

# EUROPÄISCHE EIGNUNGSPRÜFUNG 2005

## PRÜFUNGSAUFGABE A CHEMIE

Diese Prüfungsaufgabe enthält:

- |   |                                |                    |
|---|--------------------------------|--------------------|
| * | Schreiben des Anmelders        | 2005/A(Ch)/d/1-10  |
| * | Dokument 1 (Stand der Technik) | 2005/A(Ch)/d/11-18 |
| * | Dokument 2 (Stand der Technik) | 2005/A(Ch)/d/19-21 |

## **SCHREIBEN DES ANMELDERS**

Montezuma PLC hat neue Testverfahren für Bakterien im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen untersucht. Unsere Versuche haben zu sehr interessanten Ergebnissen geführt, die unseres Erachtens patentiert werden sollten. Wir bitten Sie deshalb, eine Patentanmeldung einzureichen, die diese Arbeit möglichst weitgehend abdeckt.

Salmonellen-Bakterien sind einer der am weitesten verbreiteten Auslöser lebensmittelbedingter Darminfektionen in der entwickelten Welt, wobei in den Vereinigten Staaten jährlich über 40 000 Fälle gemeldet werden. Bis zu 1 000 dieser Infektionen enden tödlich.

Salmonellen lassen sich oft schwer nachweisen. Eine Lebensmittelprobe, bei der ein Verdacht auf Salmonellenbefall besteht, muß 2 bis 3 Tage kultiviert werden. Dann ist ein Nachweis von Salmonellen in der Kultur durch einen geschulten Mikrobiologen möglich. Dieser Test ist jedoch sehr zeitaufwendig und führt, wenn die Probe nur geringe Bakterienmengen enthält, häufig zu fälschlicherweise negativen Ergebnissen.

In jüngster Zeit haben mehrere Gruppen versucht, einen schnelleren und zuverlässigeren Salmonellentest bereitzustellen. Ein vielversprechender Ansatz besteht darin, zum Nachweis der Bakterien markierte Antikörper zu verwenden. Ein brauchbarer Antikörper für diese Erfindung ist ein Immunglobulin, das eine spezifische Bindungsstelle für ein Bakterium aufweist. Antikörper mit Bindungsstellen für Salmonellen binden sich selektiv an diese Bakterien. Der Marker auf dem Antikörper ist eine Verbindung oder Gruppe, die mit chemischen oder spektroskopischen Mitteln nachgewiesen werden kann. Der Test umfaßt somit das Inkontaktbringen der Salmonellen mit dem markierten Antikörper, das Binden des Antikörpers an die Bakterien und das Nachweisen der daraus resultierenden markierten Antikörper-Bakterien-Komplexe. Es handelt sich dabei um ein sehr selektives Verfahren, denn der Antikörper bindet sich nur an die gewünschten Bakterien. Häufig sind diese Tests aber noch nicht sehr sensitiv und setzen für ein positives Ergebnis eine hohe Bakterienkonzentration in der zu testenden Probe voraus.

Wir haben nun einen sensitiveren Test für Salmonellen entwickelt, der auf der Verwendung eines Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplexes als chemilumineszentem Marker beruht. Eine chemilumineszente Verbindung ist eine Verbindung, die infolge einer chemischen Reaktion Licht aussendet. Dieses Licht kann nachgewiesen werden.

Insbesondere stellen wir ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in einer Bakterienkultur oder einer kontaminierten Lebensmittelprobe bereit, das folgende Schritte umfaßt:

- a) Inkontaktbringen der zu testenden Probe mit einer Festphase während einer ersten Inkubationszeit, die so lang ist, daß sich die Bakterien auf oder in der Struktur der Festphase immobilisieren können,
- b) ein erstes Waschen der Festphase mit den immobilisierten Bakterien zum Entfernen der ungebundenen Bakterien,
- c) Inkontaktbringen der gewaschenen Festphase mit einem Antikörper, der mit einem chemilumineszenten Agens markiert ist, das einen Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex umfaßt, während einer zweiten Inkubationszeit, die so lang ist, daß sich der markierte Antikörper an die Bakterien binden kann,
- d) ein zweites Waschen der Festphase aus Schritt c zum Entfernen ungebundener markierter Antikörper und
- e) die in Schritt d erhaltenen Festphase Bedingungen aussetzen, unter denen Licht erzeugt werden kann; die erzeugte Leuchtaktivität kann mit Hilfe eines geeigneten Geräts quantitativ gemessen werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren verwendet in Schritt a bevorzugt eine Festphase in Form von Kugeln, Röhrchen oder Mikrotiterplattenvertiefungen aus Polystyrol, Polyvinylchlorid, Nylon oder Agarose. Besonders bevorzugt wird als Festphase eine Mikrotiterplattenvertiefung aus Polystyrol.

Die Dauer der ersten Inkubationszeit liegt normalerweise zwischen 15 Minuten und 3 Stunden, und bevorzugt zwischen 20 Minuten und 2 Stunden 30 Minuten. Die Temperatur während der ersten Inkubationszeit beträgt bevorzugt von 20 °C bis 40 °C. Die Inkubation wird im allgemeinen in Gegenwart eines Puffers ausgeführt, der vorzugsweise ein Salzpuffer mit einem pH-Wert zwischen 8,0 und 9,5 ist.

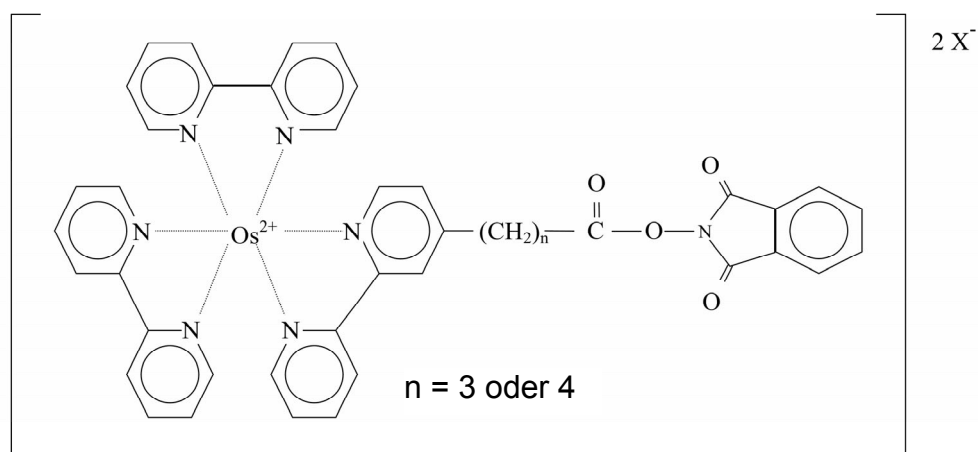
Im allgemeinen erfolgt das in den Punkten b und d beschriebene Waschen jeweils unter Verwendung eines Puffers und bevorzugt eines Salzpuffers, der ebenfalls einen pH-Wert zwischen 8,0 und 9,5 erzeugt.

Die Dauer der zweiten Inkubationszeit in Schritt c unseres Verfahrens (in dem der markierte Antikörper den auf oder in der Struktur der Festphase immobilisierten Bakterien ausgesetzt wird) schwankt im allgemeinen zwischen 15 Minuten und 3 Stunden und liegt bevorzugt zwischen 20 Minuten und 2 Stunden 30 Minuten. Die Temperatur liegt vorzugsweise im Bereich von 20 °C bis 40 °C. Dieser Schritt wird im allgemeinen in Gegenwart eines Puffers ausgeführt, der bevorzugt ein Salzpuffer mit einem pH-Wert zwischen 8,0 und 9,5 ist.

Im abschließenden Schritt e des erfindungsgemäßen Verfahrens findet bei dem markierten Antikörper, der an die nachzuweisenden Bakterien gebunden ist, eine Leuchtreaktion statt. Eine Aktivierungslösung wird mit den an die Bakterien gebundenen markierten Antikörpern in Kontakt gebracht. Dies veranlaßt den Osmium-Komplex zu einer Lichtemission. Die Aktivierungslösung ist typischerweise eine wäßrige Lösung aus Natriumoxalat (0,05 M) und Wasserstoffperoxid (0,02 M). Die Intensität der Lichtemission ist proportional zur Konzentration des Osmium-Komplexes und somit zur Zahl der vorhandenen Bakterien. Die Intensität der Lichtemission kann mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden. Die Zahl der in der Probe vorhandenen Bakterien ist proportional zu den mit dem Luminometer gemessenen relativen Lichteinheiten ("relative light units" = RLU). Eine stark mit Salmonellen kontaminierte Probe ergibt eine hohe RLU-Messung, eine negative Probe hingegen eine sehr niedrige.

Der unter Punkt c verwendete Antikörper ist ein Antikörper, der sich mit ausreichender Spezifität an Salmonellen bindet, so daß ein brauchbarer Test bereitgestellt werden kann. Der bevorzugte Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper aus der Klasse der Proteine, die als Gamma-Immunglobuline (IgG) bezeichnet werden und von Kaninchen stammen. Der Antikörper kann mit an sich bekannten, herkömmlichen Techniken hergestellt werden und ist im Handel erhältlich.

Der gewählte Antikörper wird mit einem chemilumineszenten Agens markiert, das ein Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex ist. Diese Osmium-Komplexe sind bekannte chemilumineszente Agentien. Der Komplex als solcher bindet sich jedoch nicht an Antikörper und eignet sich daher nicht als Marker. Damit der Komplex als Marker benutzt werden kann, muß er mit einer Bindungsgruppe substituiert werden, die in der Lage ist, den Komplex an den Antikörper zu binden. Wie wir festgestellt haben, ist es erfindungswesentlich, als Bindungsgruppe einen Ester aus einer Carbonsäure mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen und N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxyphthalimid zu verwenden. Ein Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex mit einer solchen Bindungsgruppe kann hergestellt werden, indem man zunächst ein Dichlor-bis(2,2'-bipyridin)osmium mit einem Carbonsäure-substituierten 2,2'-Bipyridin reagieren läßt (dieser erste Reaktionsschritt zur Herstellung des Markers ist veröffentlicht in J. Complex Chem. Bd. 66 (1953), 44), um einen Carbonsäure-substituierten Tris(2,2'-bipyridin)-Komplex zu erhalten. Den Marker erhält man, indem man diesen Carbonsäure-substituierten Tris(2,2'-bipyridin)-Komplex in einem zweiten Schritt mit N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxyphthalimid reagieren läßt, damit sich der mit dem Ester substituierte Tris(2,2'-bipyridin)-Komplex bildet. Besonders bevorzugt als Marker werden Verbindungen mit folgender Struktur:



Ein geeignetes Schema zur Markierung des Antikörpers mit dem Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex umfaßt folgende Schritte:

- Auflösen des Antikörpers in einem Salzpuffer mit einem pH-Wert zwischen 8,0 und 9,5
- Hinzugeben dieser Antikörperlösung zum Marker (d. h. zum mit der Bindungsgruppe substituierten Osmium-Komplex), der in einem organischen Lösungsmittel aufgelöst ist, und gründliches Mischen der Bestandteile
- Rühren der Mischung für 5 bis 30 Minuten
- gegebenenfalls Reinigen der markierten Antikörperlösung.

Der Salmonellentest kann als Testkit zum Nachweis von Salmonellen in einer Bakterienkultur oder einer kontaminierten Lebensmittelprobe bereitgestellt werden, der folgendes enthält:

- eine Festphase, bevorzugt als Mikrotiterplattenvertiefung
- einen Antikörper (bevorzugt einen monoklonalen Antikörper des IgG-Typs), der durch Kopplung an einen Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplex markiert ist
- eine wäßrige Lösung aus Natriumoxalat (0,05 M) und Wasserstoffperoxid (0,02 M).

Zur weiteren Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung und ihrer Vorteile werden die folgenden Beispiele beschrieben, die selbstverständlich rein illustrativ und keineswegs erschöpfend sein sollen.

## BEISPIEL I

**Herstellung des bis(Hexafluorophosphat)salzes von bis(2,2'-Bipyridin)(2,2'-bipyridin-4-butansäure)-osmium, wie aus J. Complex Chem. Bd. 66 (1953), 44 bekannt.**

Natriumbicarbonat (0,40 g), Osmium-dichlorbis(2,2'-bipyridin) (0,40 g) und 2,2'-Bipyridin-4-butansäure (0,30 g) wurden 9 Stunden lang in Methanol (20 ml) und Wasser (5 ml) unter Rückfluß gerührt. Die daraus entstandene Lösung wurde in einem Eisbad gekühlt, mit 5 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure behandelt und bei Eistemperatur 1,5 Stunden lang ruhen gelassen. Es bildete sich ein Niederschlag, der abfiltriert und mit Methanol (8 ml) gewaschen wurde.

Das Filtrat und die Waschlösung wurden vereinigt und mit einer Lösung von Natriumhexafluorophosphat (5,0 g) in Wasser (25 ml) behandelt. Die daraus entstandene Lösung wurde 3 Stunden in einem Eisbad gekühlt, und der entstandene Niederschlag aus purpurroten Kristallen wurde abfiltriert (0,40 g).

## BEISPIEL II

**Herstellung eines Esters aus N-Hydroxyphthalimid und des bis(Hexafluorophosphat)salzes von bis(2,2'-Bipyridin)(2,2'-bipyridin-4-butansäure)-osmium**

Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 0,046 g) und N-Hydroxyphthalimid (0,034 g) wurden unter Rühren in Dimethylformamid (DMF, 2 ml) aufgelöst und in einem Eisbad gekühlt. Eine Lösung des bis(Hexafluorophosphat)salzes von bis(2,2'-Bipyridin)(2,2'-bipyridin-4-butansäure)-osmium (0,101 g, Herstellung wie in Beispiel I) in DMF (1 ml) wurde hinzugefügt und die Mischung 5 Stunden bei Eisbadtemperatur gerührt. Es bildete sich ein Niederschlag, der durch Zentrifugieren abgetrennt wurde. Der Überstand, der den Ester des Osmium-Komplexes enthält, wurde zurückbehalten und wird als Marker benutzt.

## **BEISPIEL III**

### **Herstellung eines Antikörpers**

Der verwendete Antikörper war ein monoklonaler Antikörper des Typs IgG gegen Salmonellen. Dieser Antikörper wurde auf an sich bekannte Weise als reine Lösung hergestellt.

### **Markierung eines monoklonalen Antikörpers des Typs IgG gegen Salmonellen mit einem Osmium-Komplex**

Die in Beispiel 2 hergestellte Lösung des Esters aus N-Hydroxyphthalimid und dem bis(Hexafluorophosphat)salz von bis(2,2'-Bipyridin)(2,2'-bipyridin-4-butansäure)-osmium (1 ml) wurde zu einer gerührten Lösung von IgG in wäßriger gepufferter physiologischer Salzlösung (PBS, 5 ml, pH: 9,0; 25mg/ml IgG) hinzugefügt. Die Mischung wurde 20 Minuten gerührt und der Niederschlag durch Zentrifugieren entfernt. Der Überstand, der mit Osmium markiertes IgG enthielt, wurde zurückbehalten.

Der Erfolg der Markierungsreaktion wurde getestet, indem die mit Osmium markierte IgG-Lösung gegen PBS-Lösung dialysiert wurde. Zur Kontrolle wurde der in Beispiel II hergestellte, ungebundene aktivierte Osmium-Komplex ebenfalls gegen PBS dialysiert. Nach 8 Stunden zeigte die Kontrollprobe keine Fluoreszenz im Dialyseschlauch. Die mit Osmium markierte IgG-Lösung jedoch wies starke Fluoreszenz auf und zeigte damit, daß der Osmium-Komplex an das IgG gebunden war.



## BEISPIEL IV

### Nachweis von Salmonellen

Folgende Methodik wurde angewandt:

- a) Eine Probe mit Salmonellen wird in die Vertiefungen einer Polystyrol-Mikrotiterplatte gegeben (0,1 ml/Vertiefung). Es erfolgt eine Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C in Gegenwart eines Tris-Puffers (pH: 9,2).
- b) Die Mikrotiterplatte wird dann fünfmal mit PBS-Puffer (pH: 9,0) gewaschen, der 0,05 % Tween 20-Detergens (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) enthält.
- c) Ein mit einem (2,2'-Bipyridin)-osmium-Komplex markierter Antikörper (wie in Beispiel 3 hergestellt) wird hinzugefügt (0,1 ml/Vertiefung) und 30 Minuten bei 37 °C in Gegenwart eines Tris-Puffers (pH 9,2) inkubiert.
- d) Die Platte wird wie in Schritt b gewaschen.
- e) Die Lumineszenz wird mit einem LB96P-Luminometer gemessen, das automatisch eine wässrige Lösung von Natriumoxalat (0,05 M) und Wasserstoffperoxid (0,02 M) in jede Vertiefung der Platte gibt.

Das Verfahren wurde unter Verwendung von Antikörpern wiederholt, die mit mehreren verschiedenen handelsüblichen fluoreszierenden Markern markiert waren, und die Sensitivität der markierten Antikörper wurde verglichen. Bei jedem markierten Antikörper gab es eine Kontrollvertiefung, die derselben Schrittfolge unterworfen wurde, in die aber keine Bakterien gegeben wurden. Als positives Ergebnis gilt ein Signal, das eine RLU-Stärke von mindestens 20 % über dem von der Kontrollvertiefung erhaltenen Signal aufweist. Eine Reihe von Proben mit bekannten Bakterienmengen wurde getestet, und für jeden der getesteten Marker wurde die niedrigste nachweisbare Bakterienkonzentration bestimmt.

| Verwendeter Marker                                                                                                            | Nachweisgrenze (Bakterien/ml) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Ester aus N-Hydroxyphthalimid und dem bis(Hexafluorophosphat)salz von bis(2,2'-Bipyridin)(2,2'-bipyridin-4-butansäure)-osmium | 10                            |
| Acridiniumester                                                                                                               | 100                           |
| Fluorescein                                                                                                                   | 700                           |
| Bacdetect                                                                                                                     | 400                           |
| Glowdark                                                                                                                      | 3 000                         |

## BEISPIEL V

Eine Lebensmittelprobe (Rinderhackfleisch) wurde künstlich mit Salmonellen kontaminiert. Das Fleisch wurde in Portionen zu jeweils 25 g geteilt und mit einer gleichen Menge von Tris-Puffer (pH: 9,2) vermischt. Eine kontrollierte Menge von Bakterien wurde zu jeder Probe hinzugefügt, und die Proben wurden gut geschüttelt und 4 Stunden bei 37 °C kultiviert. Die kultivierten Proben wurden durch eine Membran mit Öffnungen von 10 Mikrometern gefiltert, um das Fleisch von den Bakterien zu trennen, und die erhaltene Flüssigkeit wurde unter Verwendung des in Beispiel 3 hergestellten markierten Antikörpers und des Verfahrens nach Beispiel 4 getestet.

Die Proben führten alle zu positiven Ergebnissen. Bei allen bekannten kommerziellen Tests müssen die Proben für mindestens 24 Stunden kultiviert werden; somit kann unser Test den Zeitaufwand für das Testen von Lebensmittelproben erheblich reduzieren.

Mit freundlichen Grüßen

D. Belly  
Produktentwicklung  
Montezuma PLC

## **DOKUMENT D1 (Stand der Technik)**

### VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON BAKTERIEN

- 5 Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in einer Kultur oder in einer kontaminierten Lebensmittelprobe.

Die Erfindung verwendet einen Test, bei dem mit chemilumineszenten Molekülen markierte Antikörper benutzt werden, um die Zahl der vorhandenen Bakterien zu  
10 messen. Daneben betrifft die Erfindung auch Testkits für die verfahrensgemäße Durchführung der Tests.

Salmonellen kommen in einer Reihe unterschiedlicher Umgebungen vor, stellen aber das größte Gesundheitsrisiko dar, wenn sie in Nahrungs- und Futtermitteln auftauchen.  
15 Geflügel, Fleisch und Eier sind häufige Quellen von Salmonellen. Die Bakterien können sich beim Verzehr im Darm festsetzen und dort vermehren, was mehrere Tage nach der ursprünglichen Aufnahme Krankheitssymptome wie Erbrechen, Durchfall und Übelkeit hervorruft und in schweren Fällen sogar zum Tod führen kann. Es ist daher überaus  
wünschenswert, Testverfahren bereitzustellen, mit denen solche gefährlichen Bakterien  
20 nachgewiesen werden können. Aus dem Stand der Technik sind Testverfahren für Salmonellen bekannt. Diese Verfahren sind jedoch hinsichtlich ihrer Sensitivität noch zu verbessern.

## BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

In einem spezifischen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in einer Kultur oder einer kontaminierten Lebensmittelprobe bereit, das folgende Schritte umfaßt:

- a) Inkontaktbringen der zu testenden Probe mit einer Festphase während einer ersten Inkubationszeit, die so lang ist, daß sich die Bakterien auf der Festphase immobilisieren können,
- b) ein erstes Waschen der Festphase mit den immobilisierten Bakterien zum Entfernen der ungebundenen Bakterien,
- c) Inkontaktbringen der gewaschenen Festphase mit einem spezifischen Antikörper, der durch Kopplung an ein chemilumineszentes Agens markiert ist, das ein Acridinium-Derivat umfaßt, während einer zweiten Inkubationszeit, die so lang ist, daß sich der markierte Antikörper an die Bakterien binden kann,
- d) ein zweites Waschen der Festphase aus Schritt c zum Entfernen ungebundener markierter Antikörper und
- e) die gemäß der Beschreibung in Punkt d erhaltenen Festphase Bedingungen aussetzen, unter denen Licht erzeugt werden kann; die erzeugte Leuchtaktivität kann mit Hilfe eines geeigneten Geräts quantitativ gemessen werden.

Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren bereit, bei dessen Durchführung unter Punkt a eine Festphase in Form von Kugeln, Röhrchen oder Mikrotiterplattenvertiefungen verwendet wird, die zum Beispiel aus Polystyrol, Polyvinylchlorid, Nylon, Agarose-Kugeln oder Zellulosederivaten bestehen kann.

Bevorzugt wird als Festphase eine Mikrotiterplattenvertiefung aus Polystyrol.

Der Kontakt der Probe (die die nachzuweisenden Bakterien enthält) mit der Festphase (erste Inkubationszeit) kann zwischen 15 Minuten und 3 Stunden variieren und erfolgt bei einer Temperatur von 20 °C bis 40 °C und im allgemeinen in Gegenwart eines Salzpuffers mit einem pH-Wert von 8,3 bis 9,5.

5

Im allgemeinen erfolgt das in den Punkten b) und d) beschriebene Waschen jeweils unter Verwendung eines Salzpuffers, der ebenfalls einen pH-Wert von 8,3 bis 9,5 erzeugt.

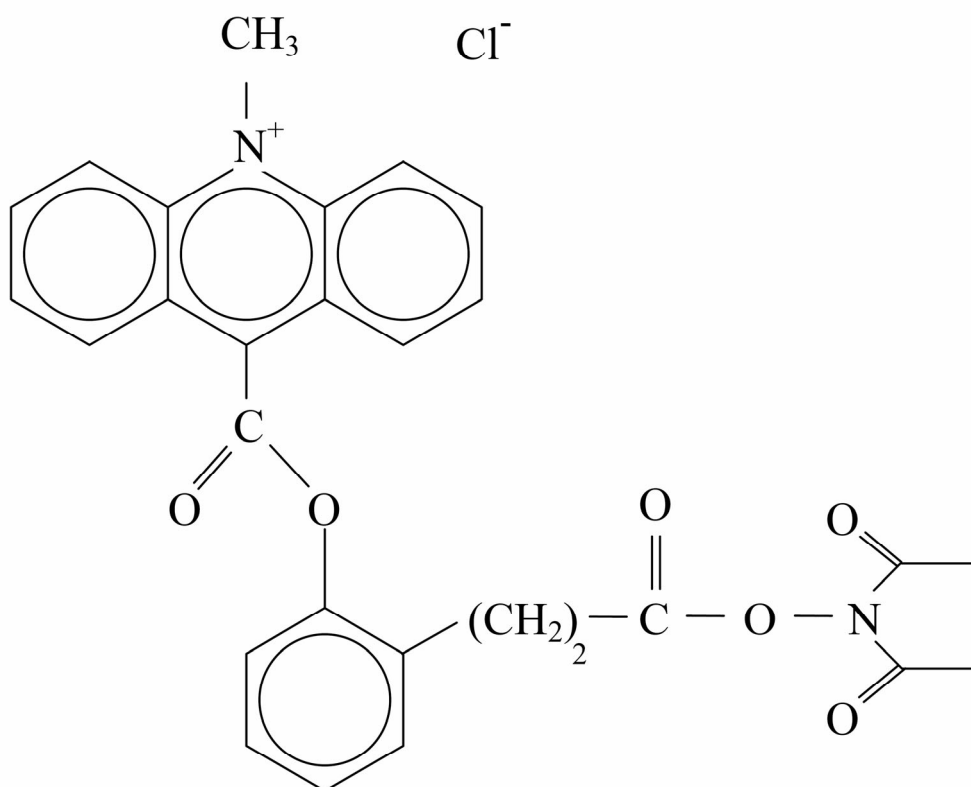
- 10 Die Dauer des in Schritt c) beschriebenen Kontakts des markierten Antikörpers mit den auf der Festphase immobilisierten Bakterien (zweite Inkubationszeit) kann zwischen 15 Minuten und 3 Stunden variieren und erfolgt bei einer Temperatur im Bereich von 20 °C bis 40 °C und im allgemeinen in Gegenwart eines Salzpuffers mit einem pH-Wert von 8,3 bis 9,5.

15

Im abschließenden Schritt e) wird zu den markierten Bakterien auf der Festphase eine Aktivierungslösung hinzugefügt, die eine verdünnte wäßrige Lösung aus Natriumoxalat (0,05 M) und Wasserstoffperoxid (0,02 M) sein kann. Dies führt zu einer Lichtemission des Acridinium-Markers. Die Zahl der vorhandenen Bakterien kann quantitativ bestimmt

- 20 werden, indem die Intensität des emittierten Lichts mit Hilfe eines Luminometers gemessen wird. Die Konzentration von Acridinium-Molekülen, die proportional zur Zahl der Bakterien ist, kann durch die mit dem Luminometer gemessenen relativen Lichteinheiten ("relative light units" = RLU) ermittelt werden. Eine stark kontaminierte Probe ergibt eine hohe RLU-Messung, eine negative Probe hingegen eine sehr niedrige.

Der unter Punkt c) verwendete Antikörper ist ein Antikörper, der sich mit ausreichender Spezifität an Salmonellen bindet, so daß ein brauchbarer Assay bereitgestellt werden kann. Der verwendete Antikörper ist bevorzugt ein Antikörper aus der Klasse der Proteine, die als Gamma-Immunglobuline (IgG-Moleküle) bezeichnet werden und von Kaninchen stammen. Der Antikörper wird mit an sich bekannten, herkömmlichen Techniken hergestellt. Der gewählte Antikörper wird mit einem chemilumineszenten Agens markiert, das aus Acridinium-Derivaten ausgewählt wird. Die Markierung wird bevorzugt unter Verwendung eines Acridinium-Derivats durchgeführt, das aus einem substituierten 10-Methylacridinium-9-carbonsäurephenylester mit folgender Formel (1) besteht:



Die Acridiniumester der Formel (1), die für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet werden, sind bekannte Verbindungen, deren Herstellung im Dokument EP-A-0082 636 beschrieben ist.

Ein allgemeines Schema zur Markierung des Antikörpers mit dem Acridinium-Derivat sieht folgende Methodik vor:

- Auflösen des Antikörpers in einem Salzpuffers mit einem pH-Wert von 2
  - Hinzugeben dieser Antikörperlösung zum Marker, gegebenenfalls gelöst in einem organischen Lösungsmittel, und gründliches Mischen der Bestandteile
  - Stehenlassen der Mischung im Dunkeln bei einer Temperatur von 20 - 30 °C für 5 bis 30 Minuten
  - anschließend gegebenenfalls Reinigen des markierten Antikörpers zum Entfernen der überschüssigen Markierungsverbindungen durch Gelpermeationschromatographie.
- In einem weiteren Aspekt enthält die vorliegende Erfindung einen Testkit zum Nachweis von Salmonellen-Bakterien in einer Kultur oder in einer kontaminierten Lebensmittelprobe, umfassend:
- eine Festphase, bevorzugt entweder in Form einer Mikrotiterplattenvertiefung oder in Form einer Membran
  - einen Antikörper, der durch Kopplung an ein Acridinium-Derivat markiert ist
  - eine wäßrige Lösung aus Natriumoxalat (0,05 M) und Wasserstoffperoxid (0,02 M).
- Zur weiteren Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung und ihrer Vorteile werden die folgenden Beispiele beschrieben, die selbstverständlich rein illustrativ und keineswegs erschöpfend sein sollen.



## BEISPIEL I

### Herstellung eines Antikörpers, der mit einem Acridinium-Derivat markiert ist:

- 5 Der verwendete Antikörper war ein Antikörper des Typs IgG gegen Salmonellen. Dieser Antikörper wurde auf an sich bekannte Weise als reine Lösung hergestellt.

Das verwendete Acridinium-Derivat war die Verbindung gemäss Formel (1).

- 10 Die Markierungsreaktion mit dem Acridinium wird folgendermaßen durchgeführt:
1. Auflösen des Antikörpers (50 Mikrogramm IgG) in 0,2 ml Markierungspuffer (0,2 M Natriumphosphat, pH: 2),
  2. Hinzufügen der Antikörperlösung zu 5 Mikrogramm des Acridinium-Markers und gründliches Mischen,
  - 15 3. 15-minütiges Inkubieren der Mischung bei Raumtemperatur (25 °C) im Dunkeln,
  4. Aufgeben der Mischung auf eine 10 ml G25M Sephadex-Säule und Sammeln von 15 x 1 ml-Fractionen. Ein geeigneter Elutions- und Aufbewahrungspuffer ist Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (0,1 M, pH: 6,3, mit 0,15 M NaCl), das 0,05 % (w/v) Natriumazid und 0,1 % (w/v) Rinderserum-Albumin enthält,
  - 20 5. Entfernen des aliquoten Teils (0,01 ml) jeder Fraktion und Messen der Aktivität im Luminometer,
  6. Vereinigen der aktiven Fraktionen und Aufbewahren der mit Acridinium markierten Antikörper bei -20 °C.

## BEISPIEL II

### Nachweis von Salmonellen durch das erfindungsgemäße Verfahren

- 5 Folgende Methodik wurde angewandt:
- a) Eine Probe (einer bekannten Konzentration von Salmonellen) wird in die Vertiefungen einer Polystyrol-Mikrotiterplatte gegeben (0,1 ml/Vertiefung). Es erfolgt eine Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C in Gegenwart eines Tris-Puffers (pH: 9,2).
  - b) Die Mikrotiterplatte wird dann fünfmal mit PBS-Puffer (pH: 9,0) gewaschen, der  
10 0,05 % Detergens Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) enthält.
  - c) Der mit Acridinium markierte Antikörper wird in jede Vertiefung gegeben und 30 Minuten bei 37 °C in Gegenwart eines Tris-Puffers inkubiert (pH: 9,2).
  - d) Die Platte wird wie in Schritt b gewaschen.
  - e) Die Lichtemission (Lumineszenz) wird mit dem LB96P-Luminometer gemessen, das  
15 automatisch eine wäßrige Lösung von Natriumoxalat (0.05 M) und Wasserstoffperoxid (0,02 M) in jede Vertiefung der Platte gibt.

Das vorliegende Verfahren konnte Salmonellen in einer Konzentration von 100 Zellen/ml nachweisen, was alle handelsüblichen Tests für diese Bakterien an Sensitivität übertrifft.

## ANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in einer Kultur oder einer kontaminierten Lebensmittelprobe, das folgende Schritte umfaßt:
  - 5 a) Inkontaktbringen der zu testenden Probe mit einer Festphase während einer ersten Inkubationszeit, die so lang ist, daß sich die Bakterien auf oder in der Struktur der Festphase immobilisieren können,
  - b) ein erstes Waschen der Festphase mit den immobilisierten Bakterien zum Entfernen der ungebundenen Bakterien,
  - 10 c) Inkontaktbringen der gewaschenen Festphase mit einem spezifischen Antikörper, der durch Kopplung an ein chemilumineszentes Agens markiert ist, das ein Acridinium-Derivat umfaßt, während einer zweiten Inkubationszeit, die so lang ist, daß sich der markierte Antikörper an die Bakterien binden kann,
  - d) ein zweites Waschen der Festphase aus Schritt c zum Entfernen ungebundener markierter Antikörper und
  - 15 e) die in Schritt d erhaltene Festphase Bedingungen aussetzen, unter denen Licht erzeugt werden kann; die erzeugte Leuchtaktivität kann mit Hilfe eines geeigneten Geräts quantitativ gemessen werden.
- 20 2. Testkit zum Nachweis von Salmonellen in einer Kultur oder in einer kontaminierten Lebensmittelprobe, umfassend:
  - eine Festphase,
  - einen Antikörper des IgG-Typs, der durch Kopplung an ein Acridinium-Derivat markiert ist, und
  - 25 - eine verdünnte wäßrige Lösung aus Natriumoxalat (0,05 M) und Wasserstoffperoxid (0,02 M).

## **DOKUMENT D2 (Stand der Technik)**

LEDs (Light Emitting Devices = Leuchtdioden) sind für verschiedene Anwendungen von Nutzen. Sie bestehen aus einer Schicht einer chemilumineszenten Verbindung, die sich  
5 zwischen zwei Elektroden befindet, von denen mindestens eine transparent ist. An die Schicht wird über die Elektroden Strom angelegt, was zu einer Lichtemission der Verbindung führt. Gesucht werden chemilumineszente Verbindungen, die bei niedriger Spannung zu starker Helligkeit der Lichtemission führen. Von den untersuchten  
10 Materialien haben in jüngster Zeit Osmium-Komplexe einige Aufmerksamkeit auf sich gezogen.

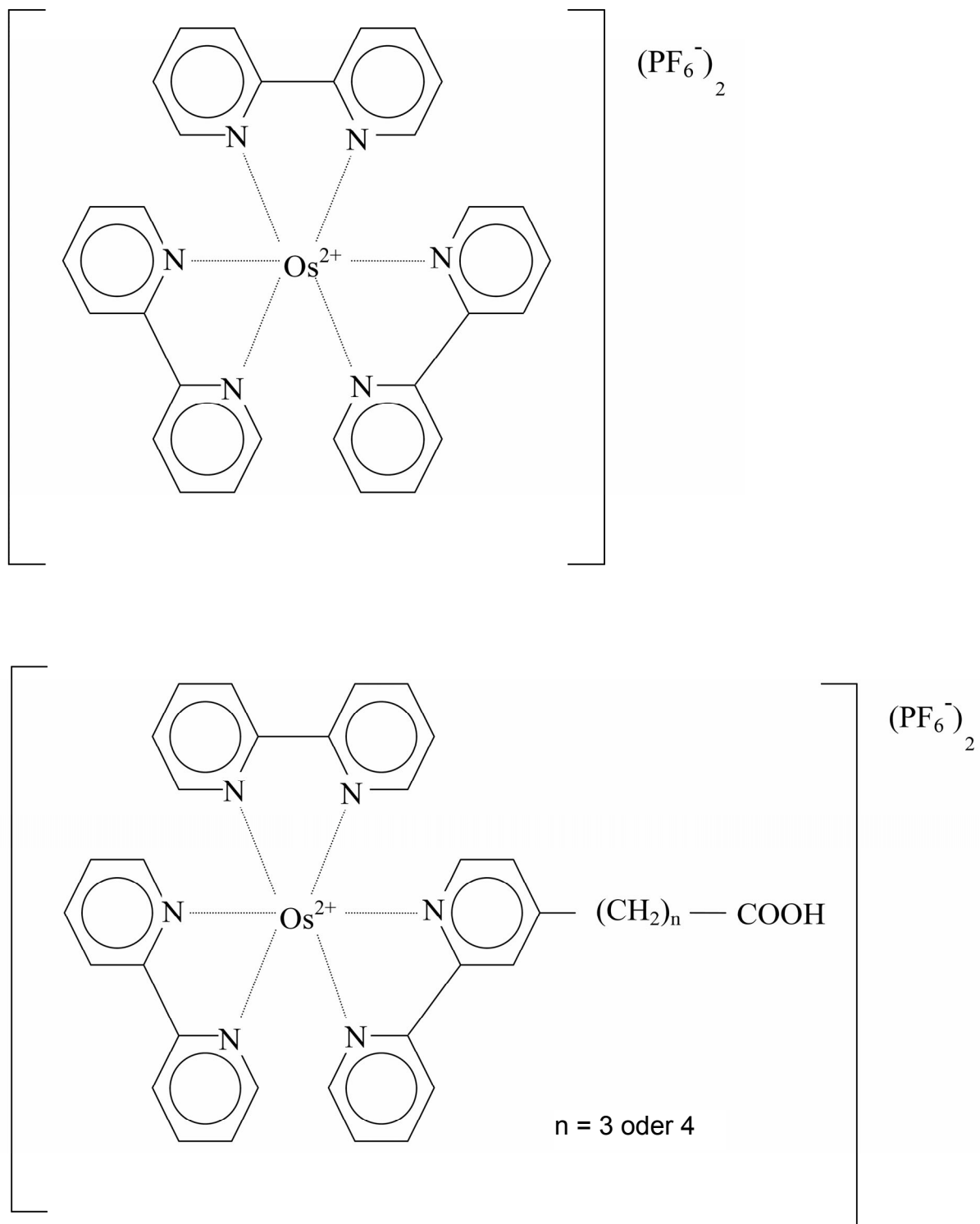
### **ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von LEDs mit starker  
15 Helligkeit bei niedriger Spannung auf der Grundlage eines Films von organischen lichtemittierenden Verbindungen, die aus unsubstituierten oder Carbonsäure-substituierten Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplexen ausgewählt werden.

### **BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN**

20 Die Erfinder haben entdeckt, daß man bei der Verwendung von Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplexen als organische lichtemittierende Verbindungen LEDs erhält, die die erwünschten Eigenschaften aufweisen. Besonders gute Ergebnisse wurden erzielt, wenn der verwendete Osmium-Komplex aus den  
25 bis(Hexafluorophosphat)salzen von tris(2,2'-Bipyridin)-osmium, bis(2,2'-Bipyridin)-(2,2'-bipyridin-4-pentansäure)-osmium oder bis(2,2'-Bipyridin)(2,2'-bipyridin-4-butansäure)-osmium ausgewählt wird.

Die chemische Struktur dieser Osmium-Komplexe ist wie folgt:



Diese Komplexe können durch ein an anderer Stelle beschriebenes Verfahren (J. Complex Chem. Bd. 66 (1953), 44) synthetisch hergestellt werden.

## Herstellung der lichtemittierenden Diode

Eine Glasplatte wurde mit einer 5 Mikrometer dicken Schicht aus Indium-Zinnoxid (ITO) besputtert. Diese Schicht bildet eine transparente Anode. Ein dünner Film (etwa 100 nm  
5 dick) aus bis(Hexafluorophosphat)salz von tris(2,2'-Bipyridin)-osmium wurde bei Raumtemperatur durch Spin-Coating aus einer 4%igen Lösung des bis(Hexafluorophosphat)salzes von tris(2,2'-bipyridin)-osmium in Acetonitril auf die mit Indium-Zinnoxid beschichteten Substrate aufgetragen. Der Film wurde in einem  
10 Vakuumofen bei 125 °C mindestens 8 Stunden lang erhitzt. Auf die Schichten wurden dann bei Raumtemperatur Aluminiumkathoden aufgedruckt. Die Anode und die Kathode wurden elektrisch verbunden, indem an jede Elektrode ein dünner Kupferdraht gelötet wurde.

## Charakterisierung der LED

15 Die Kenndaten hinsichtlich Helligkeit und Spannung der LED wurden bei Raumtemperatur gemessen.

Die LED, die wie oben beschrieben hergestellt wurde, erzeugte bei einer Spannung von  
20 3,0 V eine kräftige rote Lichtemission, die in einem erhellten Raum deutlich sichtbar war. Eine ähnliche Emission wurde mit einer LED erhalten, bei der eine Schicht aus dem bis(Hexafluorophosphat)salz von bis(2,2'-Bipyridin)(2,2'-bipyridin-4-butansäure)-osmium als lichtemittierende Schicht verwendet wurde. Diese Ergebnisse zeigen, daß die  
25 vorliegenden LEDs bei sehr geringer Spannung eine außerordentliche Helligkeit aufweisen.

## ANSPRUCH

1. Leuchtdiode (LED) aus einem dünnen organischen Film mit starker Helligkeit bei  
30 niedriger Spannung, umfassend:  
eine organische lichtemittierende Schicht, bestehend aus unsubstituierten oder Carbonsäure-substituierten Tris(2,2'-bipyridin)osmium-Komplexen.