



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 30 688 T2** 2004.09.23

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 837 949 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 30 688.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/09869**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 923 261.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/039534**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.06.1996**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **12.12.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.04.1998**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **12.11.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.09.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12Q 1/32**

**C12N 9/04, G01N 21/64, G01N 21/76,**

**C12Q 1/00, G01N 33/535, G01N 21/66**

(30) Unionspriorität:

**467712                      06.06.1995                      US**

(73) Patentinhaber:

**IGEN International Inc., Gaithersburg, Md., US**

(74) Vertreter:

**Schwabe, Sandmair, Marx, 81677 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**MARTIN, T., Mark, N. Bethesda, US**

(54) Bezeichnung: **ELEKTROCHEMILUMINESZENTE ENZYMBIOSENSOREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****HINTERGRUND DER ERFINDUNG****1. Gebiet der Erfindung**

[0001] Das technische Gebiet ist analytische Biochemie, insbesondere als sie sich auf Diagnostik bezieht. Genauer schließt die Erfindung die Zubereitung und Verwendung neuer enzym-basierter Biosensoren ein, welche die nützlichen Eigenschaften einer maßgeschneiderten Dehydrogenase mit einem auf Elektrochemolumineszenz (ECL) basierenden Testformat vermischt, um einen spezifischen Analyten oder spezifische Analyten zu detektieren und zu quantifizieren unter Verwendung gewöhnlicher Biosensoranordnungen.

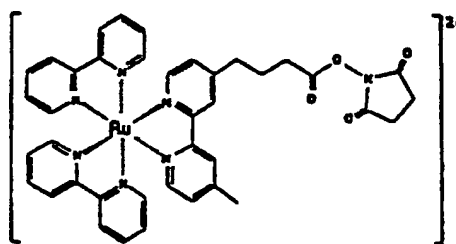
**2. Hintergrundinformation**

[0002] Biosensoren enthalten Biomoleküle, wie z. B. Enzyme oder Antikörper, oder Ganzzelltester. Biosensoren können für den schnellen Echtzeit-Nachweis von Materialien in Umwelt- und/oder klinischen Proben verwendet werden. Die vorliegende Biosensor-Erfindung schließt die Schaffung von enzym-co-enzym-elektrochemolumineszenzmarkierten Konjugaten ein. Ihre Entwicklung spiegelt eine multidisziplinäre Anstrengung wider. Der Hintergrund der relevanten technologischen Gebiete wird nachfolgend diskutiert.

[0003] Assays, die auf Elektrochemolumineszenz (ECL) basieren, sind im Stand der Technik wohl bekannt und finden sich ausdehnende Anwendungen wegen ihrer Genauigkeit, der Leichtigkeit der Verwendung und der Freiheit von radioaktiven Materialien.

[0004] Ein besonders nützliches ECL-System ist beschrieben in einer Veröffentlichung von Yang et al., Bio/Technology, 12, S. 193–194 (Feb. 1994). Siehe auch eine Veröffentlichung von Massey, Biomedical Products, Oktober 1992, ebenso wie die US-Patente 5,235,808 und 5,310,687.

[0005] ECL-Vorgänge wurden für viele unterschiedliche Moleküle durch zahlreiche unterschiedliche Mechanismen nachgewiesen. In Blackburn et al. (1991) Clin. Chem. 37/9, S. 1534–1539, verwendeten die Autoren die ECL-Reaktion von Ruthenium(II)-tris(bipyridyl),  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  mit Tripropylamin (TPA) (Leland et al. (1990), J. Electrochem. Soc., 137: 3127–31), um die Technik zu demonstrieren. Salze von  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  sind sehr stabile, wasserlösliche Verbindungen, die chemisch mit reaktiven Gruppen an einem der Bipyridilliganden modifiziert werden können, um aktivierte Spezies zu bilden, mit denen Proteine, Haptene und Nukleinsäuren leicht markiert werden. Die aktivierte Form des durch Blackburn et al. verwendeten  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  war der  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS-Ester:



[0006] Die Schaffung maßgeschneiderter Enzymkonjugate ist ein in der Entwicklung befindliches Gebiet, insbesondere in dem klinischen biochemischen Bereich. Ebeling et al. (US-Patent Nr. 5,250,415) verwendete rekombinante Techniken, um die Qualität und Stabilität von NAD/NADP und abhängiger Glucosedehydrogenase (E.C. 1.1.1.42) zu erhöhen. Durch die Verwendung von rekombinanten Techniken wurden Isoenzyme in hoher Qualität hergestellt und die Enzyme zeigen eine vergleichsweise Stabilität über den Temperaturbereich zwischen 20 und 50°C. Die Enzyme werden offenbart als geeignet für die Verwendung als medizinische diagnostische Anwendungen.

[0007] Die Schaffung semi-synthetischer Glucoseoxidase, welche die Bildung von Enzymkonjugaten mit gekoppelten regenerativen Einheiten einschließt, wurde durch gewisse Forschergruppen mit einigem Erfolg angestrebt. Siehe Yomo et al., "Preparation and Kinetic Properties of 5-ethylphenazine-glucose-dehydrogenase-NAD<sup>+</sup> conjugate, A Semi-Synthetic Glucose Oxidase", European J. Biochem. (Deutschland), (15. September 1991), Band 200(3), S. 759–66. Ein 5-Ethylphenazin-Glucose-Dehydrogenase-NAD<sup>+</sup>-Konjugat (EP(+)-Glc DH-NAD<sup>+</sup>) wurde zubereitet durch Koppeln von sowohl Poly(ethylenglycol)-gebundenem 5-Ethylphenazin und Poly(ethylenglycol)-gebundenem NAD<sup>+</sup> an Glucosedehydrogenase. Dieses Konjugat ist ein semi-synthetisches Enzym mit Glucoseoxidaseaktivität unter Verwendung von Sauerstoff oder 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-Diphenyl-21t-tetrazoliumbromid (MTT) als ein Elektronenakzeptor. Die semi-synthetische Oxidase hat zwei katalytische Schritte: Reduktion der NAD<sup>+</sup>-Einheit durch das aktive Zentrum der Glucosedehydrogenaseeinheit und Oxidation der NADH-Einheit durch eine andere katalytische Stelle der Ethylphenazineinheit.

[0008] Das selektive Markieren von Aminogruppen in Proteinen, wie z. B. Beta-D-Glucose: NAD(P<sup>+</sup>)-1-Oxidoreduktasen (EC 1.1.1.47) wurde gezeigt. Bozler et al. (Biochim. Biophys. Acta, Band 749, Nr. 3, S. 238–43) markierten Glucosedehydrogenase selektiv an einer Lysingruppe mit (2-5<sup>1</sup>-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonamid)methylaminsäuremethylester. Der Ester wurde synthetisiert für den Zweck der Fluoreszenzmarkierung von Aminogruppen von Proteinen. Der Einbau der Dansylgruppe diente als eine äußere Fluoreszenzsonde, die spektrophotometrisch bestimmt werden kann.

[0009] Biosensoren sind ein kontinuierlich wachsendes Gebiet der Technologie. Der Begriff Biosen-

sor umfasst einen weiten Bereich an Technologien und spiegelt multidisziplinäre Anstrengungen wider. Es gibt einen fortdauernden Bedarf auf diesem Gebiet für die Steigerung der Sensitivität, Verlässlichkeit und Schnelligkeit.

[0010] Ein gemeinsamer Faden der Biosensor-Technologie ist die Verwendung eines biologischen Materials bei der Messung des Analyten. Dies ist eine eher umfassende Definition.

[0011] Ein repräsentativer Text auf diesem Gebiet, der die Mischung von Technologien erläutert, ist Biosensor Design and Application, herausgegeben von Paul R. Mathewson und John W. Finley, der 1992 durch die American Chemical Society, Washington, D. C., veröffentlicht wurde.

[0012] Biosensoren können zusätzlich zu dem erforderlichen biologischen Molekül eine Reihe an Messsystemen einschließen, z. B. ein Elektroden-system, das eine Messelektrode und ein Lumineszenzzählgerät umfasst, worin die Reaktionsschicht das Elektroden-system kontaktiert. Die Reaktionsschicht umfasst typischerweise einen Ein-Molekül-Elektronenakzeptor, ein Messenzym und einen chemolumineszenten Sensor. Die Verschiedenheit von Biosensorsystemen ist belegt durch die Vorrichtungen, wie z. B. jene, die in den US-Patenten mit den Nummern 5,324,835, 5,229,202 und 5,384,028 erläutert sind.

[0013] Glucose-Biosensoren, die stabile gemessene Ergebnisse ohne NAD-Verbrauch ergeben, sind bekannt. Solche Biosensoren sind nützlich für die qualitative oder quantitative Bestimmung von einem oder mehreren Bestandteilen in einer flüssigen Mischung durch die elektrochemische Regeneration von Co-Enzym. Typischerweise umfasst solch eine Elektrode ein Redox-Polymer, das auf der Oberfläche der Elektrode absorbiert ist, ein oder mehrere Enzyme, worin wenigstens eines eine Dehydrogenase ist, und ein Co-Enzym, wie z. B. NADH, NADPH oder deren Analoga. Siehe Gordon et al., US-Patent Nr. 5,264,092.

[0014] Ein anderer Ansatz ist in dem US-Patent Nr. 5,340,722 (Wolfbeis et al.) belegt, der eine kontinuierliche und umkehrbare Bestimmung lehrt unter Verwendung eines Biosensors, der ein Flavin-Co-Enzym (FMN, FAD), Oxidasen und Oxygenasen einschließt. Der Nachweis ist fluoreszenz-basiert. Während der enzymatischen Oxidation geht das Co-Enzym gleichzeitig in eine reduzierte Form über, die dann unmittelbar in die oxidierte Form mittels Sauerstoff zurückgewandelt wird. Der Übergang von der oxidierten Form zur reduzierten Form ist an eine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften gekoppelt, die als der analytische Parameter dient.

[0015] Die WO-A-96/28538 offenbart eine Kassette zum Durchführen von ECL-Reaktionen und -Assays, die eine Vielzahl an einzelnen Bindedomänen umfassen, die auf einem Trägermaterial immobilisiert sind, wobei die einzelnen Bindedomänen räumlich mit einer oder mehreren Elektroden- und einem oder meh-

reren Gegenelektrodenpaaren angeordnet sind.

[0016] Persson et al., Bio/Technology, März 1991, Band 9, S. 280–284, offenbaren das kovalente Kopeln eines NAD-Analogs an Glucosedehydrogenase von *Bazillus subtilis*.

[0017] Die US-A-5,310,687 beschreibt Verbindungen, die geeignet sind für die Verwendung als Zwischenprodukte für das Anhängen einer lumineszenten Ruthenium oder Osmium enthaltenden Markierung an Aminogruppen biologischer oder biochemischer Substanzen und Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit dieser Einheiten, ebenso wie die Verwendung solcher Konjugate, um Analyten in homogenen oder heterogenen Ansätzen nachzuweisen.

[0018] Mansson et al., Eur. J. Biochem., 1978, Band 86, S. 455–463, offenbart ein kovalent gebundenes NAD-Analog-Leberalkoholdehydrogenase-Konjugat.

[0019] Es besteht immer noch ein Bedarf für die weitere Verbesserung der Wirtschaftlichkeit, Zuverlässigkeit, Empfindlichkeit und Ansprechempfindlichkeit von Biosensoren.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0020] Breit festgestellt, betrachtet die Erfindung einen auf Elektrochemolumineszenz basierenden Nachweis unter Verwendung eines Biosensors mit einer Dehydrogenase, die modifiziert wurde, um TAG und den gewünschten Nucleotid-Co-Faktor (Co-Enzym) in der Nähe des aktiven Zentrums richtig zu positionieren. Solches Positionieren erhöht die Reaktionszeit und verbessert die Energieeffizienz des Systems, was die Genauigkeit, Geschwindigkeit und Zuverlässigkeit und Ähnliches für den Nachweis von Enzymen oder ihren Substraten und Co-Faktoren verbessert.

[0021] Aufgabe der Erfindung ist, sowohl die Empfindlichkeit und Spezifität ECL-basierter Assays zu erhöhen als auch den Verbrauch des Reagens zu bewahren.

[0022] Der überwachte oder nachgewiesene Analyt ist entweder das Substrat einer Dehydrogenase oder eine Substanz, die in das Substrat einer Dehydrogenase umgewandelt werden kann. Die Dehydrogenase ist das Molekül, welches das Messen des Analyten durch ein ECL-Messgerät erlaubt. Man stellt sich auch vor, dass das Biosensor-Molekül der Erfindung in Verbindung mit einem anderen Enzym oder Enzymsystem verwendet werden kann, das ein Produkt herstellt, welches durch das Biosensor-Molekül gemessen wird. Dies würde den Anwendungsbereich weiter erhöhen.

[0023] Die Dehydrogenase ist nicht in ihrer natürlichen Form vorhanden, sondern wurde eher chemisch modifiziert, so dass sie zwei unnatürliche Anhänge hat. Ein Anhang ist ein kovalent angehängtes funktionelles Analog von NAD(P)<sup>+</sup>, NAD(P)H. Solche Enzyme wurden hergestellt (Persson et al. 1991). Dieser Nikotinamid-Co-Faktor ist spezifisch auf ei-

nem Weg angehängt, dass es an das aktive Zentrum des Enzyms binden kann und als ein Redox-Reaktionspartner als Teil des natürlichen Enzymmechanismus dienen kann. Der zweite Anhang ist eine ECL-Markierung, wie z. B. ein Derivat von  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . Solche Proteine wurden hergestellt (Blackburn et al. 1991).

[0024] Demgemäß stellt die vorliegenden Erfindung ein Oxidoreduktasekonjugat bereit, das in der Lage ist, ein elektrochemolumineszentes Signal zu erzeugen, umfassend einen Co-Faktor und eine elektrochemolumineszente Markierung, die gesondert in enger Nachbarschaft zu einem aktiven Zentrum der Oxidoreduktase gekoppelt ist auf eine Weise, die ihre elektrochemische Wechselwirkung miteinander und mit einem Substrat, das innerhalb des aktiven Zentrums enthalten ist, ermöglicht.

[0025] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren für die Bestimmung der Konzentration eines Enzymsubstrates in einer Probe bereit, das die Schritte umfasst:

- a) in Kontakt bringen dieser Probe, welche dieses Enzymsubstrat enthält, mit diesem Oxidoreduktasekonjugat unter Bedingungen, welche die Oxidation des Enzymsubstrates erlauben;
- b) Messen der Änderung der Elektrochemolumineszenz zu einem Basiswert, worin die Elektrochemolumineszenz durch einen spannungsabhängigen Vorgang erzeugt wird; und
- c) Bestimmen der Konzentration des enzymatischen Substrates, basierend auf der gemessenen Änderung in dem elektrochemolumineszenten Signal.

[0026] Die vorliegende Erfindung stellt zusätzlich ein Verfahren zum Messen der Anwesenheit eines Analyten bereit, umfassend:

- a) in Kontakt bringen einer Probe, die in Verdacht steht, den Analyten zu enthalten, mit einem Biosensor, der dieses Oxidoreduktasekonjugat umfasst;
- b) Aussetzen der in Kontakt gebrachten Probe von Schritt (a) an Bedingungen, die in Elektrochemolumineszenz resultieren;
- c) Messen der resultierenden Elektrochemolumineszenz, um einen Messwert zu erhalten; und
- b) Bestimmen der Konzentration des enzymatischen Substrates, basierend auf der gemessenen Änderung in dem elektrochemolumineszenten Signalmesswert.

[0027] Die vorliegende Erfindung stellt auch einen Kit bereit, der geeignet ist für das Durchführen eines elektrochemolumineszenten Assays, umfassend das Oxidoreduktasekonjugat und geeignete Puffersysteme.

[0028] Die vorliegende Erfindung stellt zusätzlich ein Verfahren zum Umwandeln eines Oxidoreduktase-substrates in seine oxidierte Form bereit, umfassend:

- a) in Kontakt bringen des Substrates mit diesem Oxidoreduktasekonjugat unter Bedingungen, welche die enzymatische Oxidation des Substrates fördern, und
- b) Wiedergewinnen des oxidierten Substrates.

[0029] Der Weg, auf dem der Biosensor arbeitet, ist wie folgt:

- (1) Der Analyt wird durch die  $\text{NAD}^+$ -Form des doppelt modifizierten Enzyms oxidiert, wodurch das Enzym dazu gebracht wird, in die NADH-Form umgewandelt zu werden.
- (2) In einem ECL-Messgerät wird Spannung an das Enzym angelegt, wodurch der NADH-Anhang dazu gebracht wird, oxidiert zu werden, durch Abgeben eines Elektrons an den lumineszenten, Ruthenium enthaltenden Anhang, der wiederum Licht emittiert (Downey et al. 1992). Als ein Ergebnis kehrt NADH zu  $\text{NAD}^+$  zurück, so dass ein zweites Analytmolekül oxidiert werden kann und der Zyklus wiederholt werden kann. Der Nachweis des Elektronenübergangs durch ruthenium-markierte Proteine wurde kürzlich durchgeführt (Pan et al. 1993; Wuttke et al.).

[0030] Einige Analyten (und ihre Enzyme), die nach dem obigen Mechanismus arbeiten, sind: Glucose (Glucosedehydrogenase), Ethanol (Alkoholdehydrogenase) und Lactat (Lactatdehydrogenase). Man fasst jedoch ins Auge, dass andere Oxidoreduktasen, wie z. B. jene, die auf den Seiten 684–702 von Enzymes (Academic Press (1979)) durch M. Dixon und E. C. Webb aufgelistet sind, auch verwendet werden könnten. Ihre Auswahl hängt von der Stellung der Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums mit Seitenketten, die an entweder NAD- oder TAG-Einheiten durch eine geeignete Kopplungsgruppe, z. B. Ester, Thiolether etc., gekoppelt werden können, ab.

[0031] Die Hauptvorteile dieser Erfindung sind:

- (1) Eine mögliche hohe Empfindlichkeit und geringer Hintergrund. Die fixierte Art der Reaktionsteilnehmer (an einem einzelnen Molekül) ist wünschenswert wegen Entropie-Effekten; ihre wirksamen Konzentrationen relativ zueinander werden sehr hoch sein, was wesentlich bessere Ausbeuten (an Licht) ergeben wird, als wenn sie frei in Lösung wären.
- (2) Möglicherweise erniedrigte Analysekosten gegenüber demselben System, in welchem das Enzym, NADH und die Rutheniumverbindung frei in Lösung sind. Deswegen werden geringere Konzentrationen der Reaktionspartner Ergebnisse ergeben, die äquivalent sind zu Ergebnissen, die mit freien Reaktionspartnern erhalten werden, und auch da ein NADH-Molekül dem Kreislauf wieder zugeführt werden kann, werden die Analysekosten reduziert werden.
- (3) Das Kombinieren von drei Reagenzien in einem Molekül ist attraktiver für immobilisierte Sys-

teme. Es wäre äußerst attraktiv, in der Lage zu sein, Biosensoren zu immobilisieren, so dass sie erneut verwendet werden können. Falls das Enzym alleine immobilisiert wäre, müssten die anderen Reagenzien ( $\text{NADH}$  und  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ) für jede Analyse hinzugefügt werden. In dieser Erfindung könnten alle Reagenzien auf einem Wege immobilisiert werden, in dem sie funktionstüchtig wären.

[0032] Vorrichtungen, die Biosensor-Moleküle verwenden, verwenden das Molekül typischerweise in einem immobilisierten Zustand. Die Immobilisierung verschafft dem Molekül Stabilität und sichert seine fortwährende Anwesenheit in einem gewünschten Gebiet der Vorrichtung für eine optimale Durchführung. Typisch für die Techniken, die verwendet werden, um die Biosensor-Moleküle dieser Erfindung zu immobilisieren, sind jene, die auf den Seiten 3 bis 34 von *Methods of Enzymology*, Band 136 (1987), offenbart sind.

[0033] Derzeit ist eine bevorzugte Verwendung für die Glucosedehydrogenase der Erfindung eine solche als Glucosebiosensor. Eine funktionsfähige Glucosedehydrogenase wurde erzeugt, die ein immobilisiertes  $\text{NADH}$ -Molekül hat (Persson et al., 1991). Dieses modifizierte Enzym könnte man mit  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS-Ester (IGEN, Inc., Rockville, MD) durch gewöhnliche Mittel reagieren lassen, die verwendet werden, diese Verbindung an Oberflächenlysin anzuheften, die auf Antikörpern vorhanden sind (Blackburn et al., 1991). Eine solche Modifikation kann in einem oder mehreren Rutheniumanhängen resultieren (mehrfache Anhänge sind annehmbar oder sogar vorteilhaft, falls das Enzym aktiv bleibt). Das doppelt modifizierte Enzym könnte durch Dialyse oder Chromatographie gereinigt werden. Die Zugabe von Glucose, gefolgt von der Untersuchung in dem ECL-Messgerät (gewöhnliche Analyse auf  $\text{NADH}$ ), würde ein Lichtsignal ergeben, in Abhängigkeit von der Aktivität des Enzyms, welche wiederum von der Glucose-Konzentration abhängt.

[0034] Die Verbesserungen der Erfindung gegenüber dem Stand der Technik sind oben dargestellt. Sie schließen Empfindlichkeit, Kosten und Leichtigkeit der Immobilisierung ein. Eine höhere Empfindlichkeit (gegenüber vergleichbaren Untersuchungen, bei denen Ruthenium und der Nikotinamid-Co-Faktor nicht an die Dehydrogenase angeheftet sind), resultiert aus Vorteilen, die sich auf die intramolekulare Art der Elektronenübertragung beziehen (Pam Liang und Mark Martin, unveröffentlichte ECL-Ergebnisse).

[0035] Kosteneinsparungen werden aus der wieder verwendbaren Art des doppelt modifizierten Enzyms reduzieren (leichtere Wiedergewinnung im Gegensatz zu Wiedergewinnung und erneuter Verwendung des freien Enzyms, Rutheniumkomplex und Nikotinamid-Co-Faktors). Schließlich wäre es unpraktisch, alle drei Bestandteile auf einer festen Oberfläche in einer funktionstüchtigen Art und Weise separat zu im-

mobilisieren. Das Koppeln von allen dreien in ein funktionstüchtiges Molekül ermöglicht eine Festphasenimmobilisierung (und folglich Bequemlichkeit und reduzierte Kosten, um im Vergleich dazu, Enzym, Ruthenium und Co-Faktor frei in Lösung zu haben).

[0036] Vorgehensweisen, um  $\text{NAD}$ -markierte Glucosedehydrogenase herzustellen, sind bekannt. Da Dehydrogenasen eine ziemlich konservierte Gruppe an Enzymen sind, könnten ähnliche Verfahren für andere Dehydrogenasen verwendet werden. Vorgehensweisen, um Proteine zu markieren (gewöhnlich Antikörper) mit  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS-Ester (durch Lysine), sind ebenso wohl bekannt (IGEN, Inc., Technische Merkblätter).

[0037] Der Enzymbiosensor der Erfindung benötigt für die Verwendung ein ECL-Messgerät und eine Lösung, die einen Analyten enthält, wie z. B. Glucose. Eine, den Analyten enthaltende Lösung (wie z. B. Glucose) würde angemessen verdünnt werden, falls notwendig, und in Lösung mit Enzymbiosensor vermischt werden. Es gibt wenigstens zwei Wege, auf denen der Analyt gemessen werden könnte; nach fraktionierter Enzymumsetzung und durch Geschwindigkeitsmessungen in dem ECL-Messgerät. Für das fraktionierte Enzym-Umsetzungsverfahren würde die ECL nach einer vorbestimmten Zeitdauer gemessen werden, die geringer ist als die Zeit, die von allen Enzym-Molekülen benötigt wird, um eine Umsetzung zu vervollständigen. Falls die Analyten-Konzentration und die Zeit entsprechend angepasst werden, würden weniger als 100% der Enzym-Moleküle mit Glucose reagiert haben und weniger als die maximale ECL würde erzeugt werden. Basierend auf etablierten kinetischen Parametern für die Reaktion könnte die Glucose-Konzentration bestimmt werden. Alternativ könnte die Analyten-Konzentration bestimmt werden durch Geschwindigkeitsmessungen in dem Messgerät. Die Enzymreaktion könnte zur selben Zeit durchgeführt werden, zu der die ECL-Reaktion fortschreitet (wie z. B. durch Spannungsgabe), so dass  $\text{NADH}$  dem Kreislauf erneut aktiv zugeführt würde und eine Geschwindigkeitsmessung getätigt werden könnte.

[0038] Dasselbe System könnte verwendet werden, ohne die Reagenzien kovalent anzuheften. Alternativ könnte ein Nicht-ECL-System ohne Ruthenium verwendet werden (freies Enzym und freies  $\text{NAD(P)}^+$ ), wo die UV-Extinktion des erzeugten  $\text{NAD(P)H}$  spektrophotometrisch aufgenommen werden könnte.

[0039] Neue  $\text{NAD(P)H}$ -ähnliche Verbindungen könnten verwendet werden, die enzymatisch aktiv sind und auch ECL-aktiv sind. Ebenso könnten ECL-aktive, nicht Ruthenium enthaltende Lumiphore verwendet werden anstelle von  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ .

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0040] Der Mechanismus der ECL-Anregung ist wie folgt. Der Analyt wird in der Anwesenheit des Biosen-

sormoleküls der Erfindung oxidiert, was den  $\text{NAD}^+$  enthaltenden Anhang dazu bringen, zu  $\text{NADH}$  umgewandelt zu werden.  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  (TAG) und  $\text{NADH}$  werden an der Oberfläche einer Goldelektrode oxidiert, wodurch  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  bzw.  $\text{NADH}^+$  gebildet werden. (In dieser Beschreibung werden  $\text{NAD}^+$  und TAG kovalent an die Dehydrogenase angehängt.) Das  $\text{NADH}^+$  verliert spontan ein Wasserstoffmolekül, wodurch  $\text{NAD}^+$  gebildet wird. Das  $\text{NAD}^+$ , ein starkes Reduktionsmittel, reagiert mit  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ , einem starken Oxidationsmittel, wodurch der angeregte Zustand des Nachweismittels  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$  gebildet wird. Der angeregte Zustand zerfällt in den Grundzustand durch einen normalen Fluoreszenzmechanismus, wodurch ein Photon emittiert wird mit einer Wellenlänge von 620 nm.

[0041] Organische Verbindungen, die geeignete elektrochemische Nachweismittel sind, schließen z. B. ein Rubren und 9,10-Diphenylanthracen. Viele organometallische Verbindungen sind geeignete elektrochemische Nachweismittel, von bevorzugter Verwendung sind jedoch Ru enthaltende Verbindungen, wie z. B. Ruthenium-II-tris-bipyridinchelat und Os enthaltende Verbindungen. Nachweismittel, die in der vorliegend offenbarten Erfindung nützlich sind, können im US-Patent 5,310,687 gefunden werden.

[0042] Diese Nachweismittel sind über lange Zeiträume stabil. Weiterhin sind die Nachweismittel sicher und vergleichsweise kostengünstig. Sie ergeben ein hoch charakteristisches Signal und kommen in der Natur nicht vor. Messungen, die auf der Lumineszenz solcher Nachweismittel basieren, sind empfindlich, schnell, reproduzierbar und verwenden eine einfache Messgeräteausrüstung. Das Signal wird wiederholt durch jedes Molekül des Nachweismittels erzeugt, wodurch die Empfindlichkeit, mit der diese Nachweismittel detektiert werden können, verstärkt wird. Auf die bevorzugten elektrochemolumineszenten Nachweismittel der vorliegenden Erfindung wird hierin gewöhnlich Bezug genommen als  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . Verschiedene Mengen dieses Nachweismittels oder seines Äquivalents können verwendet werden.

[0043] Es sollte auch festgestellt werden, dass diese Nachweismittel direkt in biologischen oder Nahrungsmittelproben verwendet werden können, ohne Vorbehandlung der Probe.

[0044] Die für die Bildung des angeregten Zustandes notwendige Energie entsteht aus der großen Differenz in den elektrochemischen Potenzialen von  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  und  $\text{NAD}^+$ . Der angeregte Zustand  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$  zerfällt durch einen normalen Fluoreszenzmechanismus, wobei ein Photon bei 620 nm emittiert wird. Dieser Vorgang regeneriert die Ausgangsform des  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , welches viele Male die Reaktionsfolge durchlaufen kann.

[0045] Jedes ECL-aktive Nachweismittel kann deswegen viele Photonen während jedem Messzyklus emittieren, wodurch der Nachweis verstärkt wird.

[0046] Die Quantifizierung des  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Nachweismittels kann leicht automatisiert werden mit ver-

gleichsweise unkomplizierter Messgeräteausrüstung. Das Herz eines Messgerätes ist die elektrochemische Durchflussmesszelle, welche die Arbeitselektroden und Gegenelektroden für die Initiierung der ECL-Reaktion enthält. Beide Elektroden sind aus Gold hergestellt, wobei jedoch andere Materialien mit unterschiedlichem Erfolg verwendet worden sind. Ein Potentiostat legt verschiedene Spannungswellenformen an die Elektroden an und eine einzelne Photomultiplerröhre (PMT) detektiert das während der ECL-Reaktion emittierte Licht. Eine Ag/AgCl-Referenzelektrode wird in den Flüssigkeitsweg stromabwärts der Durchflussmesszelle platziert und eine peristaltische Pumpe wird verwendet, um zahlreiche Flüssigkeiten durch die Durchflussmesszelle zu ziehen. In einer typischen Abfolge wird die Testflüssigkeit von einem Reagenzglas in die Durchflussmesszelle gezogen und das Detektionsmittel wird durch Anlegen einer Rampenspannung an die Elektroden und Messen des emittierten Lichts quantifiziert. Nach der Messung wird eine Reinigungslösung mit hohem pH-Wert in die Zelle für einen elektrochemischen Reinigungsvorgang gezogen. Eine konditionierende Lösung wird dann in die Zelle gezogen und eine Spannungswellenform wird angelegt, welche die Oberflächen der Elektroden in einem hoch reproduzierbaren Zustand hinterlässt, fertig für den nächsten Messzyklus.

[0047] Die ECL-Reaktion kann durch viele verschiedene Spannungswellenformen wirksam initiiert werden. Messungen des Arbeitselektrodenstroms und der ECL-Intensität werden durch das Anlegen einer Dreieckswelle an die Elektroden induziert. Die angelegte Spannung, wie angezeigt, ist tatsächlich die Spannung, die an der Ag/AgCl-Referenzelektrode gemessen wird und schließt die Wirkungen eines signifikanten, nicht kompensierten Widerstands ein; folglich ist die tatsächlich an der Arbeitselektrode angelegte Spannung wesentlich geringer als jene, die dargestellt ist. Die Dreieckswellenform steigt von 565 auf 2800 mV mit einer Geschwindigkeit von 750 mV/s und fällt dann mit derselben Geschwindigkeit auf 1000 mV ab. Der Strom, der in der Zelle fließt, ist primär das Ergebnis der Oxidation des Analyten und der Hydrolyse von Wasser. Die Oxidation von sowohl dem Analyten als auch  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  wird offensichtlich, wenn die angelegte Spannung ungefähr 1000 mV erreicht und eine Lumineszenz erzeugt. Die Intensität der Lumineszenz steigt mit der angelegten Spannung an, bis der Analyt an der Oberfläche der Elektrode verbraucht ist, was in einer abnehmenden Intensität resultiert. Die Intensität der beobachteten Lumineszenz ist groß genug, so dass sie leicht mit gewöhnlichen PMTs gemessen werden kann, welche entweder in Photonen zählenden oder Strommodi arbeiten.

[0048] Nachdem die Probe mit dem Biosensor in Kontakt gebracht wurde, wird die ECL-Messung durch Anlegen eines elektrischen Potenzials an der Arbeitselektrode durchgeführt. Dies ergibt von dem

emittierten Licht ein charakteristisches Signal. Eine vergleichsweise geringe Interferenz resultiert aus dem Hintergrund, verkörpert durch die anderen in der Probe oder in dem hinzugefügten Puffer anwesenden Materialien.

[0049] Demgemäß schließen das Messgerät und die Methodik, die für das Durchführen des Verfahrens dieser Erfindung geeignet sind, wie früher festgestellt, jene ein, die gezeigt sind in den US-Patenten mit den Nummern 5,068,088, 5,061,455, 5,093,268 und 5,147,806 und 5,221,605. Weiterhin schließen Elektrochemolumineszenz-Moleküle für die Verwendung in dem Messsystem als Nachweismittel jene zweizähligen, aromatischen, heterocyclischen und Stickstoff enthaltenden Liganden von Ruthenium und Osmium ein, die beschrieben sind in den US-Patenten mit den Nummern 5,310,687 und 5,310,687.

[0050] Reagenzienkits, welche die für die Durchführung der Nachweise notwendigen Materialien enthalten, können zusammengestellt werden, um die Handhabung zu erleichtern und die Standardisierung zu fördern. In den Kit einzuschließende Materialien können in Abhängigkeit von dem letztlichen Zweck variieren. Typischerweise würde der Kit das modifizierte Konjugat aus Enzym und mutiertem Protein, das an oder in der Nähe des aktiven Zentrums mit Co-Faktor und TAG markiert ist, notwendige Puffer und Standards einschließen. Der Kit kann auch ein Mess- oder Nachweis-Enzymsystem enthalten, in Abhängigkeit von der Anwendung. Die Standards können chemische Reagenzien sein oder (empirische) Daten in gedruckter oder elektronischer Form, die notwendig sind für die, für die Durchführung des Nachweises notwendige Kalibrierung.

#### Beispiel 1: Zubereitung eines NAD<sup>+</sup>-Alkoholdehydrogenase-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-Konjugats

[0051] Biokonjugate können hergestellt werden, in denen Dehydrogenasen kovalent sowohl an ein NAD<sup>+</sup>-Analog als auch ein Derivat von Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> gekoppelt sind. In diesen Fällen ist das Enzym nicht ein mutiertes Protein, sondern es ist eher das natürlich vorkommende Enzym-Molekül. Die Verwendung des natürlich vorkommenden Enzyms hat den Vorteil, dass keine Mutagenese benötigt wird, um das Konjugat herzustellen. Auf der anderen Seite kann in einigen Fällen die Zubereitung eines mutierten Enzyms bevorzugt sein oder notwendig sein wegen nicht zufrieden stellenden Positionen der natürlichen Aminosäureseitenketten, die mit dem NAD<sup>+</sup>-Analog oder dem Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-Derivat reagieren. Die natürlichen Aminosäuren, die mit den NAD<sup>+</sup> oder Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-Derivaten reagieren, können fehlen oder nicht richtig für entweder die Enzymreaktion (welche eine geeignete Position des NAD<sup>+</sup>-Analog im Verhältnis zu dem aktiven Zentrum des Enzyms benötigt) oder die ECL-Reaktion (welche eine geeignete Position des Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-Derivats benötigt im Verhältnis zu dem NAD<sup>+</sup>-Analog) positioniert sein.

Teil 1: Zubereitung des NAD-ADH-Konjugates (basierend auf M.-O. Mansson et al., Eur. J. Biochem., 86, 455–463 (1978)).

[0052] ADH (Pferdeleberalkoholdehydrogenase, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) wird in 50 mM Triethylamin, pH 7,5, dialysiert werden. Zu 5 mg des dialysierten Enzyms in 1,2 mL Triethylaminpuffer (4°C) (Enzym-Konzentration ungefähr 0,1 mM) wird jenes NAD<sup>+</sup>-Analog (N<sup>6</sup>-([6-Aminoethyl]-carbamoylmethyl)nikotinamidadenindinucleotid, Lithiumsalz, Sigma Chem. Co.) hinzugefügt werden in einer Endkonzentration von 5 mM. Pyrazol (Sigma Chem. Co.) wird hinzugefügt werden zu der Lösung in einer Konzentration von 10 mM. (Pyrazol stabilisiert den Enzym-NAD<sup>+</sup>-Komplex, so dass er reagieren kann (C. Woenckhaus et al., Bioorg. Chem. 12, 45–47 (1983).) Die Kopplungsmittel, 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) werden dann in 500-fachem und 250-fachem molaren Überschuss (im Vergleich zur Enzym-Untereinheit-Konzentration, das Enzym ist ein Dimer) hinzugefügt werden. EDC wird in vier gleichen Teilen in 12-stündigen Intervallen hinzugefügt werden und NHS in zwei gleichen Teilen bei 0 und 12 Stunden. Die Mischung lässt man für 48 Stunden reagieren, während welcher Zeit der pH-Wert bei 7,5 gehalten wird unter Verwendung von Zugaben von NaOH. Nach der Reaktion für 48 Stunden wird die Lösung über Nacht gegen 3,0 L 50 mM Glycin, 50 mM Natriumbicarbonat, pH 7,5, dialysiert werden. Die Lösung wird dann dreimal dialysiert (wenigstens 6 Stunden jedes Mal) gegen 3 L 50 mM Bicarbonat, pH 8,0.

Teil 2: Zubereitung eines NAD-ADH-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-Konjugates (basierend auf B. L. Plapp et al., J. Biol. Chem. 248, 3470–3475 (1973)).

[0053] Zu der oben zubereiteten Lösung des NAD-ADH-Konjugates (in 50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0) wird Pyrazol in einer Endkonzentration von 10 mM hinzugefügt werden und (normales) NAD<sup>+</sup> wird in einer Endkonzentration von 2 mM hinzugefügt werden. Aminogruppen außerhalb des aktiven Zentrums werden durch die Zugabe von 2,1 M Ethylacetimidat-HCl (Sigma Chem. Co.) acetimidyliert werden (das Volumen wird hinzugefügt, um die Enzymlösung um 5% zu erhöhen). (Eine Stammlösung von 2,1 M Ethylacetimidat wird frisch hergestellt werden und der pH-Wert wird auf 8,0 angepasst.) Der Reaktion wird ermöglicht, für eine Stunde bei 25°C fortzuschreiten, dann werden drei weitere Zugaben von Ethylacetimidat stündlich durchgeführt werden (Gesamtreaktionszeit = 4 Stunden). Das Protein wird dann ausgehend dialysiert werden, gegen 33 mM Natriumphosphat, 0,5 mM EDTA; 2,0 mM Adenosinmonophosphat, pH 8,0, dann gegen 0,2 M Natriumbicarbonat, pH 8,0. Das äußerlich lysin-geschützte NAD-ADH lässt man mit einem NHS-Esterderivat von Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (IGEN, Inc., Gaithersburg, MD) reagieren

durch etablierte Mittel. Nicht umgesetztes (freies)  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  wird durch Dialyse gegen einen neutralen Puffer entfernt werden. Bei Vergleich mit Literaturberichten wird nur ein  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  pro Enzym-Untereinheit eingebaut werden an Lys 228 (siehe Bränden et al., *Experientia Supplemental* 36, J. Jeffrey, Hrsg., *Dehydrogenases*, S. 62–3.).

#### Beispiel 2: Nachweise der katalytischen Aktivität von $\text{NAD}^+$ -ADH- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

[0054] Die Nachweise 1 und 2 basieren auf M.-O. Mansson et al., *Eur. J. Biochem.* 86, 455–463 (1978). Der Nachweis 3 ist der elektrochemolumineszente Nachweis, bei dem die enzymatische Umsetzung von Ethanol durch das  $\text{NAD}^+$ -ADH- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Konjugat von Lichtemission begleitet wird.

#### Nachweis 1: spektrophotometrisch, nicht regenerierender Nachweis

[0055] Dieser Nachweis wird immobilisiertes  $\text{NAD}^+$ -Analog zu dem NADH-Analog reduzieren. Die Umkehrreaktion wird sich nicht ereignen (der Nachweis ist nicht regenerierend). Der Anstieg der Extinktion bei 340 nm wird die Konzentration des immobilisierten  $\text{NAD}^+$ -Analoges anzeigen ( $\Delta\epsilon_{340} = 6220 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

[0056] In einer Küvette wird Enzym zu 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2), der 12 mM Semicarbazid (Sigma Chem. Co.) enthält, hinzugefügt ( $\leq 1 \text{ mM}$ ). Die Lösung wird bei  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  äquilibriert. Konzentriertes Ethanol (Endkonzentration = 500  $\mu\text{M}$ ) wird in einem kleinen Volumen hinzugefügt. Es wird die Gesamttextinktionsänderung bei 340 nm gemessen werden.

#### Nachweis 2: spektrophotometrisch, regenerierender Nachweis

[0057] Dieser Nachweis wird kontinuierlich immobilisiertes  $\text{NAD}^+$ /NADH auf der Oberfläche des Enzymkonjugates ( $\text{NAD}^+$ -ADH- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ) dem Kreislauf wieder zuführen. ADH selber wird  $\text{NAD}^+$  zu NADH nach der Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd reduzieren. Ein zweites Enzym, Diaphorase (Sigma Chem. Co.) wird hinzugefügt werden, das NADH-ADH- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  zurück zu  $\text{NAD}^+$ -ADH- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  verwandeln wird.

[0058] Um auf funktionstüchtiges  $\text{NAD}^+$ -ADH- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  zu untersuchen, werden die folgenden Lösungen in einer Küvette gemischt werden: 200  $\mu\text{L}$  0,5 M Tris (pH 8,5), 100  $\mu\text{L}$  0,1% Gelatine (in Wasser, filtriert), 10  $\mu\text{L}$  30 mM INT-Violett (in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, 10% DMSO und 0,01% filtrierte Gelatine), 10  $\mu\text{L}$  Diaphorase (10 mg/mL in 10 mM Phosphat, pH 7,5), 30  $\mu\text{L}$  ADH (oder NAD-ADH oder NAD-ADH-Tag), 650  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  Ethanol. Die Extinktion der Mischung wird kontinuierlich in einem Spektrophotometer bei 490 nm abgelesen.

#### Nachweis 3: elektrochemolumineszenter Nachweis

[0059] Der Nachweis wird ähnlich durchgeführt wie Nachweis 1 (oben). Es werden jedoch anstelle des Messens des Extinktionsanstiegs, wenn Ethanol hinzugefügt wird, ähnliche Enzymkonjugatlösungen (mit und ohne hinzugefügtem Ethanol) in einen IGEN-ECL-Analyzer (IGEN, Inc., Gaithersburg, MD) gemessen werden. In Abwesenheit von Ethanol wird das Enzymkonjugat in der Form  $\text{NAD}^+$ -ADH- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  (nicht elektrochemolumineszent) vorliegen. Nach enzymatischer Umwandlung von Ethanol zu Acetaldehyd wird das Enzymkonjugat in der Form NADH-ADH- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  (elektrochemolumineszent) vorliegen. Ferner wird Spannung an das Enzymkonjugat in dem ECL-Messgerät angelegt, Licht wird emittiert und das Konjugat kehrt zu der Ausgangsform ( $\text{NAD}^+$ -ADH- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ) zurück. Diese Ausgangsform kann dann die Oxidation eines weiteren Ethanolmoleküls katalysieren, was das Enzymkonjugat wiederum in die elektrochemolumineszente NADH-Form umwandeln würde. Folglich können mehrfache Photonen durch das Enzymkonjugat in der Anwesenheit von Ethanol erzeugt werden.

#### Beispiel 3: Herstellung von $\text{NAD}^+$ -mutierter Glucosedehydrogenase- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

[0060] In diesem Beispiel wird eine Glucosedehydrogenase-Mutante zubereitet werden, um eine strategisch angeordnete, oberflächliche Mercaptogruppe zu enthalten, die mit einem  $\text{NAD}^+$ -Analog reagieren kann, um ein  $\text{NAD}^+$ -Enzymkonjugat zu erzeugen. Die Mutation wird so positioniert, dass die gebundenen  $\text{NAD}^+$ -Moleküle an die  $\text{NAD}^+$ -Bindungsstelle in dem Enzym binden können und enzymatisch wirksam zu NADH reduziert werden können. Das mutierte Glucosedehydrogenase- $\text{NAD}^+$ -Konjugat lässt man dann mit einem N-Hydroxysuccinimid-(NSH)-Derivat von  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  reagieren, um ein doppelt modifiziertes Enzym zu ergeben;  $\text{NAD}^+$ -GlcDH- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . Dieses Enzymkonjugat wird in einem ECL-Messgerät lumineszent sein. Für jedes Glucosemolekül, welches das Enzym katalysiert, wird das Oberflächen- $\text{NAD}^+$  zu NADH umgewandelt werden. In einem ECL-Messgerät (IGEN, Inc., Gaithersburg, MD) wird NADH, aber nicht  $\text{NAD}^+$ , das an der Enzymoberfläche immobilisierte  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  dazu bringen, ein Lichtphoton zu emittieren. Folglich wird ein Molekül Glucose in einem Lichtphoton resultieren, das durch das doppelt modifizierte Enzym emittiert wird. Ferner wird in dem ECL-Vorgang NADH zurück verwandelt zu  $\text{NAD}^+$ . Folglich wird das doppelt modifizierte Enzym durch das Emittieren von Licht regeneriert und kann wiederholt verwendet werden.

#### Teil 1: Zubereitung der mutierten GlcDH.

[0061] Mutierte GlcDH wurde kürzlich zubereitet durch ortsgerichtete Mutagenese (M. Persson et al.,



Bio/Technology (1991), 9, 280–284). Der Rest asp<sup>44</sup> in Glucosedehydrogenase wurde mutiert zu einem cys<sup>44</sup> durch ein Standard-Mutageneseprotokoll. Das mutierte Protein (GlcDHcys<sup>44</sup>) wurde in E. coli exprimiert und durch gewöhnliche Mittel aufgereinigt.

Teil 2: Zubereitung eines cystein-reaktiven NAD<sup>+</sup>-Derivats.

[0062] Ein thiol-reaktives NAD<sup>+</sup>-Analog wurde zubereitet (M. Persson et al., Bio/Technology (1991), 9, 280–284). Im Wesentlichen schließt das Verfahren die Reaktion von zwei käuflich erhältlichen Reagenzien ein; N-Succinimidyl-3-[2-pyridyldithio]propionat (SpDP; Pierce Chem. Co.) und N<sup>6</sup>[6-Aminoheptyl-(carbamoylmethyl)-NAD (Sigma Chem. Co.).

[0063] Das resultierende Produkt wird mit GlcDHcys<sup>44</sup> reagieren, um das gewünschte NAD<sup>+</sup>-modifizierte Enzym zu ergeben. Solch eine NAD<sup>+</sup>-markierte GlcDH wurde zubereitet (M. Persson et al., Bio/Technology (1991), 9, 280–284).

Teil 3: Zubereitung von NAD<sup>+</sup>-GlcDHcys<sup>44</sup>-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>

[0064] Das in Teil 2 hergestellte NAD<sup>+</sup>-GlcDHcys<sup>44</sup>-Molekül lässt man mit einem NHS-Esterderivat von Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (IGEN, Inc.) reagieren, unter der Verwendung von etablierten Protokollen (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0, Raumtemperatur), für Reaktionen dieses Reaktionsteilnehmers mit Proteinen (IGEN Technische Merkblätter). Einer oder mehrere Lysinreste auf der Oberfläche von NAD<sup>+</sup>-GlcDHcys<sup>44</sup> werden kovalent an Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> als ein Ergebnis der Reaktion gekoppelt. Nach der Reaktion wird freies, nicht umgesetztes Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> durch Dialyse entfernt, um NAD<sup>+</sup>-GlcDHcys<sup>44</sup>-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> zu ergeben.

Beispiel 4: ECL-Nachweis von Glucose unter Verwendung von NAD<sup>+</sup>-GlcDHcys<sup>44</sup>-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>

[0065] NAD<sup>+</sup>-GlcDHcys<sup>44</sup>-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> wird gleichzeitig Glucose zu Gluconolacton oxidieren und immobilisiertes NAD<sup>+</sup> zu NADH reduzieren. Als Nächstes wird in einem ECL-Messgerät (IGEN, Inc., Gaithersburg, MD) an dem Enzym immobilisiertes NADH wirksam benachbartes immobilisiertes Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> dazu bringen, Licht zu emittieren. Folglich wird das doppelt modifizierte Enzym die Anwesenheit von Glucose durch das Emittieren von Licht anzeigen.

[0066] In dem Reagenzglas wird Enzym (NAD<sup>+</sup>-GlcDHcys<sup>44</sup>-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>) ( $\leq 1 \mu\text{M}$ ) zu 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) hinzugefügt. Die Lösung wird bei  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  äquilibriert. Eine Glucose enthaltende Lösung wird in einem kleinen Volumen hinzugefügt. In der Abwesenheit von Glucose wird das Enzymkonjugat in der Form NAD<sup>+</sup>-GlcDHcys<sup>44</sup>-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (nicht elektrochemolumineszent) vorliegen. Nach enzymatischer Umsetzung von Glucose zu Gluconolacton wird das Enzym-

konjugat in der Form NADH-GlcDHcys<sup>44</sup>-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (elektrochemolumineszent) vorliegen. Ferner wird eine Spannung an dem Enzymkonjugat in dem ECL-Messgerät angelegt, Licht wird emittiert und das Konjugat kehrt zu der Ausgangsform (NAD<sup>+</sup>-GlcDHcys<sup>44</sup>-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>) zurück. Diese Ausgangsform kann dann die Oxidation eines weiteren Glucosemoleküls katalysieren, was das Enzymkonjugat noch einmal zu der elektrochemolumineszenten NADH-Form umwandeln würde. Folglich können mehrfache Photonen durch das Enzymkonjugat in der Anwesenheit von Glucose erzeugt werden.

## Patentansprüche

1. Oxidoreductase-Konjugat, befähigt zur Erzeugung eines Elektrochemilumineszenz-Signals, umfassend einen Co-Faktor und einen elektrochemilumineszenten Marker, getrennt angebunden in enger Nachbarschaft zu einer aktiven Stelle der Oxidoreductase auf eine Weise, welche ihre elektrochemische Wechselwirkung untereinander und mit einem Substrat gestattet, das in der aktiven Stelle enthalten ist.

2. Oxidoreductase-Konjugat nach Anspruch 1, worin die Oxidoreductase eine Dehydrogenase ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Glucose-Dehydrogenase, Alkohol-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase.

3. Oxidoreductase-Konjugat nach Anspruch 2, worin die Dehydrogenase Glucose-Dehydrogenase ist.

4. Oxidoreductase-Konjugat nach Anspruch 3, worin der Co-Faktor NADH ist und es sich bei dem elektrochemilumineszenten Marker um Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> handelt.

5. Oxidoreductase-Konjugat nach Anspruch 3, worin der elektrochemilumineszente Marker kovalent an ein Lysin in der Nähe der aktiven Stelle angebunden ist.

6. Oxidoreductase-Konjugat nach Anspruch 3, worin der Co-Faktor kovalent ein Cystein in der Nähe der aktiven Stelle angebunden ist.

7. Biosensor, umfassend ein Oxidoreductase-Konjugat nach Anspruch 1.

8. Biosensor nach Anspruch 7, worin das Oxidoreductase-Konjugat funktional an eine Elektrode fixiert ist.

9. Biosensor nach Anspruch 7, worin das Oxidoreductase-Konjugat immobilisiert ist.

10. Biosensor nach Anspruch 7, zusätzlich um-

fassend eine Elektrode, die in enger Nachbarschaft zum Oxidoreductase-Konjugat angeordnet ist, um die optimale Induktion des elektrochemilumineszenten Markers zu gestatten, um ein Lumineszenz-Signal zu erzeugen.

11. Biosensor nach Anspruch 10, worin das Oxidoreductase-Konjugat an der Elektrode immobilisiert ist.

12. Verfahren zur Bestimmung der Konzentration eines Enzymsubstrats in einer Probe, umfassend die Schritte:

- (a) in Kontakt bringen der Probe, enthaltend das Enzymsubstrat, mit dem Oxidoreductase-Konjugat nach Anspruch 1 unter Bedingungen, welche die Oxidation des Enzymsubstrats gestatten;
- (b) Messen der Elektrochemilumineszenz-Änderung, ausgehend von einer Grundlinienablesung, worin die Elektrochemilumineszenz über einen spannungsabhängigen Prozess erzeugt wird; und
- (c) Ermitteln der Konzentration des Enzymsubstrats auf Basis der gemessenen Änderung des Elektrochemilumineszenz-Signals.

13. Verfahren gemäß Anspruch 12, worin die Messung und Bestimmung auf Echtzeitbasis erfolgt.

14. Verfahren gemäß Anspruch 12, worin die Bestimmung des Enzymsubstrats aus einem Vergleich mit etablierten kinetischen Parametern für die Reaktion abgeleitet wird.

15. Verfahren nach Anspruch 12, worin die Bestimmung der Enzymsubstratkonzentration auf Geschwindigkeitsmessungen im Instrument beruht.

16. Verfahren nach Anspruch 12, worin die Schritte gleichzeitig durchgeführt werden.

17. Verfahren nach Anspruch 16, worin die für die Elektrochemilumineszenz erforderliche Spannung so gepulst wird, dass sie den Co-Faktor und den elektrochemilumineszenten Marker aktiv recycelt.

18. Verfahren zum Messen der Anwesenheit eines Analyten, umfassend:

- (a) in Kontakt bringen einer Probe, von der man annimmt, dass sie einen Analyten enthält, mit einem Biosensor nach Anspruch 7;
- (b) Unterwerfen der in Kontakt gebrachten Probe aus Schritt (a) unter Bedingungen, die zu Elektrochemilumineszenz führen;
- (c) Messen der resultierenden Elektrochemilumineszenz, um eine Ablesung zu erhalten; und
- (d) Ermitteln der Konzentration des Enzymsubstrats auf Basis der gemessenen Änderung der Elektrochemilumineszenz-Signal-Ablesung.

19. Kit, geeignet zur Durchführung eines Elektro-

chemilumineszenztests, umfassend das Oxidoreductase-Konjugat nach Anspruch 1 und geeignete Puffersysteme.

20. Kit nach Anspruch 19, worin das Oxidoreductase-Konjugat auf einer festen Oberfläche immobilisiert ist.

21. Oxidoreductase-Konjugat nach Anspruch 1, worin das Oxidoreductase-Konjugat auf einer festen Oberfläche immobilisiert ist.

22. Verfahren zum Umwandeln eines Oxidoreductase-Substrats in dessen oxidierte Form, umfassend

- (a) das in Kontakt bringen des Substrats mit dem Oxidoreductase-Konjugat nach Anspruch 1 unter Bedingungen, welche die enzymatische Oxidation des Substrats fördern, und
- (b) Gewinnen des oxidierten Substrats.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen