zu den Fängern, die gleichzeitig zwei unterschiedliche Bioindikatoren binden können, können auch zwei unterschiedliche Fänger eingesetzt werden, die dann jeweils spezifisch die unterschiedlichen Bioindikatoren binden können.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens weisen sowohl die Sonden als auch die eingesetzten Fänger wenigstens zwei unterschiedliche Bindungsstellen auf, die an wenigstens zwei unterschiedliche Bioindikatoren binden können. Gegenüber der Ausgestaltung, bei der entweder die Sonden oder die Fänger wenigstens zwei unterschiedliche Bindungsstellen für wenigstens zwei unterschiedliche Bioindikatoren aufweisen, kann durch diese Ausgestaltung die Spezifität des Nachweises der Bioindikatoren noch weiter erhöht werden.

Der Nachweis von wenigstens zwei unterschiedlichen Bioindikatoren in einem Verfahrensschritt mit Sonden und/oder Fänger-molekülen, die wenigstens zwei unterschiedliche Bindungsstellen aufweisen, die an wenigstens zwei unterschiedliche Bioindikatoren binden, wird wie schon zuvor erläutert, als Multiplex-Nachweis bezeichnet.

Die Sonden können vorteilhaft darüber hinaus mindestens ein Detektionsmolekül oder ein Molekülteil enthalten, welches an das für die Bioindikatoren affine Molekül oder Molekülteil kovalent gebunden ist und vorzugsweise mittels Fluoreszenzmessung

detektierbar und messbar ist. Diese Detektionsmoleküle, auch als direkte oder indirekte Reporter-moleküle bezeichnet, können beispielsweise Fluorochrome, Quantumdots, oder fluoreszierende Proteine umfassen. Das direkte Reporter-molekül ist direkt an das spezifisch bindende affine Molekül oder Molekülteil der Sonde gebunden. Indirekte Reporter-moleküle weisen eine hohe Affinität für eine Bindungsstelle eines bekannten Moleküls auf, welches seinerseits mit einem oder mehreren Fluorochromen ausgestattet ist. Der dabei entstehende Komplex kann als Sonde eingesetzt werden. Ein Beispiel für eine Sonde mit einem indirekten Reporter-molekül kann Biotin gebunden an einen Antikörper-Streptavidin Molekül konjugiert mit Fluorochrom sein. Die Gruppe der indirekten Reporter-moleküle kann beispielsweise Biotin-Streptavidin, komplementäre DNA Stränge, DNA und DNA bindende Proteine umfassen.

Die Sonden können in einer Ausgestaltung der Erfindung identische affine Moleküle oder Molekülteile mit unterschiedlichen Detektionsmolekülen (oder Teile) aufweisen.

In einer weiteren Alternative können unterschiedliche affine Moleküle oder Molekülteile mit unterschiedlichen Detektionsmolekülen oder Teilen kombiniert sein, oder alternativ, unterschiedliche affine Moleküle oder Teile mit identischen Detektionsmolekülen oder Teilen kombiniert sein.

Es können auch Mischungen verschiedener Sonden eingesetzt werden.

Der Einsatz mehrerer unterschiedlicher Sonden, die an unterschiedliche Detektionsmoleküle oder Molekülteile gekoppelt sind, erhöht zum einen die Spezifität des Signals (Korrelationssignals), zum anderen ermöglicht dies die Identifikation von Bioindikatoren, die sich in einem oder mehreren Merkmalen unterscheiden. Dies kann eine selektive Quantifizierung und Charakterisierung der Bioindikatoren ermöglichen.

In einer weiteren Variante der vorliegenden Erfindung kann der Nachweis der Bioindikatoren unter Verwendung von Nanopartikel, insbesondere unter Verwendung von Quantumdots (Qdots), erfolgen. Diese Quantumdots werden dazu mit einem Fängermolekül für den Bioindikator beschichtet. Die Fängermoleküle weisen dabei, wie schon zuvor beschrieben, affine Moleküle oder Molekülteile auf, die an wenigstens eine spezifische Bindungsstellen der Bioindikatoren binden. Die beschichteten Quantumdots werden direkt in die Probe gegeben und binden über die Fängermoleküle

spezifisch die Bioindikatoren in der Probe. Der Vorteil hierbei ist, dass die Bindung sehr effizient erfolgen kann, da diese in Lösung erfolgt und durch Mischen/Rühren begünstigt werden kann. Nach der Inkubation wird das Proben/Quantumdotgemisch auf eine Substratoberfläche, beispielsweise eine Mikrotiterplatte, aufgebracht, deren Oberfläche ebenfalls mit einem Fängermolekül beschichtet ist, welches jedoch ein anderes Epitop auf dem Bioindikator erkennt. Nicht auf der Oberfläche gebundene Bestandteile werden durch Waschen entfernt. Abschließend wird die Oberfläche durch Fluoreszenzmikroskopie mikroskopiert und ausgewertet.

Eine weitere mögliche Variante der vorliegenden Erfindung umfasst die Verwendung von Quantumdots, die mit einem Fängerantikörper gegen den Bioindikator beschichtet sind. Die beschichteten Quantumdots werden direkt in die Probe gegeben und binden die Bioindikatoren in der Probe. Anschließend wird ein zweiter Antikörper zugegeben, der beispielsweise mit einem Biotin-Molekül markiert ist. Die Zugabe von Quantumdots und biotinyliertem Antikörper kann auch in umgekehrter Reihenfolge erfolgen. Der Vorteil hierbei ist, dass die Bindung sehr effizient erfolgen kann, da diese in Lösung erfolgt und durch Mischen/Rühren begünstigt werden kann. Nach der Inkubation wird das Gemisch auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht, deren Glasboden mit beispielsweise Streptavidin beschichtet ist. Nicht auf der Oberfläche gebundene Bestandteile können durch Waschen entfernt werden. Abschließend wird die Oberfläche durch Fluoreszenzmikroskopie mikroskopiert und ausgewertet.

Bedingt durch die kinetischen und sterischen Gegebenheiten ist die Bindung der Bioindikatoren an die Qdots in ihrer monomeren Ausgestaltung begünstigt gegenüber ihrer oligomeren Ausgestaltung, so dass vorzugsweise die Bioindikatoren in ihrer monomeren Ausgestaltung nachgewiesen werden können.

Quantumdots (Qdots) sind käuflich am Markt zu erwerben. Qdots sind kleine Nanopartikel mit fluoreszenten Eigenschaften. Sie können Nanopartikel mit einem Kern-Schalen-Material aus beispielweise CdSe/ZnS umfassen. Diese können z. B. im Bereich von 2-7 nm vorliegen. Mit steigendem Durchmesser, kann die Fluoreszenz von Blau in Richtung Rot verschoben werden.

Bei der Verwendung von Qdots kann auf den zusätzlichen Einsatz von Sonden verzichtet werden.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführung können Carboxy-funktionalisierte Qdots eingesetzt werden. Dazu können beispielsweise 0,1 nM QDots (Quantumdots) mit einer Thiol-Spacer-Säure Mischung versetzt werden. Diese Thiol Spacer-Säure Mischung besteht z. B. aus 550 mM Tetramethylammoniumhydroxid, 275mM Thiol-Spacer-Säure (z. B. 3-Merkaptopropionsäure) in z. B. 1 ml  $\text{CHCl}_3$ , wobei die entstehende wässrige Phase entfernt wird. Diese Lösung wird mit den Qdots vermischt und nach 2 Tagen 50  $\mu\text{L}$  PBS hinzugefügt. Nach dem Ausschütteln wandern die Qdots in die wässrige Phase und man erhält die gewünschten Carboxy funktionalisierten Qdots.

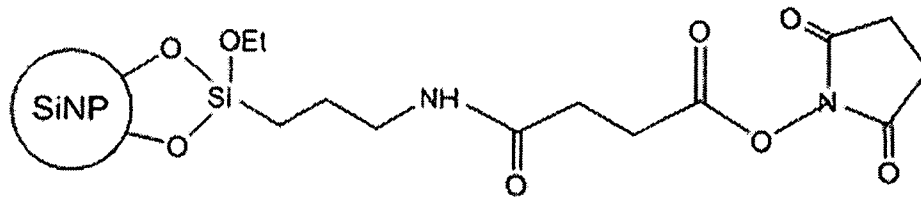
10 In einer anderen Variante können amino-terminierte Qdots eingesetzt werden. Dazu werden 1mg trockene Qdots mit einer Amino-spacer-Thiol Mischung in Methanol versetzt. Diese Amino-spacer-Thiol Mischung besteht aus 100 mg Amino-spacer-Thiol (z. B.: 2,2'-Diaminodiethyl disulfide). Die Mischung wird solange sonifiziert bis die Lösung die Qdots aufnimmt. Diese werden abzentrifugiert und in Wasser aufgenommen. In der wässrigen Phase befinden sich amino-terminierte Qdots.

In einer weiteren möglichen Ausführung der Erfindung kann eine Kopplung von Monomeren oder Epitopen, allgemein Bindungsstellen für die Bioindikatoren, an die Nanopartikel durchgeführt werden. Dazu können Nanopartikel mit Carboxy Termini verwendet werden, die in einen reaktiven NHS-Ester überführt werden. Die Bildung des NHS-Ester erfolgt vorzugsweise mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimid (kurz: EDC) und/oder N-Hydroxysuccinimid (kurz: NHS). Der NHS-Ester stellt die reaktive Zwischenstufe zur Reaktion mit einem primären Amin dar, das als Monomer der nachzuweisenden Bioindikatoren hinzugefügt wird.

25 Eine weitere Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens sieht vor, Amino-funktionalisierte Nanopartikel mit einem Maleinimido-Spacer-Carboxy reagieren zu lassen, z. B. mit 6-Maleinimido-Caprionsäure oder Maleinimido-PEG (optionale Länge)-COOH. Dadurch wird vorteilhaft bewirkt, dass eine Gruppe auf der Oberfläche des Nanopartikels eingeführt wird, die spezifisch mit Thiolen reagiert.

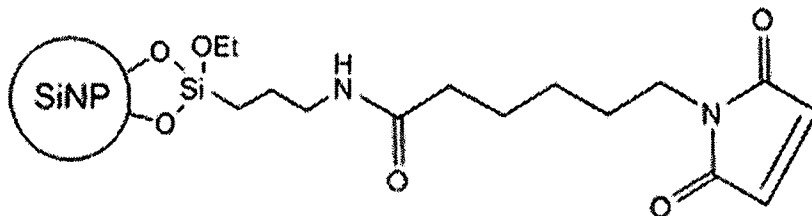
30 In einer anderen möglichen Variante werden die oben genannten NHS-Ester Partikel dazu verwendet Streptavidin an der Oberfläche der Nanopartikel zu binden.

Die Nanopartikel als solche, das heißt ohne die Bindungsstelle des Bioindikators sind neu und lösen somit bereits die Aufgabe der Erfindung:



5

ist dabei ein besonders bevorzugtes Ausgangsprodukt mit NHS-Estern an der Oberfläche von z. B. Silica-Nanopartikel (SiNP).



10

ist dabei ein besonders bevorzugtes Ausgangsprodukt mit Maleimidogruppen an der Oberfläche von z. B. Silica-Nanopartikel (SiNP).

Eine Vielzahl der hier jeweils nur einmalig abgebildeten Verbindungen ist selbstverständlich an der Oberfläche der Qdots angeordnet. Diese Anzahl ist vorteilhaft rechnerisch genau bestimmt und hängt vom Durchmesser des Qdots ab.

15

Nanopartikel mit N-Hydroxysuccinimidester Oberflächen reagieren gegebenenfalls unter Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid mit dem primären Amin des Monomers oder eines synthetischen Epitops der nachzuweisenden Bioindikatoren.

20

Diese Methode eignet sich besonders wenn die Aminosäure Lysin ein- oder mehrfach in einer Peptidsequenz des Monomers vorhanden ist. Besonders eignet sich diese Methode, wenn sich die Aminosäure nicht in der Epitopregion, das heißt der Binderegion für Antikörper, befindet. Falls kein Lysin vorhanden ist, kann entweder

der N-Terminus der Aminosäuresequenz selbst zur Bindung an den Qdot verwendet werden, oder die Peptidsequenzen mit zusätzlich eingeführten Lysininen verwendet werden.

5 Qdots mit Maleinimido-Gruppen auf der Oberfläche reagieren gegebenenfalls mit vorhandenen oder synthetisch eingebrachten Thiolen (z. B. Cystein) in der Proteinsequenz des Monomers oder Epitops.

Qdots mit Streptavidin Oberfläche binden besonders stark biotinylierte Monomere oder Epitope.

10 Diese Silica-Qdots reagieren gegebenenfalls unter Abspaltung von N-Hydroxy-succinimid mit dem primären Amin des Monomers der nachzuweisenden Bioindikatoren.

Aufgrund der chemischen Oberflächeneigenschaften lassen sich Modifikationen einfach durchführen. Außerdem ist das Material der Qdots stabil in physiologischen Pufferlösungen und gilt als gesundheitlich unbedenklich.

15 Insbesondere die oben gezeigten biofunktionalisierten Silica-Qdots stellen stabile, exakt größendefinierte Standards mit genau bestimmbarer Anzahl zugänglicher Epitope dar und werden daher ebenfalls vorteilhaft als Plattformtechnologie in diagnostischen Testverfahren oder in Spiking Experimenten für die quantitative und qualitative Bestimmung von Bioindikatoren angewendet.

20 In einer bevorzugten Ausführung erfolgt eine orts aufgelöste Bestimmung des Sonden signals, also eine orts aufgelöste Detektion des Signals, welches von der Sonde emittiert wird. Demgemäß sind in dieser Ausführung der Erfindung Verfahren, die auf einem nicht-orts aufgelösten Signal beruhen, wie ELISA oder Sandwich-ELISA, ausgeschlossen. Im Vergleich zu ELISA ist das vorliegende Verfahren etwa tausendfach empfindlicher, da einzelne Moleküle ausgezählt werden können (digitaler Readout)  
25 und nicht ein einzelnes integriertes Signal aus einer Bulkmessung generiert wird.

Bei der Detektion ist eine hohe Ortsauflösung vorteilhaft. In einer Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden dabei so viele Datenpunkte gesammelt, dass die Detektion eines Bioindikators vor einem Hintergrundsignal, welches z. B. durch gerätespezifisches Rauschen, andere unspezifische Signale oder unspezifisch gebundene Sonden verursacht wird, ermöglicht. Auf diese Weise werden so viele Werte  
30

ausgelesen (Read-out-Werte), wie orts aufgelöste Ereignisse, wie z. B. Pixel, vorhanden sind. Durch die Ortsauflösung wird jedes Ereignis vor dem jeweiligen Hintergrund bestimmt und stellt so einen Vorteil gegenüber ELISA-Verfahren ohne orts aufgelöstem Signal dar.

- 5 In einer Ausführung beruht die orts aufgelöste Bestimmung des Sondersignals auf total intern reflection fluorescence microscopy (tirfm) und der Untersuchung eines kleinen Volumenelements im Bereich von wenigen Femtolitern bis unterhalb eines Femtoliters, im Vergleich zum Volumen der Probe von beispielsweise 10 bis 1000 µl, oder eines Volumenbereichs oberhalb der Kontaktfläche der Fänger moleküle mit einer Höhe von 500 nm, bevorzugt 300 nm, besonders bevorzugt 250 nm, insbesondere 200 nm.

Im Sinne der Erfindung werden Bioindikatoren nachgewiesen, welche ausgewählt sind aus der Gruppe enthaltend oder bestehend aus Zellen, Genen, Genprodukten, Proteinen, Hormonen, RNA, Enzymen.

- 15 In einer Ausführung wird das Material des Substrats ausgewählt aus der Gruppe enthaltend oder bestehend aus Kunststoff, Silizium und Siliziumdioxid. In einer bevorzugten Alternative wird als Substrat Glas eingesetzt.

In einer weiteren Ausführung der Erfindung sind die Fänger moleküle kovalent an das Substrat gebunden.

- 20 Hierzu kann in einer Alternative ein Substrat eingesetzt werden, das eine hydrophile Oberfläche aufweist. In einer Alternative kann dies durch das Auftragen einer hydrophilen Schicht, noch vor Schritt a), auf das Substrat erreicht werden. Mithin binden die Fänger moleküle, insbesondere kovalent an das Substrat bzw. an die hydrophile Schicht, mit welchen das Substrat beladen ist.

- 25 Die hydrophile Schicht kann eine Biomolekül abweisende Schicht sein, so dass die unspezifische Bindung von Biomolekülen an das Substrat vorteilhaft minimiert wird. Auf diese Schicht können die Fänger moleküle, bevorzugt kovalent immobilisiert werden. Diese sind affin gegenüber einem Merkmal der Bioindikatoren. Die Fänger moleküle können alle identisch sein, oder es können Mischungen unterschiedlicher Fänger moleküle vorliegen.
- 30

Bevorzugt umfassen die Fängermoleküle kein Detektionsmolekül bzw. Molekülteile, die zur Detektion geeignet sind.

In einer Ausführung kann die hydrophile Schicht ausgewählt werden aus der Gruppe enthaltend oder bestehend aus Polyethylenglykol, Poly-Lysin, bevorzugt Poly-D-Lysin, und Dextran oder Derivate davon, bevorzugt Carboxymethyl-Dextran (CMD). Derivate im Sinne der Erfindung sind Verbindungen, die sich in einigen Substituenten von den Stammverbindungen unterscheiden, wobei die Substituenten gegenüber dem erfindungsgemäßen Verfahren inert sind, d.h. kein Messsignal erzeugen, welches zu einer Verfälschung der Detektion führen könnte.

10 In einer weiteren möglichen Ausführung der Erfindung kann die Oberfläche des Substrats vor Auftrag der hydrophilen Schicht funktionalisiert werden, indem die Oberfläche zunächst hydroxyliert wird und anschließend mit Aminogruppen aktiviert wird. Diese Aktivierung mit Aminogruppen kann in einer Alternative beispielsweise, aber nicht darauf beschränkt, auch durch In-Kontaktbringen des Substrats mit APTES (3-  
15 Aminopropyltriethoxysilan) oder mit Ethanolamin erfolgen.

Zur Vorbereitung des Substrats auf die Beschichtung können ein oder mehrere der folgenden Schritte durchgeführt werden:

- Waschen eines Substrats aus Glas bzw. eines Glasträgers im Ultraschallbad oder Plasma-cleaner, alternativ dazu in 5 M NaOH mindestens 3 Stunden inkubieren,
- Spülen mit Wasser und anschließendem Trocknen unter Stickstoff,
- Eintauchen in eine Lösung aus konzentrierter Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 3:1 für die Aktivierung der Hydroxylgruppen,
- Spülen mit Wasser bis zu einem neutralen pH, anschließend mit Ethanol und Trocknen unter Stickstoffatmosphäre,
- Eintauchen in eine Lösung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) (1 – 7 %), bevorzugt in trockenem Toluol, oder einer Lösung von Ethanolamin,
- Spülen mit Aceton oder DMSO und Wasser und Trocknen unter Stickstoffatmosphäre.

In einer möglichen Alternative erfolgt das in Kontaktbringen des Substrats mit APTES in der Gasphase; das gegebenenfalls vorbehandelte Substrat wird mithin mit APTES bedampft.

5 Für die Beschichtung mit Dextran, bevorzugt Carboxymethyl-Dextran (CMD), wird das Substrat mit einer wässrigen Lösung von CMD in einer Konzentration von 10 mg/ml oder 20 mg/ml und gegebenenfalls N-Ethyl-N-(3-Dimethylaminpropyl) Carbodiimid (EDC), (200 mM) und N-Hydroxysuccinimid (NHS), (50 mM) inkubiert und anschließend gewaschen.

10 Das Carboxymethyl-Dextran kann in einer Variante kovalent an die Glasoberfläche gebunden sein, die zunächst hydroxyliert und anschließend mit Aminogruppen funktionalisiert wurde.

15 Als Substrat können beispielsweise auch Mikrotiterplatten, bevorzugt mit Glasboden, eingesetzt werden. Da bei der Verwendung von Polystyrolrahmen der Einsatz von konzentrierter Schwefelsäure nicht möglich ist, erfolgt die Aktivierung der Glasoberfläche in einer Ausführungsvariante der Erfindung analog.

Auf diese hydrophile Schicht können, bevorzugt kovalent, Fängermoleküle immobilisiert werden, welche affin gegenüber einem Merkmal des zu detektierenden Bioindikators sind. Dieses Merkmal kann ein Protein sein. Die Fängermoleküle können alle identisch sein oder Mischungen verschiedener Fängermoleküle sein.

20 In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung werden die Fängermoleküle, bevorzugt Antikörper, gegebenenfalls nach einer Aktivierung des mit CMD beschichteten Trägers durch eine Mischung aus EDC/NHS (200 bzw. 50 mM), auf dem Substrat immobilisiert.

25 Verbleibende Carboxylat-Endgruppen, an die keine Fängermoleküle gebunden wurden, können deaktiviert werden. Zur Deaktivierung dieser Carboxylat-Endgruppen auf dem CMD-Spacer wird Ethanolamin verwendet. Vor dem Auftrag der Proben werden die Substrate bzw. Träger gegebenenfalls mit Puffer gespült.

30 Die zu vermessende Probe wird mit dem so präparierten Substrat in Kontakt gebracht und gegebenenfalls inkubiert. Als zu untersuchende Probe können beispielsweise körpereigene Flüssigkeiten oder Gewebe eingesetzt werden. In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung wird die Probe ausgewählt aus Liquor (CSF), Blut,

Plasma und Urin. Die Proben können unterschiedliche, dem Fachmann bekannte, Aufbereitungsschritte durchlaufen.

5 In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung kann das Auftragen der Probe unmittelbar auf dem Substrat erfolgen z. B. dem nicht beschichteten Substrat, gegebenenfalls durch kovalente Bindung. Gegebenenfalls erfolgt die Bindung an eine aktivierte Oberfläche des Substrats.

In einer anderen Variante der vorliegenden Erfindung kann eine Vorbehandlung der Probe nach einem oder mehreren der folgenden Verfahrensschritte erfolgen:

- Verdünnen mit Wasser oder Puffer,
- 10 • Behandlung mit Enzymen, zum Beispiel Proteasen, Nuklease, Lipasen,
- Zentrifugieren,
- Präzipitation,
- Konkurrenz mit Sonden, um eventuell vorhandene Antikörper zu verdrängen.

Unspezifisch gebundene Substanzen können durch Waschschriffe entfernt werden.

15 In einem weiteren Schritt können die immobilisierten Bioindikatoren mit einer oder mehreren für die weitere Detektion dienlichen Sonden markiert werden. Wie oben beschrieben können die einzelnen Schritte auch in einer anderen Reihenfolge erfindungsgemäß durchgeführt werden.

20 Durch geeignete Waschschriffe werden überschüssige Sonden, die nicht an die Bioindikatoren gebunden sind, entfernt.

In einer Alternative des Verfahrens müssen diese überschüssigen Sonden nicht entfernt werden. Dadurch entfällt ein Waschschriff und es findet auch keine Gleichgewichtsverschiebung in Richtung der Dissoziation der Bioindikatoren-Sonden-Komplexe oder -Verbindungen statt. Durch die orts aufgelöste Detektion werden die überschüssigen Sonden bei der Auswertung nicht erfasst.

25 In einer Ausführung sind die Bindungsstellen der Bioindikatoren Epitope und die Fänger-moleküle und/oder Sonden sind Antikörper und/oder Antikörperteile und/oder Fragmente hiervon. In einer weiteren vorteilhaften Ausführung werden Sonden eingesetzt, die wenigstens zwei verschiedene Epitope auf dem Bioindikator mit erhöhter

Avidität erkennen, wobei zu beachten ist, dass diese nicht bereits durch die Fänger-  
moleküle belegt sind. Durch den Einsatz von wenigstens bi-spezifischen oder mehr-  
spezifischen Sonden, die wenigstens zwei oder mehr als zwei Epitope auf dem Bioin-  
dikator erkennen, kann in einer vorteilhaften Weise die Spezifität des Nachweises er-  
höht werden.

In einer bevorzugten Ausführung der vorliegenden Erfindung unterscheiden sich die  
Fängermoleküle und die Sonden. So können z. B. unterschiedliche Antikörper und/o-  
der Antikörperteile und/oder Fragmente als Fängermoleküle und als Sonden einge-  
setzt werden.

In einer weiteren Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung werden verschiedene  
Sonden gleichzeitig eingesetzt.

In einer weiteren Alternative der vorliegenden Erfindung werden mindestens zwei o-  
der mehr unterschiedliche Fängermoleküle und/oder Sonden eingesetzt, die  
z. B. unterschiedliche Antikörper enthalten und gegebenenfalls auch unterschiedliche  
Fluoreszenzfarbstoffmarkierungen tragen.

Zur Detektion sind die Sonden so gekennzeichnet, dass sie ein optisch detektierba-  
res Signal aussenden, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Fluoreszenz-, Bio-  
lumineszenz- und Chemolumineszenz-Emission sowie Absorption.

Die Sonden sind vorzugsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Als Fluoreszenz-  
farbstoffe können die dem Fachmann bekannten Farbstoffe eingesetzt werden. Alter-  
nativ können GFP (Green Fluorescence Protein), Konjugate und/oder Fusionsprote-  
ine davon, sowie Quantendots verwendet werden.

Zur Qualitätskontrolle der Oberfläche, zum Beispiel beim Nachweis der Gleichmäßig-  
keit der Beschichtung mit Fängermolekülen, können Fängermoleküle gekennzeichnet  
mit Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt werden.

Hierzu wird bevorzugt ein Farbstoff verwendet, der nicht mit dem Nachweis des Flu-  
oreszenzfarbstoffs der Sonde am Bioindikator interferiert. Dadurch wird eine nachträg-  
liche Kontrolle des Aufbaus möglich sowie eine Normierung der Messergebnisse.

Die Detektion der immobilisierten und markierten Bioindikatoren erfolgt mittels Abbil-  
dung der Oberfläche, z. B. mit Laser Scanning Mikroskopie. Eine möglichst hohe

Ortsauflösung ermittelt eine hohe Anzahl an Bildpunkten, wodurch die Sensitivität sowie die Selektivität des Verfahrens erhöht werden können, da strukturelle Merkmale mit abgebildet und analysiert werden können. Somit erhöht sich das spezifische Signal vor dem Hintergrundsignal (z. B. unspezifisch gebundener Sonden).

- 5 Die Detektion erfolgt beispielweise bevorzugt mit ortsauflösender Fluoreszenz-mikroskopie durch ein TIRF-Mikroskop, sowie die entsprechenden supraauflösenden Varianten davon, wie zum Beispiel STORM, dSTORM.

10 In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung wird ein Laserfokus, wie er z. B. in der Laser-Scanning-Mikroskopie verwendet wird, oder ein FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy System) dazu eingesetzt, sowie die entsprechenden supraauflösenden Varianten wie zum Beispiel STED, PALM oder SIM. Durch hoch-sensitive Fluoreszenzmikroskopie können nun alle einzelnen Fluoreszenz-markierten Sonden auf der Oberfläche detektiert und quasi einzeln gezählt werden. Diese erscheinen in den Bilddaten als Pixel mit einem Graustufenwert oberhalb des Hintergrundsignals  
15 (digitaler Readout). Damit ergibt sich auch die Menge an nachzuweisenden Zielmolekülen – prinzipiell mit Einzelmolekül-Sensitivität. Im Unterschied zu ELISA entstehen durch dieses Verfahren so viele Auslese-Werte, wie orts aufgelöste Ereignisse (z. B. Pixel) vorhanden sind. Abhängig von der Anzahl an unterschiedlichen Sonden wird diese Information vorteilhaft vervielfacht. Diese Vervielfachung gilt für jedes Detekti-  
20 onereignis und führt zu einem Informationsgewinn, da sie weitere Eigenschaften, z. B. ein zweites Merkmal, über Bioindikatoren offenbart. Durch so einen Aufbau kann für jedes Ereignis die Spezifität des Signales erhöht werden.

25 Die Sonden können derart ausgewählt werden, dass die Anwesenheit von einzelnen Bioindikatoren, wie z. B. einzelne Membranproteine, das Messergebnis nicht beeinflussen.

Die Sonden können derart ausgewählt werden, dass Bioindikatoren Spezies (Phenotypen) für jeden einzelnen Bioindikator bestimmt werden können.

30 Zusätzliche Sonden können derart ausgewählt werden, dass sie die Unterscheidung zwischen DNA/ RNA-enhaltenden Bioindikatoren und damit Aufschluss über das Innere der Bioindikatoren geben können. Beispielweise können hierzu DNA/RNA-bindende Fluorophore wie DAPI von Hoechst verwendet werden.

Zur Auswertung werden die orts aufgelösten Informationen, z. B. die Fluoreszenz-Intensität, aller eingesetzten und detektierten Sonden herangezogen, um z. B. die Anzahl einzelner Bioindikatoren, deren Größe und deren Merkmale zu bestimmen.

5 Dabei können z. B. auch Algorithmen der Hintergrundminimierung und/oder auch Intensitäts-Schwellenwerte für die weitere Auswertung sowie der Mustererkennung angewandt werden.

Weitere Bildanalyse-Optionen beinhalten z. B. die Suche nach lokalen Intensitätsmaxima, um aus der Bildinformation die Zahl an detektierten Bioindikatoren zu erhalten und auch die Partikelgrößen bestimmen zu können.

10 Um die Testergebnisse miteinander über Entfernungen, Zeiten und Experimentatoren hinweg vergleichbar zu machen, können interne und/oder externe Standards eingesetzt werden.

Im Folgenden werden beispielhaft zwei mögliche Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens beschrieben:

15 a) Konsekutives Verfahren:

In dieser Ausführung des Verfahrens werden simultan mehrere verschiedene Bioindikatoren in einer einzigen Probe quantifiziert.

20 Dazu werden verschiedene Fängermoleküle jeweils auf verschiedene Bereiche der Oberfläche des Substrats, wie beispielsweise eine Glas- oder Kunststoffplatte mit Bohrungen zur Aufnahme von Proben, aufgebracht (gespottet, siehe Figur 1). Anschließend wird die zu untersuchende Probe aufgebracht und die zu analysierenden unterschiedlichen Bioindikatoren werden auf den jeweiligen Bereichen mit Hilfe der für die jeweiligen unterschiedlichen Bioindikatoren spezifischen Fängermoleküle immobilisiert. Zur Detektion werden verschiedene Sonden eingesetzt, welche die zu  
25 analysierenden Bioindikatoren spezifisch erkennen und an diese spezifisch binden. Diese Sonden können mit demselben Fluorochrom oder mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert sein. Schließlich werden die jeweiligen Bereiche der Probenplatte nacheinander (Bioindikator 1, 2, 3, 4, usw.) durch Fluoreszenzmikroskopie ausgelesen. Die verschiedenen Bioindikatoren werden dann in ihren jeweiligen Farbkanälen ortsabhängig detektiert oder in einem Farbkanal ortsabhängig detektiert.  
30

b) Simultanes Verfahren:

In dieser Ausführung des Verfahrens werden simultan mehrere verschiedene Bioindikatoren in einer einzigen Probe quantifiziert.

5 Dazu wird ein Gemisch von Fängermolekülen auf die verschiedenen Bereiche der Oberfläche des Substrats, wie beispielsweise eine Glas- oder Kunststoffplatte mit Bohrungen zur Aufnahme von Proben, aufgebracht. Anschließend wird die zu untersuchende Probe mit den unterschiedlichen Bioindikatoren aufgebracht und die zu analysierenden unterschiedlichen Bioindikatoren werden auf der Oberfläche mit Hilfe der für die jeweiligen unterschiedlichen Bioindikatoren spezifischen Fängermoleküle immobilisiert. Zur Detektion werden verschiedene Sonden eingesetzt, die spezifisch an die zu analysierenden Bioindikatoren binden. Die verschiedenen Sonden sind jeweils mit verschiedenen Fluorochromen markiert. Schließlich wird die Oberfläche durch Fluoreszenzmikroskopie ausgemessen; die verschiedenen Bioindikatoren können dann in ihren jeweiligen Farbkanälen spezifisch detektiert werden.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit enthaltend eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- Substrat, optional mit hydrophiler Oberfläche,
- Fängermolekül(e),
- Sonde,
- 20 - Substrat mit Fängermolekül,
- Lösungen,
- Standard,
- Puffer.

25 Als Standard kann hier vorzugsweise das Monomer des zu untersuchenden Bioindikators eingesetzt werden, wobei dieses Monomer vorzugsweise aus einem Organismus gewonnen wird, der rekombinant hergestellt oder chemisch synthetisiert wurde. Der Standard muss zumindest alle Sequenzen bzw. Strukturen aufweisen, die auch von den eingesetzten Sonden und Fängermolekülen erkannt werden und eine möglichst ähnliche Affinität, insbesondere einen ähnlichen KD-Wert, aufweisen.

Die Verbindungen und/oder Komponenten des Kits der vorliegenden Erfindung können in Behältern gegebenenfalls mit/in Puffern und/oder Lösung, verpackt sein.

Alternativ können einige Komponenten in demselben Behälter verpackt sein. Zusätzlich dazu oder alternativ dazu könnten eine oder mehrere der Komponenten an einem festen Träger, wie z. B. einer Glasplatte, einem Chip oder einer Nylonmembran oder an die Vertiefung einer Mikrotiterplatte, absorbiert sein. Dann umfasst das Substrat eine solche Mikrotiterplatte.

Ferner kann das Kit Anweisungen für den Gebrauch des Kits für eine beliebige der Ausführungsformen enthalten.

10 In einer weiteren Variante des Kits sind auf dem Substrat die oben beschriebenen Fängermoleküle bereits immobilisiert. Zusätzlich kann das Kit Lösungen und/oder Puffer enthalten. Zum Schutz der Beschichtung und/oder der darauf immobilisierten Fängermoleküle können diese mit einer Lösung oder einem Puffer überschichtet vorliegen.

15 Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis von Bioindikatoren in beliebigen Proben zur Quantifizierung und damit Titerbestimmung von Bioindikatoren.

Vorteilhaft kann das Verfahren damit auch den Nachweis einer Erkrankung, wie z. B. Kardiovaskulären-, Nieren- und Krebserkrankungen, den Nachweis einer Immunantwort erbringen. Das Verfahren kann in der Wirkstoffentwicklung, der direkten und absoluten Quantifizierung der Bioindikatoren, bei der Therapie begleitenden Diagnostik (target engagement), der Differentialdiagnostik, dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktion und/oder bei der Typisierung von Bioindikatoren eingesetzt werden.

25 Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Überwachung von Therapien mit Bioindikatoren sowie zur Überwachung und/oder die Überprüfung der Wirksamkeit von Wirkstoffen und/oder Heilverfahren. Das Verfahren kann daher bei klinischen Tests, Studien als auch beim Therapie-Monitoring eingesetzt werden. Hierzu werden Proben gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren vermessen und die Ergebnisse verglichen.

30 Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung der Wirksamkeit von Wirkstoffen gegen

erkrankte Zellen. Dabei werden die Ergebnisse anhand der Charakterisierung von Bioindikatoren in Proben miteinander verglichen. Bei den Proben handelt es sich entsprechend um Körperflüssigkeiten, entnommen vor beziehungsweise nach, oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Gabe der Wirkstoffe beziehungsweise Durchführung des Heilverfahrens. Erfindungsgemäß werden die Ergebnisse mit einer Kontrolle verglichen, die nicht dem Wirkstoff und/oder Heilverfahren unterworfen wurde. Anhand der Ergebnisse werden Wirkstoffe und/oder Heilverfahren ausgewählt.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung, ob eine Person in einer klinischen Studie aufgenommen wird. Hierzu werden Proben gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren vermessen und in Bezug auf einen Grenzwert die Entscheidung getroffen.

Spezieller Beschreibungsteil:

Nachfolgend wird der Gegenstand der Erfindung an Hand von Figuren und Ausführungsbeispielen erläutert, ohne, dass der Gegenstand der Erfindung hierdurch auf diese Ausführungsbeispiele beschränkt wird.

Figur 1: Probenplatte zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener Bioindikatoren

Figur 2: Nachweis von Bioindikatoren mit Quantumdots (Qdots)

Figur 3: Nachweis von Bioindikatoren mit Quantumdots (Qdots) in Verbindung mit Biotin/ Streptavidin

Figur 4: Nachweis von Streptavidin in unterschiedlichen Konzentrationen

Figur 5: Nachweis eines monomeren Protein-Konstrukts 2ALFA2GFP in unterschiedlichen Konzentrationen

Figur 1 zeigt eine Probenplatte zum gleichzeitigen Nachweis von verschiedenen Bioindikatoren innerhalb eines Untersuchungsansatzes.

Figur 1 zeigt eine Probenplatte zum gleichzeitigen Nachweis von verschiedenen Bioindikatoren innerhalb eines Untersuchungsansatzes, auch Multiplex-Verfahren genannt, bei dem die Glasoberfläche der Probenplatte vier Bereiche, insbesondere Bohrungen oder Vertiefungen, aufweist, die jeweils als Reaktionsraum für das erfindungsgemäße Verfahren genutzt werden können.

Dieses Verfahren wird im Folgenden beispielhaft beschrieben.

In der folgenden Ausgestaltung des Verfahrens werden konsekutiv in einem Untersuchungsansatz mehrere verschiedene Bioindikatoren in einer einzigen Probe quantifiziert. Dazu werden verschiedene Fängermoleküle auf verschiedene Bereiche der Probenplatten-Oberfläche aufgebracht, auch als gespottet bezeichnet. In Figur 1 sind dies die vier unterschiedlich schraffierten quadratischen Bereiche, insbesondere Bohrungen oder Vertiefungen der Probenplatte. Anschließend wird die Probe aufgebracht, und die zu analysierenden Bioindikatoren werden mit Hilfe der spezifischen Fängermoleküle auf dem jeweiligen Bereich immobilisiert. Zur Detektion werden verschiedene Sonden eingesetzt, die die zu analysierenden Bioindikatoren erkennen. Diese Sonden können mit demselben Fluorochrom oder mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert sein. Schließlich werden die jeweiligen Spots nacheinander (Bioindikator 1, 2, 3, 4, usw.) durch Fluoreszenzmikroskopie ausgelesen. Die verschiedenen Bioindikatoren werden dann entsprechend ihren jeweiligen Farbkanälen ortsabhängig detektiert oder in einem Farbkanal ortsabhängig detektiert.

In einer weiteren alternativen Ausführung des Verfahrens werden simultan mehrere Bioindikatoren in einer einzigen Probe quantifiziert. Dazu wird ein Gemisch von Fängermolekülen auf die dafür vorgesehenen Bereiche/ Bohrungen oder Vertiefungen der Probenplatte aufgebracht. Anschließend wird in diese Bereiche die Probe aufgebracht, und die zu analysierenden Bioindikatoren werden auf der Oberfläche immobilisiert. Zur Detektion werden verschiedene Sonden eingesetzt, die an die zu analysierenden Bioindikatoren binden. Die verschiedenen Sonden sind jeweils mit verschiedenen Fluorochromen markiert. Schließlich wird die Oberfläche durch Fluoreszenzmikroskopie ausgelesen; die verschiedenen Bioindikatoren werden dann in ihren jeweiligen Farbkanälen detektiert.

Figur 2 zeigt einen erfindungsgemäßen Nachweis von Bioindikatoren unter Verwendung von Quantumdots (Qdot). Die Qdots werden zunächst mit einem Fängermolekül (B) für den Bioindikator (A) beschichtet. Die mit den Fängermolekülen (B) beschichteten Qdots werden in Schritt 1 direkt in die Probe gegeben und binden spezifisch den Bioindikator (A). Nach einer Inkubation wird in Schritt 2 das Bioindikator (B)/Qdot-Gemisch auf die Oberfläche einer Probenplatte, beispielsweise eine Mikrotiterplatte, aufgebracht. Die Oberfläche der Probenplatte (C) ist mit Fängermolekülen

(B) beschichtet, die jedoch eine andere Bindungsstelle auf dem Bioindikator (A) erkennen. Nicht auf der Oberfläche der Probenplatte (C) gebundene Bestandteile werden durch Waschen entfernt. Anschließend wird die Oberfläche (C) mit Hilfe von beispielsweise Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet, welche die auf der Oberfläche der Probenplatte (C) gebundenen fluoreszierenden Qdots detektiert.

Figur 3 zeigt einen erfindungsgemäßen Nachweis von Bioindikatoren (A) unter Verwendung von Quantumdots (Qdots), die mit einem Fänger-moleküle (B) für den Bioindikator (A) beschichtet sind. Die beschichteten Qdots werden in Schritt 1 direkt in die Probe gegeben und binden spezifisch den Bioindikator (A) aus der Probe. Anschließend wird in Schritt 2 ein zweites Fänger-molekül (B) zugegeben, welches mit einem Biotin-Molekül (D) markiert ist. Die Zugabe von Qdots und biotinylierten Fänger-antikörpern (B-D), kann auch in umgekehrter Reihenfolge erfolgen. Nach einer Inkubation wird dieses Gemisch gebundener Bioindikator-Qdots in Schritt 3 auf die Oberfläche einer Probenplatte (C), beispielsweise eine Mikrotiterplatte, aufgebracht. Die Oberfläche der Probenplatte (C) ist mit Streptavidin (E) beschichtet. Nicht auf der Oberfläche der Probenplatte (C) gebundene Bestandteile werden durch Waschen entfernt. Anschließend wird die Oberfläche (C) mit Hilfe von beispielsweise Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet, welche die auf der Oberfläche der Probenplatte (C) gebundenen fluoreszierenden Qdots detektiert.

Figur 4 zeigt einen Nachweis von Streptavidin in unterschiedlichen Konzentrationen. Auf der Abszisse (X-Achse) sind die unterschiedlichen Streptavidin-Konzentrationen aufgetragen, angegeben sowohl als femtomolare (fM) bis picomolare (pM) Angabe (obere Zahlenreihe) als auch in entsprechender mg/ml (untere Zahlenreihe) Angabe. Auf der Ordinate (Y-Achse) sind die Zahlenwerte des Detektionssignals, und zwar des TIRF Mikroskops angegeben. Die Zahlenwerte geben die Anzahl der detektierten Pixel an.

Gemäß Figur 4 kann eine Detektion von Streptavidin in einer dekadischen Verdünnungsreihe bis 1 femtomolar (fM) bzw.  $5 \cdot 10^{-11}$  mg/ml nachgewiesen werden.

Als Probe wurde fluoreszenzmarkiertes Streptavidin-Alexa Fluor633 verwendet und in salinem tris(hydroxymethyl)aminomethan (TBS) bei pH 7,4 verdünnt. Als Negativkontrolle (0) wurde der zuvor genannte Verdünnungspuffer TBS verwendet.

Für das Ausführungsbeispiel wurden kommerzielle Mikrotiterplatten (Greiner Bio-one; Sensoplate Plus) mit 384 Reaktionskammern (RK) und Glasboden verwendet.

Zunächst wurde die Oberfläche der Mikrotiterplatte aufgebaut bzw. funktionalisiert.

5 Hierfür wurde in die RK der Mikrotiterplatte jeweils 40 µl 1%iges Bovines Serumalbumin (BSA, Applichem) in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, Sigma Aldrich) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte mit den Reaktionskammern (RK) dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte je RK die Zugabe von 20 µl 1mM EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (ThermoScientific) als Fängermolekül und einer Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur (RT). Nach dreimaligen Waschen mit PBS wurden die RK der Mikrotiterplatte mit jeweils 40 µl 1%iger BSA in PBS geblockt, für 1 h bei RT inkubiert und danach fünfmal mit salinem tris(hydroxymethyl)aminomethan (TBS, Serva) mit 0,05% Tween-20 (Applichem) (TBS-T) und fünfmal mit salinem tris(hydroxymethyl)aminomethan (TBS) gewaschen. Die Probe Streptavidin, konjugiert mit Alexa Fluor 633 (ThermoScientific), wurde sequentiell in TBS verdünnt und in vierfacher Ausführung je 20 µl Probe in die RK aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die RK fünfmal mit TBS gewaschen, mit 70 µl TBS mit 0,03% ProClin (SigmaAldrich) je RK versetzt, um bakterielles Wachstum zu verhindern, und mit einer Folie versiegelt. Da die Probe selber fluoreszenzmarkiert ist, kann sie direkt detektiert werden.

Zum Nachweis der monomeren Proteine wurde eine orts aufgelöste Mikroskopie durchgeführt. Die Messung erfolgte im TIRF Mikroskop (Leica) mit einem 100 fach Öl Immersionsobjektiv. Hierfür wurde der Glasboden der Mikrotiterplatte reichlich mit Immersions-Öl bestrichen und die Mikrotiterplatte in die automatisierte Bühne des Mikroskops eingebracht. Danach wurde je RK an 5 x 5 Positionen im Fluoreszenzkanal Ex/Em=633/705 nm je ein Bild (1000 x 100 pixel) konsekutiv aufgenommen, um so viele Datenpunkte zu erhalten, dass die Detektion einzelner Proteinmoleküle vor dem Hintergrundsignal möglich wurde. Es wurde die maximale Laserleistung (100%), eine Belichtungszeit von 500 ms und ein Verstärkungswert von 1000 gewählt. Die Bilddaten wurden danach ausgewertet. Intensitätsschwellenwerte wurde für jeden Kanal bei 0,001% Graustufen der gemittelten Negativkontrolle gesetzt. Anschließend wurde die Anzahl der Pixel über alle Bilder in jeder RK gemittelt und danach die Mittelwerte

der mittleren Pixelzahlen der Replikatwerte ermittelt und die Standardabweichung angegeben.

Die Werte sind in Figur 4 gezeigt. Die Ergebnisse zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem Messsignal über 6 Log Stufen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die Probe bis zu einer Konzentration von wenigstens 1 fM bzw.  $5 \cdot 10^{-11}$  mg/ml von der Negativkontrolle unterschieden werden.

Dieses Ausführungsbeispiel zeigt, dass die Nachteile anderer Verfahren, wie beispielsweise der geringe dynamische Messbereich und eine maximale Sensitivität nur bis in den picomolaren Bereich, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren überwunden werden kann. Die Werte dieses Ausführungsbeispiels zeigen einen dynamischen Messbereich über 6 Log Stufen und eine Sensitivität im femtomolaren Bereich.

Figur 5 A und B zeigen einen Nachweis des monomeren Protein-Konstrukts 2ALFA2GFP in unterschiedlichen Konzentrationen und zwar in einer Verdünnungsreihe von 10 pM bzw.  $6 \cdot 10^{-7}$  mg/ml bis 100 fM bzw.  $6 \cdot 10^{-9}$  mg/ml. Auf der Abszisse (X-Achse) sind die unterschiedlichen Protein-Konzentrationen des 2ALFA2GFP aufgetragen, angegeben sowohl als femtomolare (fM) bis picomolare (pM) Angabe (obere Zahlenreihe) als auch in entsprechender mg/ml (untere Zahlenreihe) Angabe. Auf der Ordinate (Y-Achse) sind die Zahlenwerte des Detektionssignals, und zwar des TIRF Mikroskops angegeben. Die Zahlenwerte geben die Anzahl der detektierten Pixel an.

Als Beispiel für den Nachweis eines Bioindikators wurde in diesem Ausführungsbeispiel das monomere Protein-Konstrukt 2ALFA2GFP verwendet, welches aus zwei ALFA-Protein-Teilen [11] und zwei GFP-Proteinen (green fluorescent protein) besteht. Dieses Konstrukt wurde in einer Verdünnungsreihe von 10 picomolar (pM) bis 100 femtomolar (fM) in salinem tris(hydroxymethyl)aminomethan (TBS) bei pH 7,4 verdünnt. Als Negativkontrolle (0) wurde der Verdünnungspuffer TBS verwendet. Als Sonde wurde der Einzeldomänenantikörper anti-ALFA, fluoreszenz-konjugiert mit AlexaFluor647, (FluoTag-X2 anti-ALFA, NanoTag) benutzt, der an den ALFA-Teil des 2ALFA2GFP Protein-Konstrukts bindet.

Für dieses Protein-Konstrukt wurden der ALFA-Tag und das GFP-Protein ausgewählt, weil diese an ihre jeweiligen Einzeldomänenantikörper mit einer Affinität im picomolaren Bereich binden.

### Konkrete Ausführung

Für das Ausführungsbeispiel wurden kommerzielle Mikrotiterplatten mit 384 Reaktionskammern (RK) und Glasboden (Thermo Scientific) verwendet.

5 Als Fänger-molekül wurde der anti-GFP Einzeldomänenantikörper (GFP VHH, recombinant binding protein, gt-250, chromotek) in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt, der in TBS verdünnt wurde. 40 µl dieser Lösung wurden jeweils in die Reaktionskammern (RK) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionskammern (RK) fünfmal mit TBS-T und fünfmal mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Reaktionskammern (RK) jeweils mit 80 µl 1%  
10 BSA in TBS geblockt, für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und danach wieder fünfmal mit TBS-T und fünfmal mit TBS gewaschen. Die Probe (Protein-Konstrukt 2ALFA2GFP) wurde sequentiell in TBS verdünnt und in vierfacher Ausführung jeweils 20 µl Probe in die Reaktionskammern (RK) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionskammern (RK) fünfmal mit  
15 TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Sonde anti-ALFA-CF647 (20 µl) und eine Inkubation bei RT für 1 h. Danach wurden die Reaktionskammern (RK) fünfmal mit TBS gewaschen, mit jeweils 80 µl TBS mit 0,03% ProClin (SigmaAldrich) versetzt, um bakterielles Wachstum zu verhindern, und mit einer Folie versiegelt.

Zum Nachweis der monomeren Proteine wurde eine orts aufgelöste Mikroskopie  
20 durchgeführt. Die Messung erfolgte im TIRF Mikroskop (Leica) mit einem 100-fach Öl-Immersionsobjektiv. Hierfür wurde der Glasboden der Mikrotiterplatte reichlich mit Immersions-Öl bestrichen und die Platte in die automatisierte Bühne des Mikroskops eingebracht. Danach wurde je Reaktionskammer (RK) an 5 x 5 Positionen in zwei Fluoreszenzkanälen (Ex/Em=633/715 nm und 488/525 nm) je ein Bild (1000 x 100  
25 pixel) konsekutiv aufgenommen, um so viele Datenpunkte zu erhalten, dass die Detektion einzelner Proteinmoleküle vor dem Hintergrundsignal möglich wurde. Es wurde die maximale Laserleistung (100%), eine Belichtungszeit von 1000 ms und ein Verstärkungswert von 1300 gewählt. Die Bilddaten wurden danach ausgewertet. Intensitätsschwellenwerte wurde für jeden Kanal bei 0,001% Graustufen der gemittelten negativ Kontrolle gesetzt. Anschließend wurde die Anzahl der Pixel über alle Bilder in jeder Reaktionskammer gemittelt und danach die Mittelwerte der Mittleren Pixelzahlen der Replikatwerte ermittelt und die Standardabweichung angegeben.  
30

Die Werte sind in der Figur 5 gezeigt. In Figur 5 A wird das monomere Protein direkt über die Fluoreszenz von GFP im Kanal 488 detektiert, in Figur 5 B wird das Protein über die Sonde anti-ALFA-AF647 im Kanal 633 detektiert. Der Nachweis des Proteins über die Sonde ist vergleichbar mit dem direkten Nachweis des Proteins über den fluoreszierenden GFP-Anteil in seiner monomeren Ausgestaltung. Dieser Vergleich verdeutlicht die Sensitivität des Verfahrens.

Die Ergebnisse zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration des eingesetzten Protein-Konstrukts und dem Messsignal. Mit diesem Ausführungsbeispiel kann gezeigt werden, dass das erfindungsgemäße Verfahren dazu geeignet ist, das Protein-Konstrukt in seiner monomeren Ausgestaltung bis zu einer Konzentration von 100 fM bzw.  $6 \cdot 10^{-9}$  mg/ml zu detektieren und von der Negativkontrolle zu unterscheiden. Die Werte dieses Ausführungsbeispiels zeigen einen dynamischen Messbereich über 3 Log Stufen und eine Sensitivität im femtomolaren Bereich.

Auch dieses Ausführungsbeispiel zeigt, dass die Nachteile anderer Verfahren, wie der geringe dynamische Messbereich und eine maximale Sensitivität nur bis in den picomolaren Bereich, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren überwunden werden können.

Literaturquelle:

[11] Götzke H, et al. "The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bio-science applications". Nat Commun. 2019 Sep 27; 10(1):4403. doi: 10.1038/s41467-019-12301-7. PMID: 31562305; PMCID: PMC6764986.

## P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung von Bioindikatoren, umfassend folgende Schritte:

- 5 a) Immobilisieren von Fängermolekülen für die Bioindikatoren auf einem Substrat,  
b) In-Kontaktbringen der Bioindikatoren einer Probe mit den Fängermolekülen,  
c) Immobilisieren der Bioindikatoren auf dem Substrat durch Bindung an Fängermoleküle,  
d) In-Kontaktbringen der Bioindikatoren mit Sonden, die mindestens ein Detektionsmolekül enthalten, und  
10 e) Entfernen von nicht spezifisch gebundenen Molekülen und Partikeln z. B. durch Waschen,  
f) Binden der Sonden an die Bioindikatoren,

wobei die Sonden in der Lage sind, ein spezifisches Detektionssignal zu emittieren und die Schritte b) und d) gleichzeitig oder d) vor b) erfolgen können und wobei Sonden und Fängermoleküle eingesetzt werden, die affine Moleküle oder Molekülteile aufweisen, die an wenigstens eine spezifische Bindungsstelle der Bioindikatoren binden und diese affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden und Fänger nicht untereinander überlappen.

- 20 2. Verfahren nach dem vorherigen Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, dass die affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden und/oder Fängermoleküle an wenigstens zwei spezifische Bindungsstellen der Bioindikatoren binden.
- 25 3. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass die affinen Moleküle oder Molekülteile der Sonden und/oder Fängermoleküle an wenigstens zwei spezifische Bindungsstellen

der Bioindikatoren binden, wobei diese Bindungsstellen der Sonden und/oder Fängermoleküle an wenigstens zwei identische Bindungsstellen eines Bioindikators binden und/oder an wenigstens zwei unterschiedliche Bindungsstellen von wenigstens zwei unterschiedlichen Bioindikatoren binden.

- 5      4. Verfahren nach dem vorherigen Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
durch In-Kontaktbringen der Bioindikatoren mit den Fängermolekülen, diese auf dem Substrat durch Bindung an die Fängermoleküle immobilisiert werden.
- 10     5. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
nach dem In-Kontaktbringen der Bioindikatoren mit den Sonden, nicht spezifisch gebundene Moleküle und Partikel durch Waschen entfernt werden.
- 15     6. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
Sonden gewählt werden, welche an die Bioindikatoren binden, wobei die Sonden in der Lage sind, ein spezifisches Signal zu emittieren.
- 20     7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Detektionsmoleküle der Sonden Fluorochrome, und/ oder fluoreszierende Proteine umfassen.
- 25     8. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
das In-Kontaktbringen der Bioindikatoren mit den Fängermolekülen und den Sonden gleichzeitig erfolgt.
9. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
das In-Kontaktbringen der Bioindikatoren mit den Sonden vor dem In-Kontaktbringen mit den Fängermolekülen erfolgt.

10. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe vor dem Binden der Sonden an die Bioindikatoren fixiert wird.
- 5 11. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass an Stelle von Sonden Quantumdots eingesetzt werden, die mit Fängermolekülen beschichtet sind, die affine Moleküle oder Molekülteile aufweisen, die an wenigstens eine spezifische Bindungsstelle der Bioindikatoren binden.
- 10 12. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe mit Detergenzien behandelt wird.
13. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine orts aufgelöste Bestimmung des Sondersignals erfolgt.
- 15 14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat Kunststoff, Silizium oder Siliziumdioxid oder bevorzugt Glas umfasst.
- 20 15. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat vor dem Immobilisieren von Fängermolekülen auf dem Substrat eine hydrophile Oberfläche aufweist.
- 25 16. Verfahren nach vorherigem Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophile Schicht ausgewählt wird aus der Gruppe enthaltend oder bestehend aus PEG, Poly-Lysin und Dextran oder Derivate hiervon.
- 30 17. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Funktionalisierung mit Aminogruppen durch in Kontaktbringen des Substrats mit APTES (3-Aminopropyltriethoxysilan) oder Ethanolamin erfolgt.

18. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das In-Kontaktbringen des Substrats mit APTES (3-Aminopropyltriethoxysilan) in der Gasphase erfolgt.
- 5 19. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Fängermoleküle kovalent an das Substrat oder an die Beschichtung gebunden sind.
- 10 20. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Bindungsstellen der Bioindikatoren mehrspezifische, vorzugsweise wenigstens bi-spezifische Epitope sind und die affinen Moleküle oder Molekülteile der Fängermoleküle und/oder Sonden mehrspezifische, vorzugsweise wenigstens bi-spezifische, Antikörper oder Teile derselben sind.
- 15 21. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind.
- 20 22. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion mittels ortsauflösender Fluoreszenzmikroskopie erfolgt.
23. Verwendung des Verfahrens nach einem der vorangehenden Ansprüche zum Nachweis einer Erkrankung.
- 25 24. Verwendung des Verfahrens nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Überwachung von Therapien mit Bioindikatoren und/oder der Überprüfung der Wirksamkeit von Wirkstoffen und /oder Heilverfahren oder zur Bestimmung, ob eine Person in eine klinische Studie aufgenommen wird.
- 25 25. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorherigen Ansprüche, enthaltend:
- Substrat,

- Fänger-moleküle;
- Sonden-moleküle

5 26. Kit nach vorhergehendem Anspruch, enthaltend Qdots an Stelle von Sonden, wobei die Qdots mit Fänger-molekülen beschichtet sind, die affine Moleküle oder Molekülteile aufweisen, die an wenigstens eine spezifische Bindungsstelle der Bioindikatoren binden.

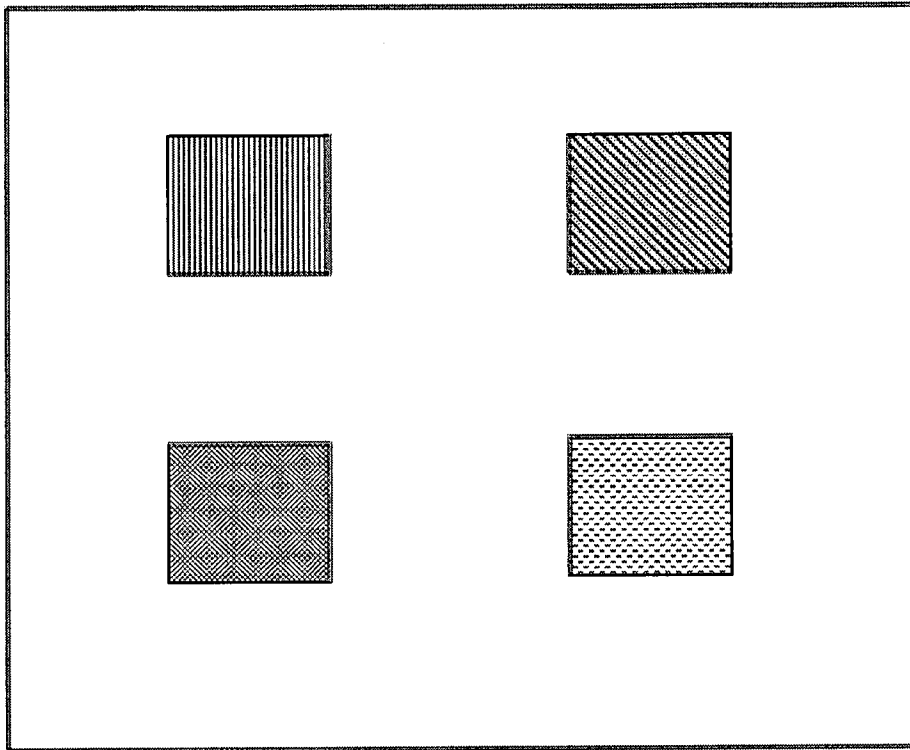


Fig. 1

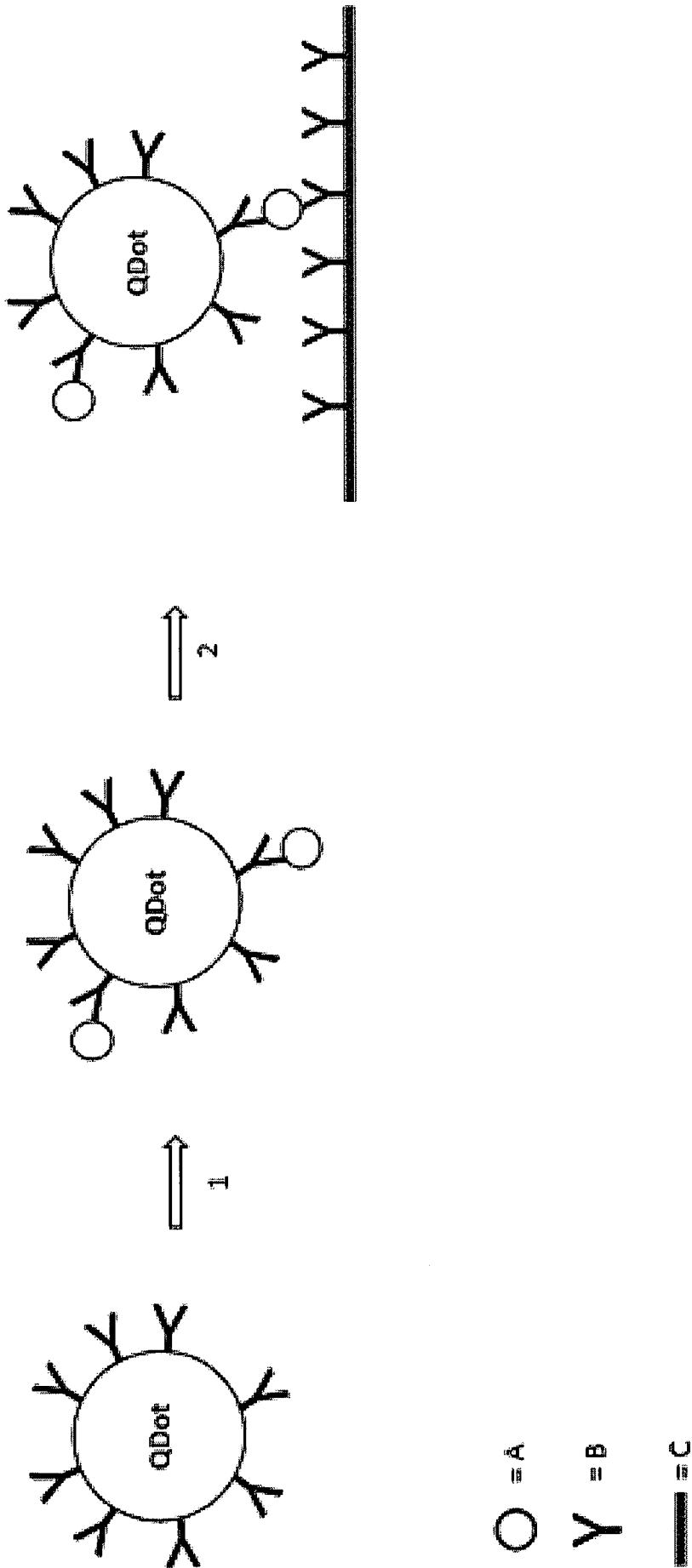


Fig. 2

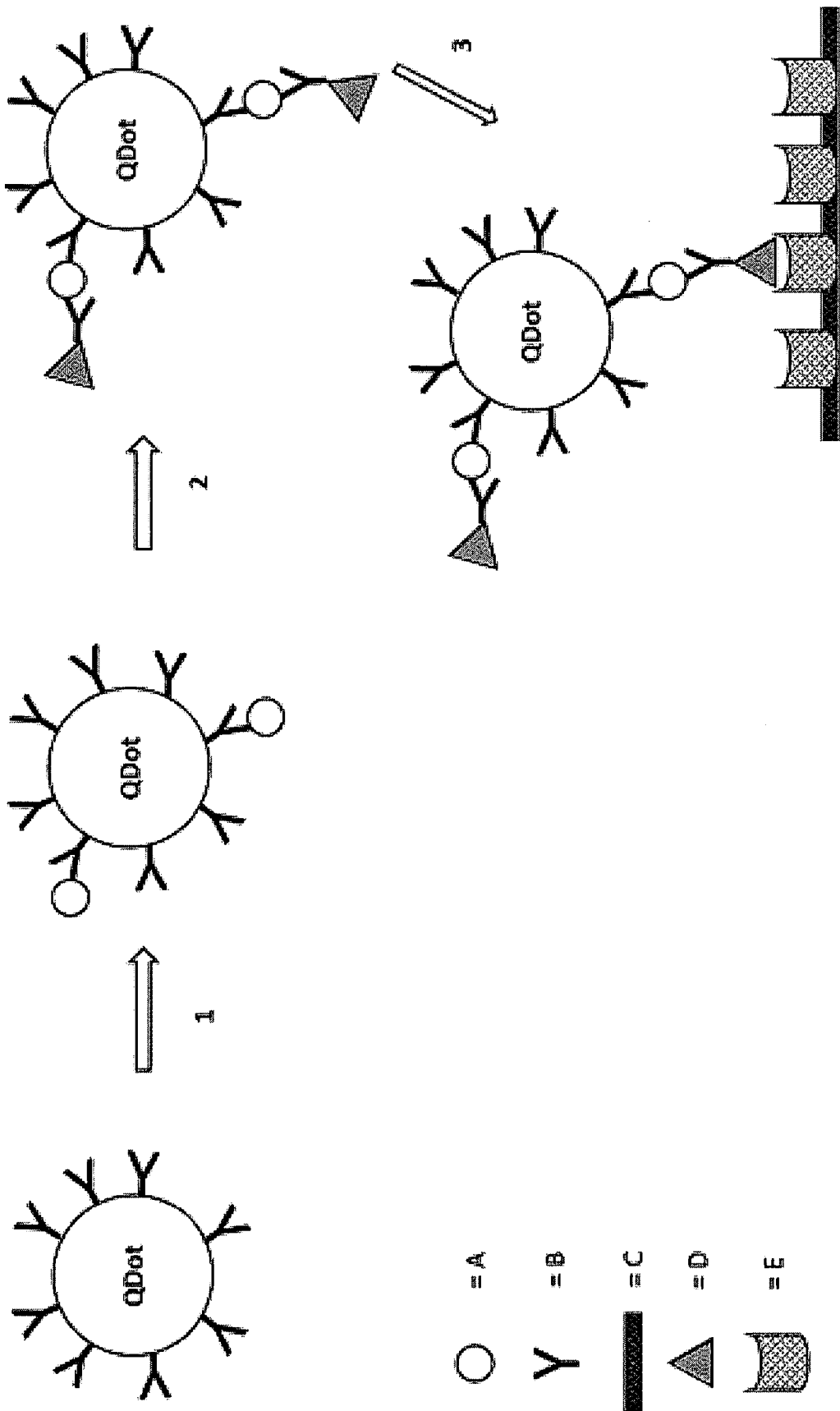


Fig. 3

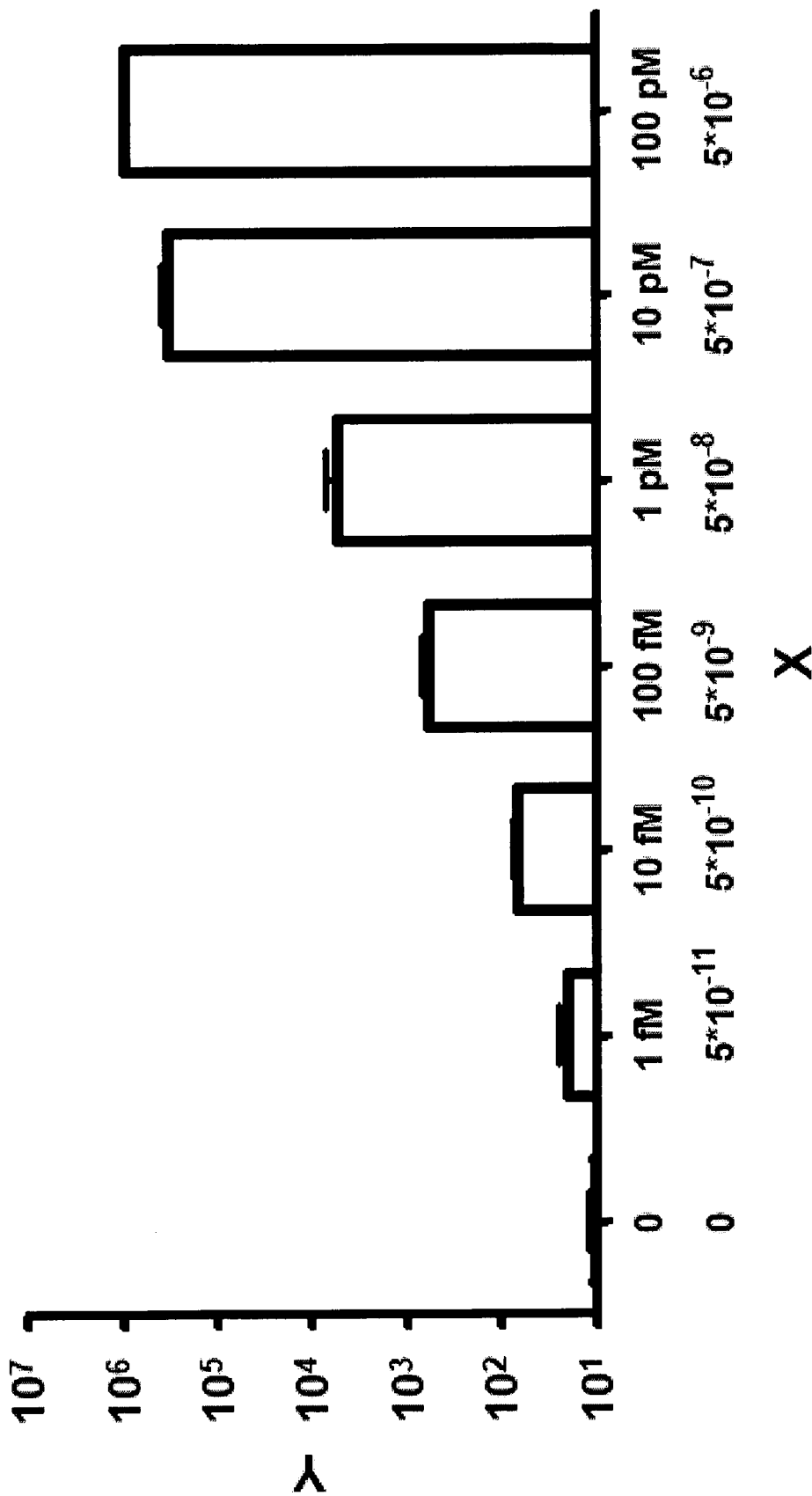


Fig. 4

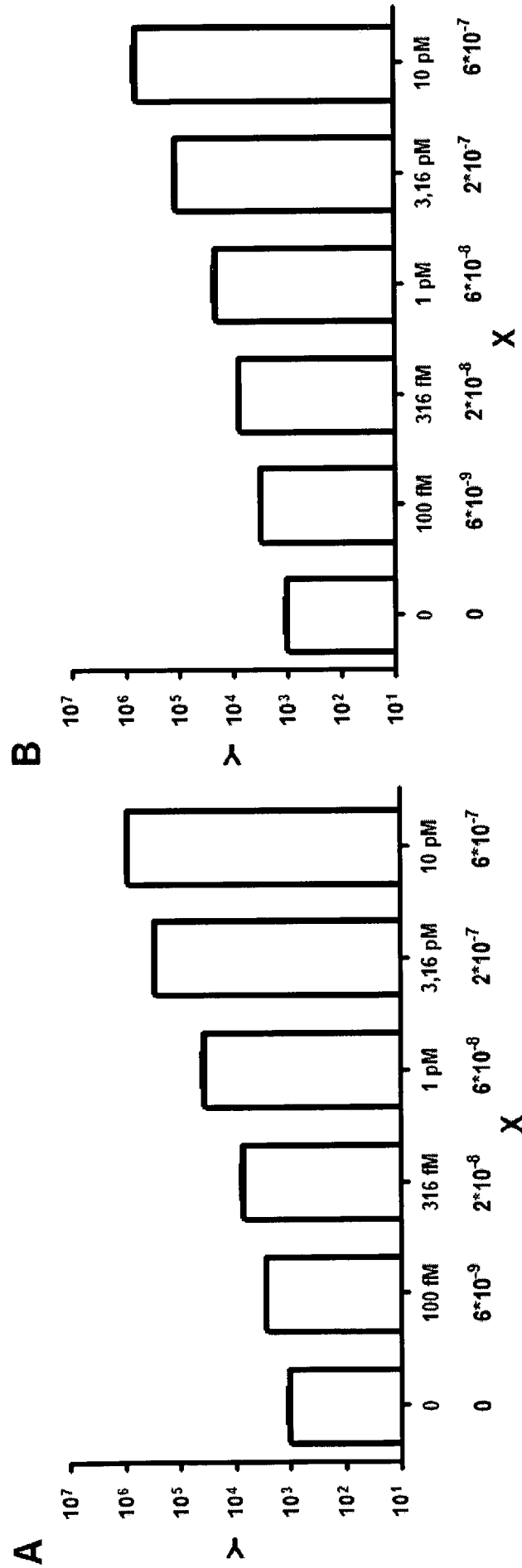


Fig. 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/DE2021/000084**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>G01N 33/543</b> (2006.01)i		
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) G01N		
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, EMBASE, WPI Data		
<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	K. M. KOCZULA ET AL. "Lateral flow assays" <i>ESSAYS IN BIOCHEMISTRY</i> , GB, Vol. 60, No. 1, 30 June 2016 (2016-06-30), pages 111-120 DOI: 10.1042/EBC20150012 ISSN: 0071-1365, XP055530708 the whole document, in particular abstract, pages 111-115, 117; figures 2-4;	1-13,19,21,23-26
X	GANGULY ADVAITA ET AL. "Development of an ultrasensitive hetero-sandwich ELISA assay based on bispecific monoclonal antibody for the detection of dengue NS1 protein" <i>JOURNAL OF PHARMACY RESEARCH</i> , India, Vol. 7, No. 5, 01 May 2013 (2013-05-01), pages 374-380 DOI: 10.1016/j.jopr.2013.05.013 ISSN: 0974-6943, XP055834441	1-10,12-15,20,23-25
Y	the whole document, in particular abstract; page 377, column 1, paragraph 2; page 377, column 2 - page 378, column 1, bridging paragraph; figure 5	14-19,22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>26 August 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>03 September 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/EP <b>European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands</b> Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer <b>Chrétien, Eva Maria</b>  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE2021/000084

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KULAWIK ANDREAS ET AL. "method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases" <i>FEBS LETTERS</i> , NL, Vol. 592, No. 4, 01 February 2018 (2018-02-01), pages 516-534, Retrieved from the Internet: <a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1002/1873-3468.12983">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1002/1873-3468.12983</a> [retrieved on 2021-08-25] DOI: 10.1002/1873-3468.12983 ISSN: 0014-5793, XP055834454 the whole document, in particular page 524, column 2, paragraphs 1-3; page 524, column 2, bridging paragraph - page 525, column 2, paragraph 1; figure 3	14-19,22
X	WO 2010003227 A1 (AMORFIX LIFE SCIENCES LTD [CA]; LEHTO MARTY [CA] ET AL.) 14 January 2010 (2010-01-14)	1-14,19,21,23-26
Y	the whole document, in particular page 13, line 12 - page 14, line 13; page 16, lines 21-25; page 18, lines 8-17; examples 1, 2	14-19,22
X	WO 2013138763 A1 (SANDIA NAT LAB [US]) 19 September 2013 (2013-09-19)	1-8,10-14,19,21,23-26
Y	the whole document, in particular claims 12-17; paragraphs 4, 5, 26, 34, 35, 38-40; figures 1, 3	14-19,22
X	DE 102013106713 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE]) 31 December 2014 (2014-12-31)	1-26
Y	the whole document, in particular claim 15, paragraphs 1, 38-40, 61-72, 77-83, 92-95, 105-117	14-19,22
X	DE 102017005543 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH [DE]) 13 December 2018 (2018-12-13)	1-26
Y	the whole document, in particular claims 1-20; paragraphs 3-5, 51, 72-74	14-19,22
A	DE 102011057021 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH [DE]) 27 June 2013 (2013-06-27) the whole document	1-26
A	DE 102017010842 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH [DE]) 23 May 2019 (2019-05-23) the whole document	1-26
A	DE 102017010455 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH [DE]) 13 December 2018 (2018-12-13) the whole document	1-26
A	DE 102016121455 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH [DE]) 09 May 2018 (2018-05-09) the whole document	1-26

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/DE2021/000084**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2010003227	A1	14 January 2010	NONE	
WO	2013138763	A1	19 September 2013	US 2014154816 A1	05 June 2014
				US 2015125346 A1	07 May 2015
				WO 2013138763 A1	19 September 2013
DE	102013106713	A1	31 December 2014	CN 105358978 A	24 February 2016
				DE 102013106713 A1	31 December 2014
				EP 3014279 A2	04 May 2016
				JP 6478987 B2	06 March 2019
				JP 2016524151 A	12 August 2016
				US 2016161481 A1	09 June 2016
				WO 2014207049 A2	31 December 2014
DE	102017005543	A1	13 December 2018	CN 110869764 A	06 March 2020
				DE 102017005543 A1	13 December 2018
				EP 3639024 A1	22 April 2020
				JP 2020523555 A	06 August 2020
				US 2020200740 A1	25 June 2020
				WO 2018228625 A1	20 December 2018
DE	102011057021	A1	27 June 2013	BR 112014015392 A2	24 September 2019
				CA 2858125 A1	27 June 2013
				CN 104080807 A	01 October 2014
				DE 102011057021 A1	27 June 2013
				EP 2794655 A2	29 October 2014
				IL 232870 A	30 June 2020
				JP 6625709 B2	25 December 2019
				JP 2015502551 A	22 January 2015
				JP 2019015738 A	31 January 2019
				RU 2014130136 A	10 February 2016
				US 2015024512 A1	22 January 2015
				WO 2013092952 A2	27 June 2013
DE	102017010842	A1	23 May 2019	CN 111527409 A	11 August 2020
				DE 102017010842 A1	23 May 2019
				EP 3714274 A1	30 September 2020
				JP 2021504675 A	15 February 2021
				US 2020319208 A1	08 October 2020
				WO 2019101250 A1	31 May 2019
DE	102017010455	A1	13 December 2018	CN 110832323 A	21 February 2020
				DE 102017010455 A1	13 December 2018
				EP 3639030 A1	22 April 2020
				JP 2020523554 A	06 August 2020
				US 2020200748 A1	25 June 2020
				WO 2018228622 A1	20 December 2018
DE	102016121455	A1	09 May 2018	CN 110168368 A	23 August 2019
				DE 102016121455 A1	09 May 2018
				EP 3538890 A1	18 September 2019
				JP 2020500307 A	09 January 2020
				WO 2018087236 A1	17 May 2018

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 INV. G01N33/543  
 ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
 G01N

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, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	K. M. KOCZULA ET AL: "Lateral flow assays", ESSAYS IN BIOCHEMISTRY., Bd. 60, Nr. 1, 30. Juni 2016 (2016-06-30), Seiten 111-120, XP055530708, GB ISSN: 0071-1365, DOI: 10.1042/EBC20150012 gesamtes Dokument, besonders Zusammenfassung, S. 111-115, 117; Fig. 2-4; ----- -/--	1-13,19, 21,23-26



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

26. August 2021

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

03/09/2021

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

Chrétien, Eva Maria

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GANGULY ADVAITA ET AL: "Development of an ultrasensitive hetero-sandwich ELISA assay based on bispecific monoclonal antibody for the detection of dengue NS1 protein", JOURNAL OF PHARMACY RESEARCH, Bd. 7, Nr. 5, 1. Mai 2013 (2013-05-01), Seiten 374-380, XP055834441, India ISSN: 0974-6943, DOI: 10.1016/j.jopr.2013.05.013	1-10, 12-15, 20,23-25
Y	gesamtes Dokument, besonders Zusammenfassung; S. 377, Sp. 1, Par. 2; S. 377, Sp 2 - S. 378, Sp. 1, überbrückender Par.; Fig. 5	14-19,22
Y	----- KULAWIK ANDREAS ET AL: "method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases", FEBS LETTERS, [Online] Bd. 592, Nr. 4, 1. Februar 2018 (2018-02-01), Seiten 516-534, XP055834454, NL ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1002/1873-3468.12983 Gefunden im Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1873-3468.12983> [gefunden am 2021-08-25] gesamtes Dokument, besonders S. 524, Sp. 2, Par. 1-3; S. 524, Sp. 2, überbrückender Par. - S. 525, Sp. 2, Par. 1; Fig. 3	14-19,22
X	WO 2010/003227 A1 (AMORFIX LIFE SCIENCES LTD [CA]; LEHTO MARTY [CA] ET AL.) 14. Januar 2010 (2010-01-14)	1-14,19, 21,23-26
Y	gesamtes Dokument, besonders S. 13, Z. 12 - S. 14, Z. 13; S. 16, Z. 21-25; S. 18, Z. 8-17; Beispiel 1, 2	14-19,22
X	WO 2013/138763 A1 (SANDIA NAT LAB [US]) 19. September 2013 (2013-09-19)	1-8, 10-14, 19,21, 23-26
Y	gesamtes Dokument, besonders Anspruch 12-17; Par. 4, 5, 26, 34, 35, 38-40; Fig. 1, 3	14-19,22
X	DE 10 2013 106713 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE]) 31. Dezember 2014 (2014-12-31)	1-26
Y	gesamtes Dokument, besonders Anspruch 15, Par. 1, 38-40, 61-72, 77-83, 92-95, 105-117	14-19,22
	----- -/--	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 10 2017 005543 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH [DE]) 13. Dezember 2018 (2018-12-13)	1-26
Y	gesamtes Dokument, besonders Anspruch 1-20; Par. 3-5, 51, 72-74	14-19,22
A	----- DE 10 2011 057021 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH [DE]) 27. Juni 2013 (2013-06-27) das ganze Dokument	1-26
A	----- DE 10 2017 010842 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH [DE]) 23. Mai 2019 (2019-05-23) das ganze Dokument	1-26
A	----- DE 10 2017 010455 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH [DE]) 13. Dezember 2018 (2018-12-13) das ganze Dokument	1-26
A	----- DE 10 2016 121455 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH [DE]) 9. Mai 2018 (2018-05-09) das ganze Dokument	1-26
	-----	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2021/000084

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2010003227 A1	14-01-2010	KEINE	
WO 2013138763 A1	19-09-2013	US 2014154816 A1 US 2015125346 A1 WO 2013138763 A1	05-06-2014 07-05-2015 19-09-2013
DE 102013106713 A1	31-12-2014	CN 105358978 A DE 102013106713 A1 EP 3014279 A2 JP 6478987 B2 JP 2016524151 A US 2016161481 A1 WO 2014207049 A2	24-02-2016 31-12-2014 04-05-2016 06-03-2019 12-08-2016 09-06-2016 31-12-2014
DE 102017005543 A1	13-12-2018	CN 110869764 A DE 102017005543 A1 EP 3639024 A1 JP 2020523555 A US 2020200740 A1 WO 2018228625 A1	06-03-2020 13-12-2018 22-04-2020 06-08-2020 25-06-2020 20-12-2018
DE 102011057021 A1	27-06-2013	BR 112014015392 A2 CA 2858125 A1 CN 104080807 A DE 102011057021 A1 EP 2794655 A2 IL 232870 A JP 6625709 B2 JP 2015502551 A JP 2019015738 A RU 2014130136 A US 2015024512 A1 WO 2013092952 A2	24-09-2019 27-06-2013 01-10-2014 27-06-2013 29-10-2014 30-06-2020 25-12-2019 22-01-2015 31-01-2019 10-02-2016 22-01-2015 27-06-2013
DE 102017010842 A1	23-05-2019	CN 111527409 A DE 102017010842 A1 EP 3714274 A1 JP 2021504675 A US 2020319208 A1 WO 2019101250 A1	11-08-2020 23-05-2019 30-09-2020 15-02-2021 08-10-2020 31-05-2019
DE 102017010455 A1	13-12-2018	CN 110832323 A DE 102017010455 A1 EP 3639030 A1 JP 2020523554 A US 2020200748 A1 WO 2018228622 A1	21-02-2020 13-12-2018 22-04-2020 06-08-2020 25-06-2020 20-12-2018
DE 102016121455 A1	09-05-2018	CN 110168368 A DE 102016121455 A1 EP 3538890 A1 JP 2020500307 A WO 2018087236 A1	23-08-2019 09-05-2018 18-09-2019 09-01-2020 17-05-2018