



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 32 640 T2 2004.03.25**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 730 738 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 32 640.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/13193**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 901 921.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/014928**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.11.1994**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **01.06.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.09.1996**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **07.05.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.03.2004**

(51) Int Cl.7: **G01N 33/52**

G01N 33/58, C07D 327/06, C07D 265/30,

G01N 33/542, C12Q 1/68

(30) Unionspriorität:

156181 22.11.1993 US

(73) Patentinhaber:

Dade Behring Marburg GmbH, 35041 Marburg, DE

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**ULLMAN, F., Edwin, Atherton, US; SINGH, Sharat,
San Jose, US**

(54) Bezeichnung: **METALL-CHELAT ENTHALTENDE ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR VERWENDUNG IN CHEMILUMINESZIERENDEN ASSAYS**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine chemolumineszierende Verbindung sowie ein Verfahren, Zusammensetzungen und Sets zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe. Insbesondere betrifft die Erfindung eine Zusammensetzung, die Chemolumineszenz mit hoher Quantenausbeute aufweist, wenn sie durch Singulett-Sauerstoff aktiviert wird, die rasch abklingt und die bei langen Wellenlängen emittiert.

[0002] Das Gebiet der klinischen Diagnostik ist in den letzten Jahren in großem Umfang ausgeweitet worden – sowohl hinsichtlich der Vielfalt an Materialien (Analyten), die ohne Schwierigkeiten und präzise bestimmt werden können, als auch hinsichtlich der Bestimmungsverfahren. Es sind praktikable, zuverlässige und ungefährliche Verfahren zum Nachweis der Gegenwart niedriger Konzentrationen von Materialien in Flüssigkeiten wünschenswert. In der klinischen Chemie können diese Materialien in Körperflüssigkeiten in Konzentrationen von unter 10^{12} Mol vorhanden sein. Die Schwierigkeit, niedrige Konzentrationen dieser Materialien zu detektieren, wird durch die relativ geringen Probengrößen, die dafür einsetzbar sind, noch verstärkt.

[0003] Bei der Entwicklung von Tests müssen unterschiedliche Faktoren berücksichtigt werden. Eine Überlegung ist die Signalreaktion auf Änderungen der Analytenkonzentration. Eine zweite Überlegung ist die Leichtigkeit, mit der die Arbeitsvorschrift für den Test durchgeführt werden kann. Eine dritte Überlegung sind die schwankenden Störungen von Probe zu Probe. Einfache Herstellung und Reinigung der Reagenzien, Verfügbarkeit von Geräten, einfache Automatisierung und Wechselwirkungen mit Materialien von Interesse sind weitere Faktoren, die es bei der Entwicklung nützlicher Tests zu berücksichtigen gilt.

[0004] Eine Vielzahl von Techniken einer bestimmten Kategorie sieht die Verwendung eines Rezeptors vor, der sich spezifisch an eine bestimmte räumliche und polare Struktur eines markierten Liganden als Funktion der Gegenwart eines Analyten binden kann.

[0005] Die beobachtete Wirkung der Bindung durch den Rezeptor hängt vom Marker ab. In einigen Fällen sorgt die Bindung des Rezeptors lediglich für eine Differenzierung des Molekulargewichts zwischen gebundenem und ungebundenem markiertem Liganden. In anderen Fällen erleichtert die Bindung des Rezeptors die Trennung von gebundenem markiertem Liganden von freiem markiertem Liganden, oder sie kann die Beschaffenheit des aus dem Marker erhaltenen Signals beeinflussen, sodass das Signal je nach Menge des an den markierten Liganden gebundenen Rezeptors variiert. Eine weitere Variation besteht darin, dass der Rezeptor markiert ist und der Ligand unmarkiert. Alternativ dazu sind sowohl der Rezeptor als auch der Ligand markiert, oder es sind unterschiedliche Rezeptoren mit zwei unterschiedlichen Markern markiert, woraufhin die Marker miteinander in Wechselwirkung treten, wenn sie sich in unmittelbarer Nähe befinden, und die Menge an vorhandenem Liganden das Ausmaß beeinflusst, in dem die Marker des Rezeptors miteinander wechselwirken.

[0006] Es besteht nach wie vor die Notwendigkeit, neue und präzise Techniken zu entwickeln, die auf ein breites Spektrum unterschiedlicher Liganden abgestimmt oder in konkreten Fällen verwendet werden können, wo andere Verfahren nicht ohne Weiteres in Frage kommen.

[0007] Es wurden bereits homogene Immunassays für kleine Moleküle beschrieben. Diese Tests sind z. B. der FRAT[®]-Test von SYVA, der EMIT[®]-Test, der Enzymkanalisierungs-Immuntest und der Fluoreszenz-Energietransfer-Immuntest (FETI); ferner gibt es Enzyminhibitor-Immuntests (Hoftman LaRoche und Abbott Laboratories), wie z. B. den Fluoreszenz-Polarisations-Immuntests (Dandlicker) u. a. Alle diese Verfahren besitzen beschränkte Sensitivität, und nur einige, wie z. B. FETI und Enzymkanalisierung, sind für große Multi-epitop-Analyten geeignet. Lumineszierende Verbindungen, wie z. B. fluoreszierende Verbindungen und chemolumineszierende Verbindungen, werden für Tests sehr häufig eingesetzt, da sie die Fähigkeit des Lichtaussehdens besitzen. Aus diesem Grund wurden Lumineszenzmittel als Marker in Tests, wie z. B. Nucleinsäureassays und Immunassays, verwendet. Beispielsweise wird ein Element eines spezifischen Bindungspaares an ein Lumineszenzmittel gebunden, und es werden verschiedene Arbeitsvorschriften befolgt. Das Lumineszenzmittel-Konjugat kann im Verhältnis zur Analytenmenge in einer Probe, von der man vermutet, dass sie den Analyten enthält, zwischen einer festen Phase und einer flüssigen Phase verteilt werden. Durch Messen der Lumineszenz einer der beiden Phasen kann der beobachtete Lumineszenzwert mit der Konzentration des Analyten in der Probe in Beziehung gesetzt werden.

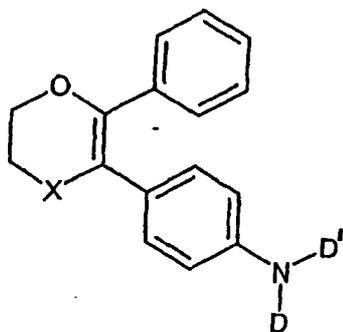
[0008] Teilchen, wie z. B. Liposomen und Erythrozyten-Geisterpeaks, wurden als Träger eingekapselter wasserlöslicher Materialien verwendet. Beispielsweise dienen Liposomen dazu, biologisch aktives Material aus unterschiedlichen Gründen einzukapseln, z. B. für ein Arzneimittel-Zufuhrsystem, in dem ein Medikament während der Liposomen-Herstellung eingeschlossen und dann dem zu behandelnden Patienten verabreicht wird.

[0009] Teilchen, wie z. B. Latexperlen und Liposomen, wurden auch in Tests eingesetzt. Beispielsweise kann in homogenen Assays ein Enzym in der wässrigen Phase eines mit Antikörper oder Antigen markierten Liposoms eingeschlossen werden. Die Liposomen setzen dann das Enzym in Gegenwart einer Probe und eines Komplements frei. Antikörper- oder Antigen-markierte Liposomen mit wasserlöslichen fluoreszierenden oder nichtfluoreszierenden Farbstoffen (in wässriger Phase eingeschlossen) oder löslichen Lipidfarbstoffen (in der

Lipid-Doppelschicht des Lipidvesikels oder in Latexperlen gelöst) wurden auch für Tests auf Analyten herangezogen, die eine immunochemische Reaktion mit dem oberflächengebundenen Antikörper oder Antigen eingehen können. Es wurden Detergenzien dazu verwendet, die Farbstoffe aus der wässrigen Phase der Liposomen freizusetzen.

Kurzbeschreibung des verwandten Standes der Technik

- [0010] White et al. (White) besprechen „Chemically Produced Excited States. Energy Transfer, Photochemical Reactions, and Light Emission" in J. Am. Chem. Soc. 93, 6286 (1971).
- [0011] McCapra et al. (McCapra) offenbaren „Metal Catalysed Light Emission from a Dioxetan" in Tetrahedron Letters 23 (49), 5225–5228 (1982).
- [0012] Wildes et al. (Wildes) besprechen „The Dioxetane-Sensitized Chemiluminescence of Lanthanide Chelates. A Chemical Source of ‚Monochromatic‘ Light" in J. Am. Chem. Soc. 93(23), 6286–6288 (1971).
- [0013] Handley et al. (Handley) offenbaren „Effects of Heteroatom Substituents on the Properties of 1,2-Dioxetanes" in Tetrahedron Letters 26, 3183 (1985).
- [0014] Zaklika et al. (Zaklika) besprechen „Substituent Effects on the Decomposition of 1,2-Dioxetanes" in J. Am. Chem. Soc. 100, 4916 (1978).
- [0015] EP-A-0.345.776 (McCapra) offenbart spezifische Bindungstests, die einen Sensibilisator als Marker verwenden. Die Sensibilisatoren enthalten jede Gruppe, die – bei Stimulierung durch Anregung mit Strahlung einer oder mehrerer Wellenlängen oder andere chemische oder physikalische Stimulierung (z. B. Elektronentransfer, Elektrolyse, Elektrolumineszenz oder Energietransfer) – einen angeregten Zustand erreichen, der (a) nach Wechselwirkung mit molekularem Sauerstoff molekularen Singulett-Sauerstoff produziert oder (b) nach Wechselwirkung mit einem Leuko-Farbstoff eine reduzierte Form annimmt, die durch Wechselwirkung mit molekularem Sauerstoff wieder in ihren ursprünglichen nicht angeregten Zustand rückgeführt werden kann, was zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt. Beide Wechselwirkung mit dem angeregten Sensibilisator werden unter Zugabe von Reagenzien ein detektierbares Signal liefern.
- [0016] EP-A-0.070.685 (Heller et al. 1) beschreibt eine homogene Nucleinsäure-Hybridisierungsdiagnostik durch strahlungsfreien Energietransfer.
- [0017] Ein lichtsussendendes Polynucleotid-Hybridisierungs-Diagnostikverfahren ist in EP-A-0.070.687 (Heller et al. II) beschrieben.
- [0018] EP-A-515.194 beschreibt Verfahren zur Bestimmung eines Analyten, die jenen der vorliegenden Beschreibung ähneln, und offenbart insbesondere die chemolumineszierende Dioxenverbindung, die weiter unten als Verbindung 9 angeführt ist.
- [0019] In einem Aspekt betrifft die Erfindung eine Verbindung der Formel:



worin X S ist und D und D' Methyl sind. Diese Verbindung ist hierin als Verbindung 11 bezeichnet.

- [0020] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, die einen Latex mit der darin inkorporierten Verbindung 11 umfasst.
- [0021] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten wie in Anspruch 5 definiert. In diesem Verfahren wird das Ausmaß an Lumineszenz mit der Analytenmenge im Medium in Beziehung gesetzt.
- [0022] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Set, das eine abgepackte Kombination von Folgendem umfasst: (1) einer Zusammensetzung, die ein suspendierbares Latexteilchen umfasst, das Verbindung 11 enthält, und (2) eines Photosensibilisators. Das Teilchen besitzt ein daran gebundenes spezifisches Bindungspaar(sbp-) Element. Der Photosensibilisator kann in seinem angeregten Zustand Sauerstoff in dessen Singulett-Zustand anregen.

BESCHREIBUNG SPEZIFISCHER AUSFÜHRUNGSFORMEN

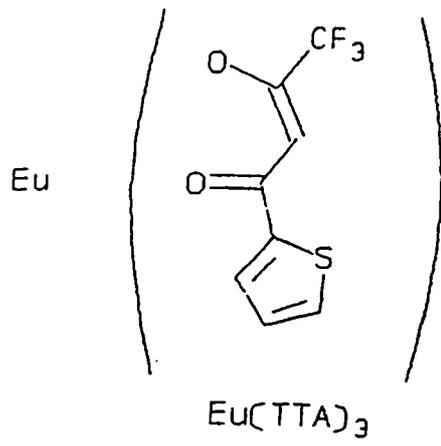
- [0023] Die vorliegende Erfindung betrifft chemolumineszierende Verbindungen, die unter Aktivierung durch Sin-

gulett-Sauerstoff rasch abklingend chemolumineszierendes Licht aussenden; im Allgemeinen besitzen sie eine Halbwertszeit von 0,5 Sekunden bis zu 30 Minuten, vorzugsweise 0,5 bis 30 Sekunden, üblicherweise weniger als 20 Sekunden. Außerdem können die vorliegenden chemolumineszierenden Verbindungen hohe chemolumineszierende Quantenausbeute aufweisen, nachdem sie mit Singulett-Sauerstoff angeregt wurden, d. h. im Allgemeinen von 0,1 bis 0,9, üblicherweise von 0,1 bis 0,6, vorzugsweise von 0,2 bis 0,4. Das vom Metallchelate in den vorliegenden Zusammensetzungen nach Aktivierung ausgesandte chemolumineszierende Licht besitzt im Allgemeinen eine Wellenlänge von etwa 550 bis 700 nm, üblicherweise von mehr als 600 nm. Die chemolumineszierenden Verbindungen der Erfindung eignen sich besonders für Lumineszenzassays. Beispielsweise verhindert das Aussenden bei langer Wellenlänge Störungen aufgrund der Serumabsorption in Tests hinsichtlich Blut- oder Serumproben. Die hohe Quantenausbeute verbessert die Detektierbarkeit, und die kurze Lebensdauer sorgt für eine weitere Verbesserung der Detektierbarkeit, indem bewirkt wird, dass das gesamte ausgesandte Licht in einem kurzen Puls und nicht über einen langen Zeitraum abgegeben wird. Dies kann höhere Lichtintensität bei niedrigeren Quantenausbeuten ermöglichen.

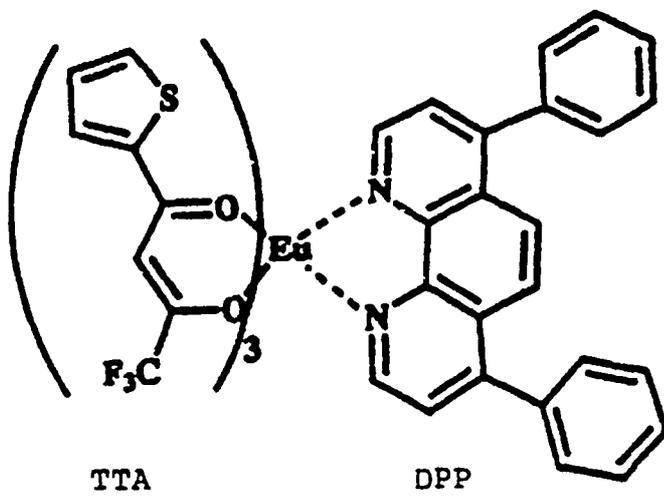
[0024] Die Quantenausbeute von Chemolumineszenz der vorliegenden chemolumineszierenden Verbindungen bei Aktivierung durch Singulett-Sauerstoff ist im Allgemeinen etwa 10- bis 100fach höher, vorzugsweise 10- bis 50fach höher, als jene, die bei getrennter Bestrahlung der Komponenten der Zusammensetzung zu beobachten wäre. Außerdem wird die Abklingrate der Chemolumineszenz aufgrund einiger der vorliegenden Zusammensetzungen deutlich erhöht. Diese Eigenschaften machen die Zusammensetzungen für Assays zur Bestimmung von Analyten äußerst interessant.

[0025] Bevor mit einer ausführlichen Beschreibung spezifischer Ausführungsformen der Erfindung fortgefahren wird, werden einige Begriffe definiert und im Detail beschrieben.

[0026] Metallligand: Eine Verbindung, in der zwei oder mehr Atome des gleichen Moleküls mit einem Metall koordinieren können, um ein Metallchelate zu bilden. Die Metallchelate, die einen Teil der Zusammensetzungen der Erfindung bilden können, umfassen ein Metall, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Europium, Terbium, Dysprosium, Samarium, Osmium und Ruthenium. Eines der obigen Metalle ist mit einem oder mehreren Metallliganden koordiniert; es kann sich z. B. um 3-(2-Thienoyl)-1,1,1-trifluoracetone (TTA), 3-Benzoyl-1,1,1-trifluoracetone (BFTA), 3-Naphthoyl-1,1,1-trifluoracetone (NPPTA), 2,2-Dimethyl-4-perfluorbutyryl-3-butanone (fod), 2,2'-Dipyridyl (bpy), Phenanthroline (phen), Salicylsäure, Phenanthrolinecarbonsäure, Bipyridylcarbonsäure, Aza-Kronenether, Trioctylphosphinoxid, Azakryptandene usw. handeln. Üblicherweise ist das Metall im Metallchelate zumindest sechsfach koordiniert, doch es kann auch – je nach den Metallliganden – achtfach oder noch höher koordiniert sein. Das Metallchelate ist ungeladen, d. h. die Anzahl saurer Gruppen, die seine Liganden bereitstellen, entspricht der Oxidationsstufe des Metalls. Üblicherweise sind die Metallliganden relativ hydrophob, um dem Metallchelate in nichtpolaren Lösungsmitteln Löslichkeit zu verleihen. Seltenerdmetalle besitzen üblicherweise eine Oxidationsstufe von drei, Ruthenium besitzt eine Oxidationsstufe von zwei, und Osmium besitzt ebenfalls eine Oxidationsstufe von zwei. Veranschaulichende und keinesfalls einschränkende Beispiele für solche Metallchelate sind die folgenden:

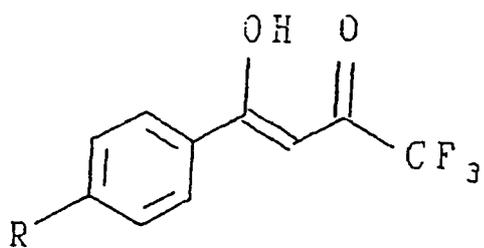


(3a)



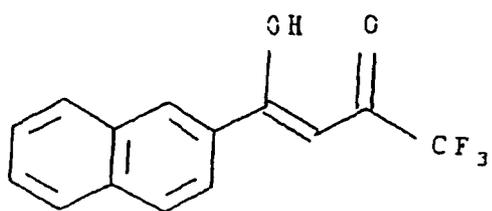
(3b)

[0027] Ein TTA in 3(a) oder 3(b) kann durch Folgendes ersetzt sein:

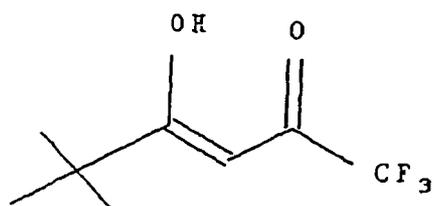


(3c) R = H

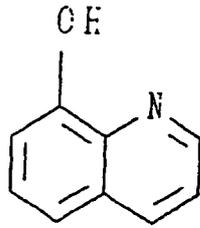
(3d) R = CO₂H



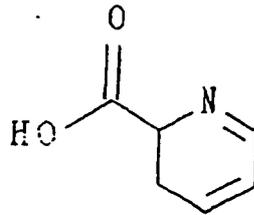
(3e)



(3f)

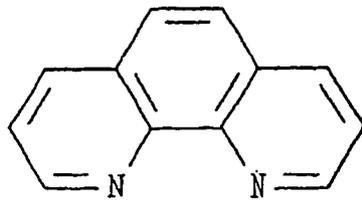


(3 g)

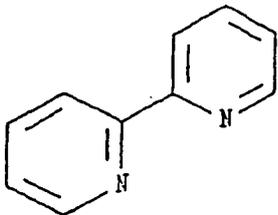


(3 h)

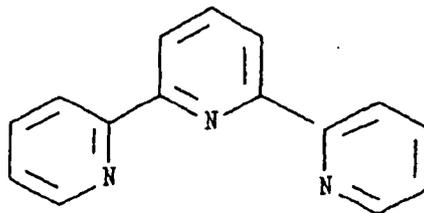
worin DPP (Diphenylpheanthrolin) in 3(b) durch Folgendes ersetzt sein kann:



(3 i)

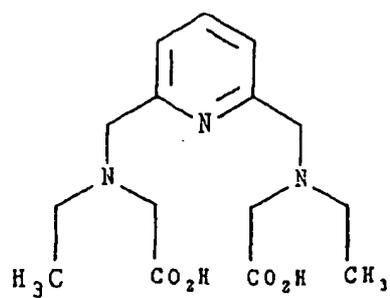


(3 j)

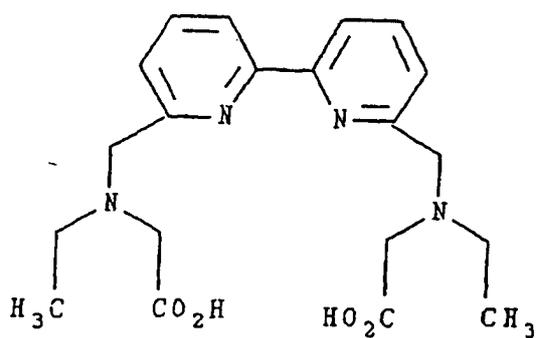


(3 k)

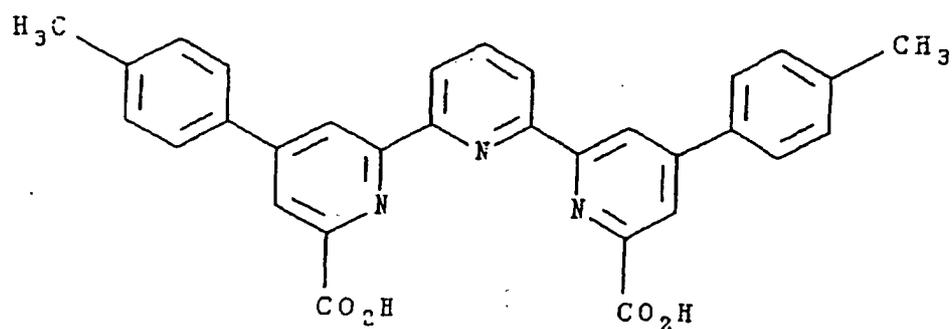
[0028] Zwei TTAs in 3(a) und 3(b) können unabhängig voneinander durch Verbindungen ersetzt sein, die aus Folgenden ausgewählt sind:



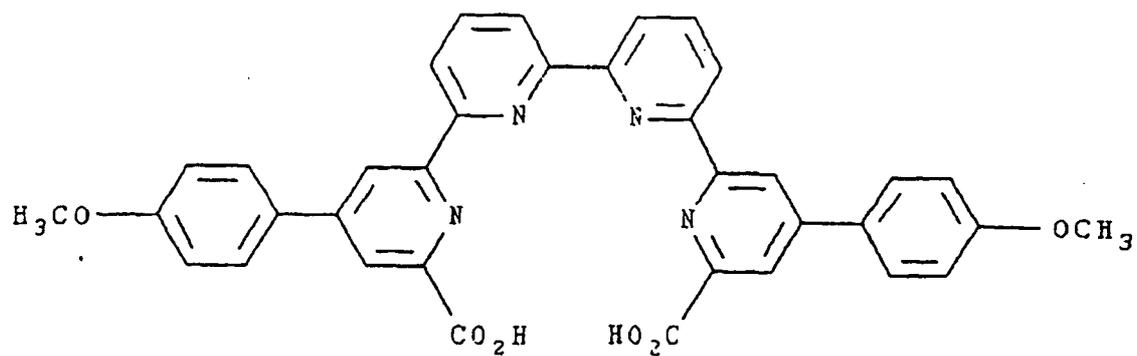
(31)



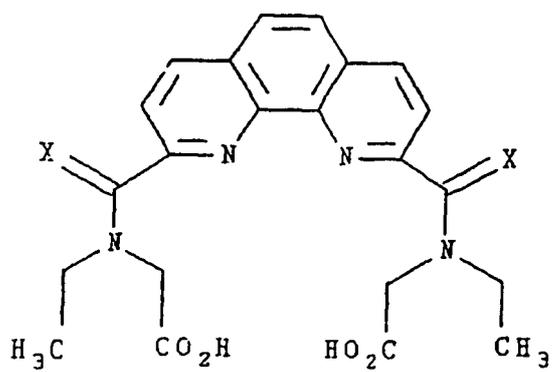
(3m)



(3n)

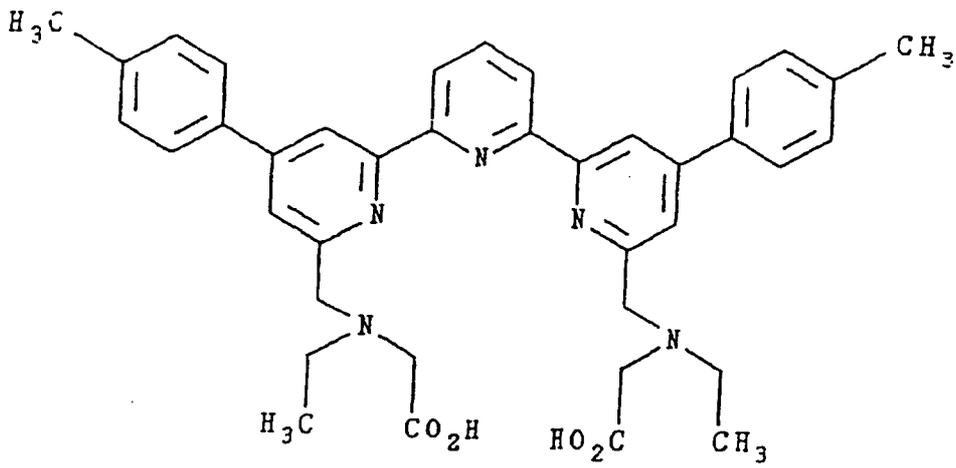


(30)

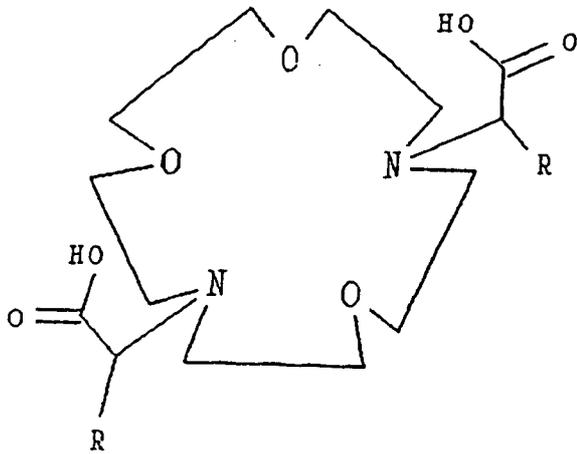


(3p) $\text{X} = \text{O}$

(3q) $\text{X} = \text{H}_2$



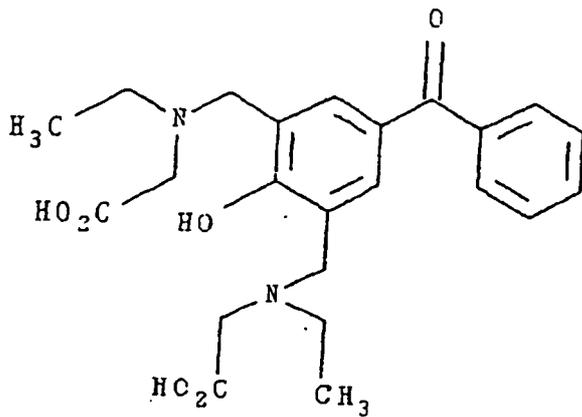
(3 r)



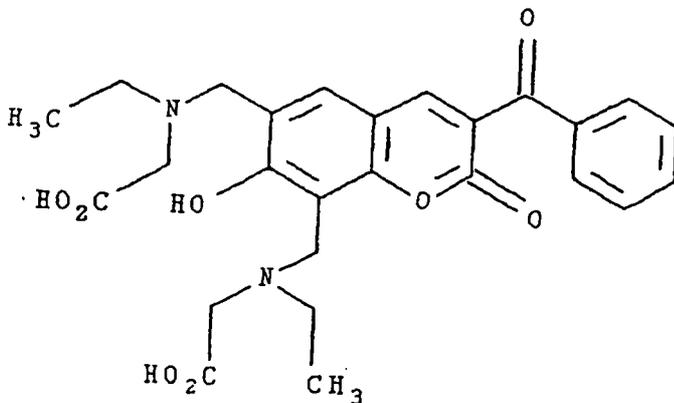
(3 s) R = H

(3 t) R = C₆H₅

[0029] Drei TTAs können unabhängig voneinander durch Verbindungen ersetzt sein, die aus Folgenden ausgewählt sind:



(3 u)



(3 v)

[0030] Viele dieser Metallliganden und Metallchelate sind auf dem Gebiet bekannt und im Handel erhältlich. Im Allgemeinen können Metallchelate aus Metallliganden hergestellt werden, indem das Metallchlorid mit dem gewünschten Anteil an Metallligand-Molekülen in einem organischen Lösungsmittel, z. B. Acetonitril, und ausreichend Base, z. B. Pyridin, kombiniert wird, um die freigesetzte Salzsäure aufzunehmen. Beispielsweise können Metallchelate nach einem Verfahren hergestellt werden, das von Shinha, A. P., in „Fluorescences and laser action in rare earth chelates“, Spectroscopy Inorganic Chemistry 2, 255–288 (1971), beschrieben wurde.

[0031] Arylgruppe: Ein organischer Rest, abgeleitet von einem aromatischen Kohlenwasserstoff durch Entfernung eines Atoms, umfassend einen oder mehrere aromatische Ringe, üblicherweise ein bis vier aromatische Ringe, die im Allgemeinen fünf- oder sechsgliedrige Ringe sind, z. B. Phenyl (von Benzol), Naphthyl (von Naphthalin), Biphenylenyl, Azulenyl, Anthryl, Phenanthrenyl, Pyridyl, Indolyl, Benzofuranyl, Benzothiophenyl, Chinolinyl, Isochinolinyl, Carbazolyl, Acridinyl, Imidazolyl, Thiazolyl, Pyrazinyl, Pyrimidinyl, Purinyl, Pteridinyl usw.

[0032] Aralkyl: Ein organischer Rest mit einer Alkylgruppe, an die eine Arylgruppe gebunden ist, z. B. Benzyl, Phenethyl, 3-Phenylpropyl, 1-Naphthylethyl usw.

[0033] Elektronen-Donorgruppe: Ein Substituent, der, wenn er an ein Molekül gebunden ist, dieses so polarisieren kann, dass die Elektronen-Donorgruppe im Vergleich zu einem anderen Abschnitt des Moleküls elektronenarm und positiv geladen wird, d. h. eine verringerte Elektronendichte aufweist. Solche Gruppen sind u. a. Amine, Ether, Thioether, Phosphine, Hydroxy, Oxyanionen, Mercaptane und deren Anionen, Sulfide usw.

[0034] Alkyl: Ein einwertiger, verzweigter oder unverzweigter Rest, der von einem aliphatischen Kohlenwasserstoff durch Entfernung eines H-Atoms abgeleitet wird; dazu zählen sowohl niedere als auch höhere Alkyle.

[0035] Alkylrest: Ein Substituent aus zwei oder mehr Alkylgruppen, die unabhängig voneinander niedere oder höhere Alkylgruppen sein können, die über eine Funktionalität, wie z. B. einen Ether, einschließlich Thioether,

ein Amid, einen Ester u. dgl. miteinander verbunden sein können.

[0036] Niederes Alkyl: Alkyl mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen z. B. Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Isopropyl, Isobutyl, Pentyl, Isopentyl usw.

[0037] Höheres Alkyl: Alkyl mit mehr als 6 Kohlenstoffatomen, üblicherweise mit 6 bis 20 Kohlenstoffatomen, z. B. Hexyl, Heptyl, Octyl usw.

[0038] Alkylden: Ein zweiwertiger organischer Rest, der von einem aliphatischen Kohlenwasserstoff abgeleitet ist, z. B. Ethyliden, worin zwei Wasserstoffatome vom gleichen Kohlenstoffatom entfernt sind.

[0039] Substituiert: Ein Wasserstoffatom oder ein Molekül wurde durch ein anderes Atom ersetzt, das ein einzelnes Atom, wie z. B. Halogen usw., oder ein Teil einer Atomgruppe sein kann, die eine Funktionalität bildet, z. B. ein Substituent aus 1 bis 50 Atomen (mit Ausnahme der erforderlichen Wasserstoffatome, die zur Erfüllung der Wertigkeiten solcher Atome benötigt werden), welche Atome unabhängig voneinander aus der Gruppe bestehend aus Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor ausgewählt sind und die an ein oder mehrere Metallatome gebunden sein können oder auch nicht.

[0040] Analyt: Die zu detektierende Verbindung oder Zusammensetzung. Der Analyt kann aus einem Element eines spezifischen Bindungspaares (sbp) bestehen und kann ein Ligand sein, der einwertig (monoepitopisch) oder mehrwertig (polyepitopisch), üblicherweise ein Antigen oder Hapten ist und eine einzelne Verbindung oder eine Mehrzahl von Verbindungen, die zumindest eine gemeinsame Epitop- oder Determinantenstelle aufweisen, ist. Der Analyt kann ein Teil einer Zelle, wie z. B. Bakterien, oder eine Zelle sein, die ein Blutgruppen-Antigen trägt, z. B. A, B, D usw., oder er kann ein HLA-Antigen oder ein Mikroorganismus sein, z. B. Bakterien, Pilze, Protozoen oder Viren.

[0041] Die mehrwertigen Ligandenanalyten sind normalerweise Poly(aminosäuren), d. h. Polypeptide und Proteine, Polysaccharide, Nucleinsäuren und Kombinationen davon. Solche Kombinationen sind z. B. Komponenten von Bakterien, Viren, Chromosomen, Genen, Mitochondrien, Kernen, Zellmembranen u. dgl.

[0042] In den meisten Fällen weisen die Polyepitop-Ligandenanalyten der Erfindung ein Molekulargewicht von zumindest etwa 5.000, noch häufiger von zumindest etwa 10.000, auf. In der Kategorie der Poly(aminosäuren) weisen die Poly(aminosäuren) von Interesse im Allgemeinen ein Molekulargewicht von etwa 5.000 bis 5.000.000, noch häufiger von üblicherweise etwa 20.000 bis 1.000.000, auf; unter den Hormonen von Interesse reichen die Molekulargewichte üblicherweise von etwa 5.000 bis 60.000.

[0043] Eine Vielzahl von Proteinen kann als zugehörig zu einer Familie angesehen werden – einer Familie von Proteinen mit ähnlichen strukturellen Merkmalen, Proteinen mit bestimmten biologischen Funktionen, Proteinen, die mit spezifischen Mikroorganismen, besonders krankheitsverursachenden Mikroorganismen, in Verbindung stehen, usw. Solche Proteine sind z. B. Immunglobuline, Cytokine, Enzyme, Hormone, Krebsantigene, Nährstoffmarker, gewebespezifische Antigene usw.

[0044] Nachstehend werden Klassen strukturverwandter Proteine angeführt: Protamine, Histone, Albumine, Globuline, Skleroproteine, Phosphoproteine, Mucoproteine, Chromoproteine, Lipoproteine, Nucleoproteine, Glykoproteine, T-Zellen-Rezeptoren, Proteoglykane, HLA, unklassifizierte Proteine, z. B. Somatotropin, Pro-lactin, Insulin, Pepsin, Proteine im menschlichem Plasma, wie z. B. Blutgerinnungsfaktoren, andere polymere Materialien, wie z. B. Mucopolysaccharide und Polysaccharide, Mikroorganismen, wie z. B. Bakterien, Viren und Pilze.

[0045] Die Monoepitop-Ligandenanalyten besitzen im Allgemeinen ein Molekulargewicht von etwa 100 bis 2.000, noch häufiger von 125 bis 1.000. Zu den Analyten zählen Medikamente, Metaboliten, Pestizide, Schmutzstoffe u. dgl. Unter den Medikamenten von Interesse sind Alkaloide, Steroide, Steroid-mimetische Substanzen, Lactame, Aminoalkylbenzole, Benzoheterozyklen, Purine, von Marihuana Abgeleitete, Hormone, Vitamine, Prostaglandine, trizyklische Antidepressiva, Anti-Neoplastika, Antibiotika, Nucleoside und Nucleotide, verschiedene individuelle Medikamente, z. B. Methadon, Meprobamat, Serotonin, Meperidin, Lidocain, Procainamid, Acetylprocainamid, Propranolol, Griseofulvin, Valproinsäure, Butyrophenone, Antihistamine, Chloramphenicol, anticholinergische Medikamente, z. B. Atropine, mit Krankheitszuständen assoziierte Metaboliten, z. B. Spermin, Galactose, Phenylbranztraubensäure und Typ-1-Porphyrin, Aminoglykoside, polyhalogenierte Biphenyle, Phosphatester, Thiophosphate, Carbamate, polyhalogenierte Sulfenamide.

[0046] Für Rezeptoranalyten reichen die Molekulargewichte im Allgemeinen von 10.000 bis 2×10^8 , noch häufiger von 10.000 bis 10^6 . Für Immunglobuline, IgA, IgG, IgE und IgM, reichen die Molekulargewichte im Allgemeinen von etwa 160.000 bis etwa 10^6 . Enzyme besitzen normalerweise ein Molekulargewicht von etwa 10.000 bis 1.000.000. Natürliche Rezeptoren können in Bezug auf das Molekulargewicht stark variieren – im Allgemeinen von zumindest etwa 25.000 bis zu 10^6 oder mehr; dazu zählen Materialien wie Avidin, DNA, RNA, Thyroxin-Bindungsglobulin, Thyroxin-bindendes Präalbumin, Transcortin usw.

[0047] Der Ausdruck „Analyt“ umfasst überdies Polynucleotid-Analyten wie die unten definierten Polynucleotide. Dazu zählen m-RNA, r-RNA, t-RNA, DNA, DNA-RNA-Duplexe usw. Der Ausdruck Analyt umfasst auch Rezeptoren, die Polynucleotid-Bindungsmittel sind, z. B. Restriktionsenzyme, Aktivatoren, Repressoren, Nuclelease, Polymerasen, Histone, Reparaturenzyme, Chemotherapeutika u. dgl.

[0048] Der Analyt kann ein direkt in einer Probe gefundenes Molekül sein, z. B. eine Körperflüssigkeit aus

einem Wirt. Die Probe kann direkt untersucht oder vorbehandelt werden, um den Analyten leichter detektierbar zu machen. Außerdem kann der Analyt von Interesse bestimmt werden, indem ein Mittel detektiert wird, das den Analyten von Interesse nachweist, z. B. ein sbp-Element, das komplementär zum Analyten von Interesse ist, dessen Gegenwart nur dann detektiert wird, wenn der Analyt von Interesse in einer Probe vorhanden ist. Somit wird das den Analyten nachweisende Mittel zum in einem Assay detektierten Analyten. Die Körperflüssigkeit kann z. B. Harn, Blut, Plasma, Serum, Speichel, Sperma, Kot, Sputum, Rückenmarksflüssigkeit, Tränenflüssigkeit, Schleim und dergleichen sein.

[0049] Element eines spezifischen Bindungspaares („sbp-Element“): Eines von zwei unterschiedlichen Molekülen mit einem Bereich auf der Oberfläche oder in einem Hohlraum, der sich spezifisch an eine bestimmte räumliche und polare Struktur des anderen Moleküls bindet und dadurch als komplementär dazu definiert ist. Die sbp-Elemente werden als Ligand und Rezeptor (Anti-Ligand) bezeichnet. Sie sind üblicherweise Elemente eines immunologischen Paares, wie z. B. Antigen-Antikörper, obwohl andere spezifische Bindungspaare, wie z. B. Biotin-Avidin, Hormon-Hormon-Rezeptoren, Nucleinsäure-Duplexe, IgG-Protein A, Polynucleotid-Paare, wie z. B. DNA-DNA, DNA-RNA u. dgl., nicht immunologische Paare sind, aber gemäß vorliegender Erfindung und in der Definition von sbp-Element enthalten sind.

[0050] Polynucleotid: Eine Verbindung oder Zusammensetzung, die ein polymeres Nucleotid mit (im natürlichen Zustand) etwa 50 bis 500.000 oder mehr Nucleotiden und (im isolierten Zustand) etwa 15 bis 50.000 oder mehr Nucleotiden, üblicherweise mit etwa 15 bis 20.000 Nucleotiden, noch häufiger mit 15 bis 10.000 Nucleotiden. Das Polynucleotid enthält Nucleinsäuren aus jeder beliebigen Quelle in gereinigter oder ungereinigter Form, in der Natur vorkommend oder synthetisch produziert, z. B. DNA (dsDNA und ssDNA) und RNA, üblicherweise DNA; Beispiele sind t-RNA, m-RNA, r-RNA, Mitochondrien-DNA und -RNA, Chloroplasten-DNA und -RNA, DNA-RNA-Hybride oder Gemische davon, Gene, Chromosomen, Plasmide, Genome von biologischem Material, wie z. B. Mikroorganismen, beispielsweise aus Bakterien, Hefen, Viren, Viroiden, Schimmelpilzen, Pilzen, Pflanzen, Tieren, Menschen, und Fragmente davon und dergleichen.

[0051] Ligand: Jede organische Verbindung, für die ein Rezeptor natürlich vorkommt oder hergestellt werden kann.

[0052] Ligandenanalog: Ein modifizierter Ligand, ein organischer Rest oder Analytenanalog, üblicherweise mit einem Molekulargewicht von über 100, der mit dem analogen Liganden um einen Rezeptor konkurrieren kann, wobei die Modifikation ein Mittel bereitstellt, um ein Ligandenanalog mit einem anderen Molekül zu verbinden. Das Ligandenanalog unterscheidet sich vom Liganden üblicherweise um mehr als eine Substitution eines Wasserstoffs durch eine Bindung, die das Ligandenanalog mit einem Hub oder Marker verbindet, was aber nicht der Fall sein muss. Das Ligandenanalog kann sich in ähnlicher Weise wie der Ligand an den Rezeptor binden. Das Analog könnte beispielsweise ein Antikörper sein, der gegen den Idiotyp eines Antikörpers gegen den Liganden gebildet ist.

[0053] Rezeptor („Antiligand“): Jede Verbindung oder Zusammensetzung, die eine bestimmte räumliche und polare Struktur eines Moleküls erkennen kann, wie z. B. eine Epitop- oder Determinantenstelle. Beispiele für Rezeptoren sind natürlich vorkommende Rezeptoren, z. B. Thyroxin-Bindungsglobulin, Antikörper, Enzyme, Fab-Fragmente, Lectine, Nucleinsäuren, Protein A, Komplementkomponente C1q und dergleichen.

[0054] Spezifische Bindung: Eines von zwei unterschiedlichen Molekülen erkennt spezifisch das andere (im Vergleich zu deutlich verringerter Erkennung anderer Moleküle). Im Allgemeinen besitzen die Moleküle Bereiche auf ihren Oberflächen oder in Hohlräumen, die zu spezifischer Erkennung zwischen den zwei Molekülen führen. Beispiele für spezifische Bindung sind Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen, Enzym-Substrat-Wechselwirkungen, Polynucleotid-Wechselwirkungen usw.

[0055] Nichtspezifische Bindung: Nichtkovalente Bindung zwischen Molekülen, die relativ unabhängig von spezifischen Oberflächenstrukturen ist. Nichtspezifische Bindung kann das Ergebnis mehrerer Faktoren sein, wie z. B. der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Molekülen.

[0056] Antikörper: Ein Immunglobulin, das sich spezifisch an eine bestimmte räumliche und polare Struktur eines weiteren Moleküls bindet und dadurch als komplementär dazu definiert ist. Der Antikörper kann monoklonal oder polyklonal sein und durch auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Verfahren hergestellt werden, z. B. durch Immunisierung eines Wirts und Sammeln von Seren (polyklonal), durch Produktion kontinuierlicher Hybrid-Zelllinien und Sammeln des sekretierten Proteins (monoklonal) oder durch Klonieren und Expressieren von Nucleotidsequenzen oder von deren mutagenisierten Versionen, die zumindest für die Aminosäuresequenzen kodieren, die für die spezifische Bindung natürlicher Antikörper erforderlich sind. Antikörper können ein komplettes Immunglobulin oder ein Fragment davon umfassen, welche Immunglobuline die verschiedenen Klassen und Isotypen umfassen, IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a und IgG3, IgM usw. Fragmente davon sind z. B. Fab, Fv und F(ab'), Fb' u. dgl. Außerdem kommen gegebenenfalls Aggregate, Polymere und Konjugate von Immunglobulinen oder ihren Fragmenten in Frage, sofern die Bindungsaffinität für ein bestimmtes Molekül aufrechterhalten wird.

[0057] Ein Substituent mit 1 bis 50 Atomen (mit Ausnahme der erforderlichen Wasserstoffatome, die zur Erfüllung der Wertigkeiten solcher Atome notwendig sind), welche Atome unabhängig voneinander aus der Grup-

pe bestehend aus Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor ausgewählt sind: Ein organischer Rest. Der organische Rest besitzt 1 bis 50 Atome, abgesehen von der erforderlichen Anzahl an Wasserstoffatomen, die zur Erfüllung der Wertigkeiten der Atome im Rest notwendig sind. Im Allgemeinen ist das vorherrschende Atom Kohlenstoff (C), es kann aber auch Sauerstoff (O), Stickstoff (N), Schwefel (S), Phosphor (P) sein, worin O, N, S oder P – falls sie vorhanden sind – an Kohlenstoff oder an eines oder mehrere voneinander, an Wasserstoff oder an ein Metallatom gebunden sind, um verschiedene funktionelle Gruppen zu bilden, z. B. Carbonsäuren, Alkohole, Thiole, Carboxamide, Carbamate, Carbonsäureester, Sulfonsäureester, Phosphorsäuren, Phosphorsäureester, Harnstoffe, Carbamate, Phosphoramide, Sulfonamide, Ether, Sulfide, Thioether, Olefine, Acetylene, Amine, Ketone, Aldehyde, Nitrile und dergleichen. Veranschaulichende Beispiele für solche organischen Reste oder Gruppen sind u. a. Alkyl, Alkylidin, Aryl, Aralkyl und Alkyl, Aryl und Aralkyl, substituiert mit einer oder mehreren der oben erwähnten Funktionalitäten.

[0058] Linkergruppe: Die kovalente Bindung zwischen Molekülen. Die Linkergruppe hängt von der Beschaffenheit der gebundenen Moleküle ab, d. h. vom Photosensibilisator, der chemolumineszierenden Verbindung, dem sbp-Element oder einem Molekül, das mit einem Teilchen assoziiert ist oder einen Teil davon bildet. Funktionelle Gruppen, die auf einem Photosensibilisator oder einer chemolumineszierenden Verbindung normalerweise vorhanden sind oder eingeführt werden, dienen dazu, diese Materialien an ein sbp-Element oder ein Teilchen, wie z. B. ein Latexteilchen, zu binden.

[0059] In den meisten Fällen werden Carbonylfunktionalitäten verwendet, sowohl Oxocarbonyl, z. B. Aldehyd, als auch Nicht-Oxocarbonyl (einschließlich Stickstoff- und Schwefelanalogen), z. B. Carboxy, Amidin, Amidat, Thiocarboxy und Thionocarboxy.

[0060] Alternative Funktionalitäten zu Oxo sind aktives Halogen, Diazo, Mercapto, Olefin, insbesondere aktiviertes Olefin, Amino, Phosphoro und dergleichen. Eine Beschreibung von Linkergruppen findet sich in US-Patent 3.817.837, das hierin durch Verweis aufgenommen ist.

[0061] Gemeinsame Funktionalitäten bei der Bildung einer kovalenten Bindung zwischen der Linkergruppe und dem zu konjugierenden Molekül sind Alkylamin, Amidin, Thioamid, Ether, Harnstoff, Thioharnstoff, Guanidin, Azo, Thioether, Carboxylat, Sulfonat sowie Phosphatester, Amide und Thioester.

[0062] In den meisten Fällen besitzen der Photosensibilisator und die chemolumineszierende Verbindung eine Nicht-Oxocarbonylgruppe, umfassend Stickstoff- und Schwefelanaloge, eine Phosphatgruppe, eine Aminogruppe, Alkylierungsmittel, wie z. B. Halo- oder Tosylalkyl, Oxy (Hydroxyl oder das Schwefelanalog Mercapto), Oxocarbonyl (z. B. Aldehyd oder Keton) oder aktives Olefin wie etwa ein Vinylsulfon oder α,β -ungesättigter Ester. Diese Funktionalitäten sind an Aminogruppen, Carboxylgruppen, aktive Olefine, Alkylierungsmittel, z. B. Bromacetyl, gebunden. Wenn ein Amin und Carbonsäure oder das Stickstoffderivat davon oder Phosphorsäure verbunden werden, entstehen Amide, Amidine und Phosphoramide. Wenn Mercaptan und aktiviertes Olefin verbunden werden, entstehen Thioether. Wenn Aldehyd und ein Amid unter reduzierenden Bedingungen verbunden werden, entsteht ein Alkylamin. Wenn eine Carbonsäure oder Phosphorsäure und ein Alkohol verbunden werden, entstehen Ester.

[0063] Photosensibilisator: Ein Sensibilisator für die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff, üblicherweise durch Anregung mit Licht. Der Photosensibilisator kann photoaktivierbar sein (z. B. Farbstoffe und aromatische Verbindungen) oder chemisch aktiviert werden (z. B. Enzyme und Metallsalze). Wenn die Anregung durch Licht erfolgt, ist der Photosensibilisator üblicherweise eine Verbindung, die aus kovalent gebundenen Atomen besteht, wobei üblicherweise auch mehrere konjugierte Doppel- oder Dreifachbindungen vorhanden sind. Die Verbindung sollte Licht im Wellenlängenbereich von 200 – 1100 nm, üblicherweise 300 – 1000 nm, vorzugsweise 450 – 950 nm, absorbieren, wobei der Extinktionskoeffizient an ihrem Extinktionsmaximum bei der Anregungswellenlänge mehr als $500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, vorzugsweise zumindest $5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, noch bevorzugter zumindest $50.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, beträgt. Die Lebensdauer eines nach Lichtabsorption in Abwesenheit von Sauerstoff erzeugten angeregten Zustands beträgt üblicherweise zumindest 100 ns, vorzugsweise zumindest 1 ms. Im Allgemeinen muss die Lebensdauer ausreichend lang sein, um Energietransfer zu Sauerstoff zu ermöglichen, der normalerweise – je nach Medium – in Konzentrationen im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-3} M vorhanden ist. Der angeregte Zustand des Sensibilisators weist üblicherweise eine andere Spin-Quantenzahl (S) als der Grundzustand auf und ist üblicherweise ein Triplett (S = 1), wenn – wie dies üblicherweise der Fall ist – der Grundzustand ein Singulett (S = 0) ist. Vorzugsweise besitzt der Sensibilisator eine hohe Zwischensystemübergangsausbeute. Die Lichtanregung eines Sensibilisators führt zum langlebigeren Zustand (üblicherweise Triplett, wobei der Wirkungsgrad zumindest 10%, günstigerweise zumindest 40%, vorzugsweise mehr als 80% beträgt). Der Photosensibilisator ist üblicherweise unter den Testbedingungen zumindest schwach fluoreszierend (Quantenausbeute üblicherweise weniger als 0,5, vorzugsweise weniger als 0,1).

[0064] Photosensibilisatoren, die durch Licht anzuregen sind, sind relativ photostabil und reagieren nicht wirkungsvoll mit Singulett-Sauerstoff. Mehrere strukturelle Merkmale sind in den meisten nützlichen Sensibilisatoren vorhanden. Die meisten Sensibilisatoren besitzen zumindest eine und häufig drei oder mehr konjugierte Doppel- oder Dreifachbindungen, die in einer starren und oft aromatischen Struktur gebunden sind. Sie enthalten häufig zumindest eine Gruppe, die Zwischensystemübergang beschleunigt, z. B. eine Carbonyl- oder Imi-

nogruppe, oder ein schweres Atom, das aus den Reihen 3–6 des Periodensystems ausgewählt ist, insbesondere Iod oder Brom, oder sie sie können erweiterte aromatische Strukturen sein. Typische Sensibilisatoren sind z. B. Aceton, Benzophenon, 9-Thioxanthon, Eosin, 9,10-Dibromanthracen, Methylenblau, Metalloporphyrine, z. B. Hämatoporphyrin, Phthalocyanine, Chlorophyll, Diodeosin, Buckminsterfulleren usw. sowie Derivate dieser Verbindungen mit Substituenten aus 1 bis 50 Atomen, um solche Verbindungen lipophiler oder hydrophiler zu machen, und/oder als Bindungsgruppen, beispielsweise zur Bindung an ein sbp-Element. Beispiele für andere hierin geeignete Photosensibilisatoren sind jene, die die obigen Eigenschaften aufweisen und in N. J. Turro, „Molecular Photochemistry“, S. 132, W. A. Benjamin Inc., N. Y., USA, 1965 aufgelistet sind.

[0065] Die Photosensibilisatoren sind vorzugsweise relativ unpolar, um das Lösen in lipophilem Medium zu gewährleisten, wenn der Photosensibilisator in ein Öltröpfchen, Liposom, Latexteilchen usw. inkorporiert wird.

[0066] Die hierin geeigneten Photosensibilisatoren umfassen auch andere Substanzen und Zusammensetzungen, die Singulett-Sauerstoff mit oder – was weniger bevorzugt ist – ohne Aktivierung durch eine externe Lichtquelle erzeugen können. So wurde gezeigt, dass z. B. Molybdat- (MoO_4^-) Salze und Chlorperoxidase sowie Myeloperoxidase plus Bromid- oder Chloridionen (Kanofsky, J. Biol. Chem. 259, 5596 (1983)) die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in Singulett-Sauerstoff und Wasser katalysiert. Beide dieser Zusammensetzungen können beispielsweise in Teilchen enthalten sein, an die ein sbp-Element gebunden ist, und im Assayverfahren verwendet werden, in dem Wasserstoffperoxid als Zusatzreagens vorgesehen ist, Chlorperoxidase an eine Oberfläche gebunden wird und Molybdat in die wässrige Phase eines Liposoms inkorporiert wird. Im Schutzbereich der Erfindung sind als Photosensibilisatoren auch Verbindungen enthalten, die keine echten Sensibilisatoren sind, jedoch bei Aktivierung durch Wärme, Licht oder chemische Aktivierung ein Molekül Singulett-Sauerstoff freisetzen. Die bekanntesten Elemente dieser Klasse von Verbindungen sind Endoperoxide, wie z. B. 1,4-Biscarboxyethyl-1,4-naphthalin-endoperoxid, 9,10-Diphenylanthracen-9,10-endoperoxid und 5,6,11,12-Tetraphenyl-naphthalin-5,12-endoperoxid. Erwärmung oder direkte Lichtabsorption durch diese Verbindungen setzt Singulett-Sauerstoff frei.

[0067] Träger oder Oberfläche: Eine Oberfläche, die aus einem porösen oder nichtporösen wasserunlöslichen Material besteht. Die Oberfläche kann jede beliebige Form aufweisen (Streifen, Stab, Teilchen, z. B. Perle, und dergleichen). Die Oberfläche kann hydrophil sein oder hydrophil gemacht werden; Beispiele sind anorganische Pulver, wie z. B. Kieselsäure, Magnesiumsulfat und Aluminiumoxid; natürliche polymere Materialien, insbesondere Cellulosematerialien und von Cellulose abgeleitete Materialien, etwa faserhaltige Papiere, wie z. B. Filterpapier, Chromatographiepapier usw.; synthetische oder modifizierte natürlich vorkommende Polymere, wie z. B. Nitrocellulose, Celluloseacetat, Poly(vinylchlorid), Polyacrylamid, vernetztes Dextran, Agarose, Polyacrylat, Polyethylen, Polypropylen, Poly(4-methylbuten), Polystyrol, Polymethacrylat, Poly(ethylenterephthalat), Nylon, Poly(vinylbutyrat) usw.; entweder alleine oder zusammen mit anderen Materialien verwendet; als Bioglas erhältliches Glas, Keramikmaterialien, Metalle und dergleichen. Natürliche oder synthetische Strukturen wie z. B. Liposomen, Phospholipidvesikel und Zellen, kommen ebenfalls in Frage.

[0068] Die Bindung von sbp-Elementen an den Träger oder die Oberfläche kann durch allgemein bekannte Techniken erfolgen; diese sind in der Literatur ausgiebig beschrieben. Siehe z. B. „Immobilized Enzymes“, Ichiro Chibata, Halsted Press, New York (1978) und Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 245, 3059 (1970).

[0069] Teilchen: Teilchen mit einem Durchmesser von zumindest etwa 20 nm und höchstens etwa 20 μm , üblicherweise zumindest etwa 40 nm und weniger als etwa 10 μm , vorzugsweise von etwa 0,10 bis 2 μm , normalerweise mit einem Volumen von weniger als 1 Picoliter. Das Teilchen kann organisch oder anorganisch, quellfähig oder nicht quellfähig, porös oder nicht porös sein, eine Dichte (vorzugsweise eine an Wasser heranreichende Dichte) von im Allgemeinen etwa 0,7 bis etwa 1,5 g/l aufweisen, vorzugsweise in Wasser suspendierbar sein und aus einem Material bestehen, das lichtdurchlässig, teilweise lichtdurchlässig oder lichtundurchlässig sein kann. Die Teilchen können eine Ladung aufweisen oder nicht, und wenn sie geladen sind, sind sie vorzugsweise negativ. Die Teilchen können in folgenden Formen vorliegen: fest (z. B. Polymer, Metall, Glas, organisch und anorganisch, wie z. B. Mineralien, Salze und Diatomeen), Öltröpfchen (z. B. Kohlenwasserstoff, Fluorkohlenstoff, flüssiges Silikon) oder Vesikel (z. B. synthetisch wie etwa Phospholipid oder natürlich wie etwa Zellen und Organellen). Die Teilchen können Folgendes sein: Latexteilchen oder andere Teilchen, die aus organischen oder anorganischen Polymeren bestehen; Lipid-Doppelschichten, z. B. Liposomen, Phospholipidvesikel; Öltröpfchen; Silikonteilchen; Metallsole; Zellen; und Farbstoffkristallite.

[0070] Die organischen Teilchen sind normalerweise Polymere (entweder Additions- oder Kondensationspolymere), die im Testmedium leicht dispergierbar sind. Die organischen Teilchen sind auch adsorptionsfähig oder funktionalisierbar, um an ihre Oberfläche (entweder direkt oder indirekt) ein sbp-Element zu binden und einen Photosensibilisator oder eine chemolumineszierende Verbindung an ihre Oberfläche zu binden oder in ihr Volumen zu inkorporieren.

[0071] Die Teilchen können aus natürlich vorkommenden Materialien, natürlich vorkommenden Materialien, die synthetisch modifiziert sind, und synthetischen Materialien abgeleitet sein. Natürliche oder synthetische Strukturen wie etwa Lipiddoppelschichten, z. B. Liposomen und Nicht-Phospholipidvesikel, sind vorzuziehen. Unter organischen Polymeren von besonderem Interesse sind Polysaccharide, insbesondere vernetzte Poly-

saccharide wie etwa Agarose, die als Sepharose erhältlich ist, Dextran, das als Sephadex und Sephacryl erhältlich ist, Cellulose, Stärke und dergleichen; Additionspolymere, z. B. Polystyrol, Polyacrylamid, Homopolymere und Copolymere von Derivaten von Acrylat und Methacrylat, insbesondere Estern und Amiden mit freien Hydroxyl-Funktionalitäten, wie z. B. Hydrogele und dergleichen. Anorganische Polymere sind z. B. Silikone, Glase (als Bioglas erhältlich) und dergleichen. Sole umfassen z. B. Gold, Selen und andere Metalle. Teilchen können auch dispergierte wasserunlösliche Farbstoffe, wie z. B. Porphyrine, Phthalocyanine usw., sein, die auch als Photosensibilisatoren dienen können. Zu Teilchen zählen auch Diatomeen, Zellen, virale Teilchen, Magnetosomen, Zellkerne und dergleichen.

[0072] Wenn die Teilchen im Handel erhältlich sind, kann die Teilchengröße variiert werden, indem größere Teilchen mechanisch wie z. B. durch Mahlen, Ultraschallbehandlung, Schütteln usw. in kleinere Teilchen aufgebrochen werden.

[0073] Die Teilchen sind üblicherweise polyfunktionell, oder sie können polyfunktionalisiert oder an ein sbp-Element, einen Photosensibilisator oder eine chemolumineszierende Verbindung durch spezifische oder nichtspezifische kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkungen gebunden werden. Eine Vielzahl funktioneller Gruppen steht zur Verfügung und kann inkorporiert werden. Beispiele für funktionelle Gruppen sind Carbonsäuren, Aldehyde, Aminogruppen, Cyanogruppen, Ethylengruppen, Hydroxylgruppen, Mercaptogruppen und dergleichen. Wenn kovalente Bindung eines sbp-Elements, einer chemolumineszierenden Verbindung oder eines Photosensibilisators an das Teilchen vorliegt, ist die Art der Bindung allgemein bekannt und in der Literatur ausführlich beschrieben. Siehe z. B. Cautrecasas, J. Biol. Chem. 245, 3059 (1970). Die Länge einer Linkergruppe kann je nach Beschaffenheit der gebundenen Verbindung, je nach der Beschaffenheit des Teilchens, je nach der Auswirkung der Entfernung zwischen der gebundenen Verbindung und dem Teilchen auf die Bindung von sbp-Elementen und den Analyten und dergleichen stark variieren.

[0074] Der Photosensibilisator kann so ausgewählt werden, dass er sich in der Oberfläche der Teilchen löst oder sich nichtkovalent an die Oberfläche bindet. In diesem Fall sind diese Verbindungen vorzugsweise hydrophob, um ihre Fähigkeit zu verringern, vom Teilchen zu dissoziieren und dadurch zu bewirken, dass beide Verbindungen an dasselbe Teilchen assoziieren.

[0075] Die Anzahl an Photosensibilisator- und Chemolumineszenz-Molekülen, die mit jedem Teilchen assoziiert sind, ist im Durchschnitt üblicherweise zumindest eins und kann ausreichend hoch sein, damit das Teilchen zur Gänze aus Photosensibilisator- und Chemolumineszenz-Molekülen besteht. Die bevorzugte Anzahl an Molekülen wird empirisch so bestimmt, dass im Test das stärkste Signal gegenüber dem Hintergrund erhalten wird. In einigen Fällen wird dies am besten erreicht, indem eine Vielzahl unterschiedlicher Photosensibilisator-Moleküle mit Teilchen assoziiert wird. Üblicherweise sollte das Verhältnis zwischen Photosensibilisator oder chemolumineszierender Verbindung und sbp-Element in den Teilchen zumindest 1, vorzugsweise zumindest 100 : 1, noch bevorzugter über 1000 : 1, betragen.

[0076] Latexteilchen: „Latex“ bezieht sich hierin auf ein teilchenförmiges, in Wasser suspendierbares, in Wasser unlösliches Polymermaterial, das üblicherweise einen Teilchendurchmesser von 20 nm bis 20 µm, noch bevorzugter 100 bis 1000 nm, aufweist. Der Latex ist häufig ein substituiertes Polyethylen wie etwa Polystyrol-Butadien-, Polyacrylamid-Polystyrol-, Polystyrol-Aminosäure-, Polyacrylsäure-, Polymethacrylsäure-, Acrylnitril-Butadien-, Styrol-Copolymere, Polyvinylacetat-Acrylat-, Polyvinylpyridin, Vinylchlorid-Acrylat-Copolymere und dergleichen. Nichtvernetzte Polymere von Styrol und carboxyliertem Styrol oder mit anderen aktiven Gruppen, wie z. B. Amino, Hydroxyl, Halogen und dergleichen, funktionalisiertem Styrol sind vorzuziehen. Häufig werden Copolymere substituierter Styrole mit Dienen, wie z. B. Butadien, verwendet.

[0077] Die Assoziation des Photosensibilisators oder der chemolumineszierenden Verbindung mit Latexteilchen, wie dies hierin geoffenbart ist, kann die Inkorporation während der Bildung der Teilchen durch Polymerisation umfassen; üblicherweise sieht sie aber die Inkorporation in vorgeformten Teilchen vor, üblicherweise durch nichtkovalentes Lösen in den Teilchen. Üblicherweise wird eine Lösung der chemolumineszierenden Verbindung oder des Sensibilisators verwendet. Geeignete Lösungsmittel sind Alkohole, z. B. Ethanol, Ethylenglykol und Benzylalkohol; Amide, wie z. B. Dimethylformamid, Formamid, Acetamid und Tetraethylharnstoff und dergleichen; Sulfoxide, wie z. B. Dimethylsulfoxid und Sulfolan; und Ether, wie z. B. Carbitol, Ethylcarbitol, Dimethoxyethan und dergleichen; sowie Wasser. Die Verwendung von Lösungsmitteln mit hohen Siedepunkten, in denen die Teilchen unlöslich sind, ermöglicht den Einsatz hoher Temperaturen, um so das Lösen der Verbindungen in den Teilchen zu vereinfachen, und ist besonders geeignet. Die Lösungsmittel können einzeln oder in Kombination verwendet werden. Besonders bevorzugte Lösungsmittel zur Inkorporation von Photosensibilisator sind jene, die den angeregten Triplett-Zustand des Photosensibilisators nicht quenchen – entweder infolge ihrer eigenen inhärenten Eigenschaften, oder da sie anschließend aus den Teilchen entfernt werden können (aufgrund ihrer Fähigkeit, in einem Lösungsmittel wie etwa Wasser gelöst zu werden, das in den Teilchen unlöslich ist). Aromatische Lösungsmittel sind vorzuziehen; ebenso wie Lösungsmittel, die im Teilchen löslich sind. Für die Inkorporation von chemolumineszierenden Verbindungen in Teilchen sollte ein Lösungsmittel gewählt werden, das die Lumineszenz nicht stört (aufgrund ihrer inhärenten Eigenschaften oder ihrer Fähigkeit, aus den Teilchen entfernt zu werden). Häufig sind auch, aromatische Lösungsmittel vorzuziehen. Ty-

pische aromatische Lösungsmittel sind Dibutylphthalat, Benzonitril, Naphthonitril, Dioctylterephthalat, Dichlorbenzol, Diphenylether, Dimethoxybenzol usw.

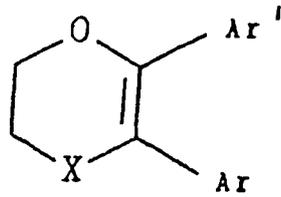
[0078] Außer, wenn die chemolumineszierende Verbindung oder der Photosensibilisator kovalent an die Teilchen gebunden werden soll, ist es üblicherweise vorzuziehen, elektronisch neutrale Photosensibilisatoren oder chemolumineszierende Verbindungen zu verwenden. Es ist vorzuziehen, dass das ausgewählte flüssige Medium die Polymerperlen nicht bis zur Klebrigkeit erweicht. Eine bevorzugte Technik umfasst das Suspendieren der ausgewählten Latexteilchen in einem flüssigen Medium, in dem der Photosensibilisator oder die chemolumineszierende Verbindung zumindest eingeschränkte Löslichkeit aufweist. Vorzugsweise werden die Konzentrationen des Photosensibilisators und der chemolumineszierenden Verbindung in den flüssigen Medien, ausgewählt, um Teilchen bereitzustellen, die den höchsten Wirkungsgrad der Bildung von Singulett-Sauerstoff und die höchste Quantenausbeute der Emission aus der chemolumineszierenden Verbindung in den Medien aufweisen; weniger konzentrierte Lösungen sind aber manchmal vorzuziehen. Verformung oder Auflösung der Teilchen im Lösungsmittel kann durch Zugabe eines mischbaren Co-Lösungsmittels, in dem die Teilchen unlöslich sind, verhindert werden.

[0079] Im Allgemeinen wird die Temperatur während des Verfahrens so gewählt, dass die die Fähigkeit der mit Photosensibilisator markierten Teilchen zur Bildung von Singulett-Sauerstoff und die Quantenausbeute der Teilchen der chemolumineszierenden Verbindung maximiert wird, mit der Maßgabe, dass die Teilchen bei der ausgewählten Temperatur nicht schmelzen oder aggregieren sollten. Es herrschen normalerweise höhere Temperaturen. Die Temperatur für das Verfahren reicht im Allgemeinen von 20°C bis 200°C, noch üblicher von 50°C bis 170°C. Es wurde beobachtet, dass einige Verbindungen, die bei Raumtemperatur fast unlöslich sind, z. B. bei erhöhten Temperaturen in niedermolekularen Alkoholen, wie z. B. Ethanol und Ethylenglykol und dergleichen, löslich sind. Es wurde aufgezeigt, dass carboxylierte modifizierte Latexteilchen niedermolekulare Alkohole bei derartigen Temperaturen tolerieren.

[0080] Ein sbp-Element kann physikalisch auf die Oberfläche des Latexteilchens adsorbiert oder kovalent an das Teilchen gebunden werden. In Fällen, in denen ein sbp-Element nur schwach an die Oberfläche des Latexteilchens gebunden ist, kann die Bindung manchmal den Scherkräften zwischen Teilchen, die während der Inkubation und den Waschgängen auftreten, nicht standhalten. Daher kann es vorzuziehen sein, sbp-Elemente unter Bedingungen an die Latexteilchen zu binden, die Adsorption minimieren. Dies kann erfolgen, indem die Oberfläche des Latex chemisch aktiviert wird. Beispielsweise kann der N-Hydroxysuccinimidester von Oberflächen-Carboxylgruppen gebildet werden, und es werden dann die aktivierten Teilchen zur Reduktion nichtspezifischer Bindung der Assaykomponenten an der Teilchenoberfläche mit einem Linker mit Aminogruppen in Kontakt gebracht, die mit den Estergruppen oder direkt mit einem sbp-Element reagieren, das eine Aminogruppe besitzt. Der Linker wird üblicherweise so gewählt, dass die nichtspezifische Bindung von Testkomponenten an der Teilchenoberfläche reduziert wird, und bietet vorzugsweise geeignete Funktionalität sowohl für die Bindung an das Latexteilchen als auch für die Bindung des sbp-Elements. Zweckmäßige Materialien sind maleimidiertes Aminodextran (MAD), Polylysin, Aminosaccharide und dergleichen. MAD kann nach dem Verfahren von Hubert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 75(7), 3143 (1978) hergestellt werden.

[0081] In einem Verfahren wird MAD zunächst an Carboxyl-enthaltende Latexteilchen unter Einsatz eines wasserlöslichen Carbodiimids, wie z. B. 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid, gebunden. Die beschichteten Teilchen werden dann in Reagenzien äquilibriert, um nichtspezifische Bindung zu verhindern. Zu solchen Reagenzien zählen Proteine, wie z. B. Rinder- γ -Globulin (BGG), und Detergenzien, wie z. B. Tween 20, TRITON X-100 und dergleichen. Ein sbp-Element mit einer Sulfhydrylgruppe oder ein in geeigneter Weise modifiziertes, um eine Sulfhydrylgruppe einzuführen, wird dann der Suspension der Teilchen zugesetzt, woraufhin eine kovalente Bindung zwischen dem sbp-Element und dem MAD auf den Teilchen entsteht. Jegliches überschüssiges nichtumgesetztes sbp-Element kann dann durch Waschen entfernt werden.

[0082] Das bekannte Dioxen (Verbindung 9) und die Verbindung der Erfindung (Verbindung 11) sind in der folgenden Abbildung unter Bezugnahme auf die folgende Struktur dargestellt:



(8)

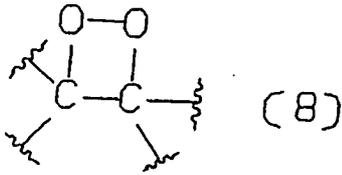
worin die Verbindungen 9-17 die folgenden Gruppen für X, Ar und Ar' besitzen:

X	Ar	Ar'	*
O			9

S			10
S			11

[0083] Die vorliegenden chemolumineszierenden Verbindungen erfahren chemische Reaktion mit Singulett-Sauerstoff, um ein metastabiles Zwischenprodukt zu bilden, das sich unter gleichzeitiger oder nachfolgender Aussendung von Licht im Wellenlängenbereich von 250 bis 1200 nm zersetzen kann. Vorzugsweise zersetzt sich das Zwischenprodukt spontan ohne Erwärmung oder Zugabe zusätzlicher Reagenzien nach seiner Bildung. Die Zugabe eines Reagens nach der Bildung des Zwischenprodukts oder das Vorherrschen erhöhter Temperaturen zur Beschleunigung der Zersetzung ist allerdings für einige chemolumineszierende Verbindun-

gen erforderlich. Die chemolumineszierenden Verbindungen sind Elektronen-reiche Verbindungen, die mit Singulett-Sauerstoff reagieren, häufig unter Bildung von Dioxetanen oder Dioxetanonen, wie sie beispielsweise durch die nachstehende Struktur dargestellt sind, worin die Substituenten auf den Kohlenstoff- (C-) Atomen jene sind, die auf dem entsprechenden Olefin vorhanden sind:

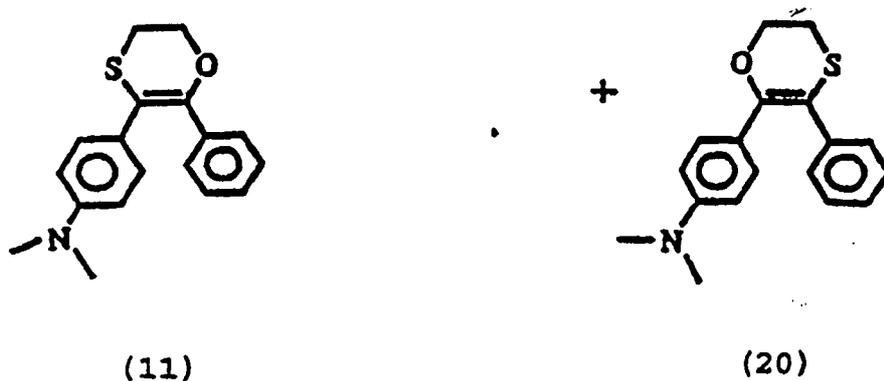
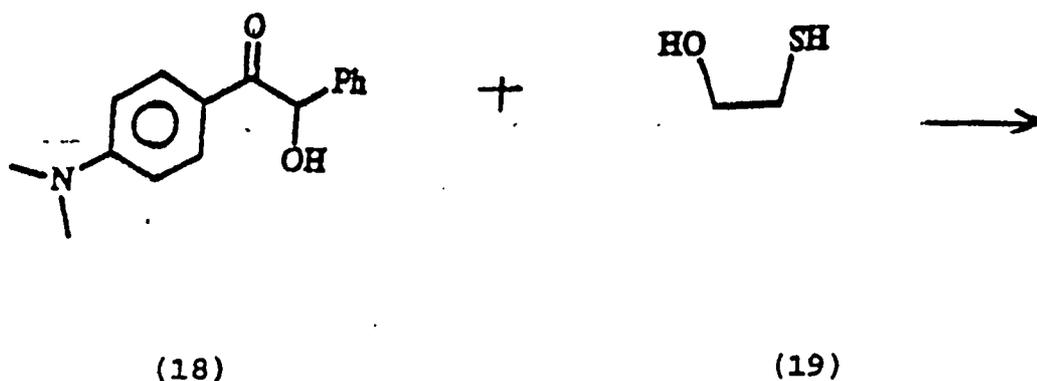


von denen sich einige spontan zersetzen, andere wiederum durch Erwärmen und/ oder durch Katalyse, üblicherweise durch einen Elektronen-reichen Energieakzeptor, unter Aussendung von Licht. In einigen Fällen wird das Dioxetan spontan in ein Hydroperoxid umgewandelt, woraufhin basischer pH-Wert das Dioxetan neu bilden und die Zersetzung und Lichtaussendung ermöglichen muss.

[0084] Die chemolumineszierenden Verbindungen von Interesse emittieren im Allgemeinen bei Wellenlängen von über 300 nm und üblicherweise über 400 nm. Verbindungen, die alleine oder gemeinsam mit einem fluoreszierenden Molekül Licht mit Wellenlängen außerhalb des Bereichs emittieren, in denen Serumkomponenten Licht absorbieren, sind hierin von besonderem Interesse. Die Fluoreszenz von Serum fällt oberhalb von 500 nm rasch ab und wird oberhalb von 550 nm relativ insignifikant. Wenn sich daher der Analyt in Serum befindet, sind chemolumineszierende Verbindungen, die Licht über 550 nm, vorzugsweise über 600 nm, aussenden, von besonderem Interesse. Um Autosensibilisierung der chemolumineszierenden Verbindung zu vermeiden, ist es vorzuziehen, dass die chemolumineszierenden Verbindungen kein Licht absorbieren, das zur Anregung des Photosensibilisators dient. Da es im Allgemeinen vorzuziehen ist, den Sensibilisator mit Wellenlängen von mehr als 500 nm anzuregen, ist es daher wünschenswert, dass die Lichtabsorption durch die chemolumineszierende Verbindung über 500 nm sehr niedrig ist.

[0085] Die chemolumineszierenden Verbindungen der Erfindung können in unterschiedlicher Weise hergestellt werden. In eine Verfahren wird ein 2-Thioethanolderivat mit einem geeigneten Diaryl-substituierten α -Hydroxyketon (substituiertes Benzoin) kondensiert, worin ein Aryl auf dem Ketonkohlenstoff und das andere auf dem die α -Hydroxygruppe enthaltenden Kohlenstoff substituiert ist. Die Kondensationsreaktion liefert den geeigneten Enolether direkt. Die Kondensation kann in einem inerten Lösungsmittel, wie z. B. Toluol, stattfinden. Üblicherweise beträgt die Reaktionstemperatur etwa 90°C bis 130°C, und die Reaktion dauert 5–50 Stunden. Im Allgemeinen erfolgt die Reaktion bei der Rückflusstemperatur der kombinierten Reagenzien.

[0086] Die Kondensation findet in Gegenwart einer Lewis-Säure, wie z. B. Acylchlorid, Silylchlorid, Zinn(II)-chlorid usw., statt. Das folgende Reaktionsschema ist eine Veranschaulichung des oben beschriebenen Verfahrens für die Herstellung der endungsgemäßen chemolumineszierenden Verbindung:



[0087] Zusatzmaterialien: Es werden im Test gemäß der Erfindung häufig verschiedene Zusatzmaterialien verwendet. Beispielsweise sind im Testmedium normalerweise Puffer sowie Stabilisatoren für das Testmedium und die Testkomponenten vorhanden. Häufig können zusätzlich zu diesen Additiven Proteine wie etwa Albumine, organische Lösungsmittel wie etwa Formamid, quaternäre Ammoniumsalze, Polykationen wie etwa Dextransulfat Tenside, insbesondere nichtionogene Tenside, Bindungsverstärker, z. B. Polyalkylenglykole, oder dergleichen enthalten sein. Wenn die chemolumineszierende Verbindung chemisch und nicht durch Bestrahlung aktiviert wird, ist oft Wasserstoffperoxid als Zusatzreagens enthalten. Wenn gewünscht wird, die Emissionswellenlänge der chemolumineszierenden Verbindung zu längeren Wellenlängen hin zu verschieben oder die Zersetzung ihrer Sauerstoff-aktivierten Form zu katalysieren, kann ein Fluoreszenzmolekül eingesetzt werden.

[0088] Gänzlich oder teilweise nacheinander: Wenn die Probe und verschiedene hierin verwendete Mittel nicht gleichzeitig kombiniert werden, können eine oder mehrere davon mit einem oder mehreren der verbleibenden Mittel kombiniert werden, um eine Subkombination zu bilden. Jede Subkombination lässt sich dann einem oder mehreren Schritten des vorliegenden Verfahrens unterziehen. Somit kann jede der Subkombinationen unter Bedingungen inkubiert werden, unter denen eines oder mehrere der gewünschten Ergebnisse erzielbar sind.

[0089] Ein Aspekt der Erfindung betrifft Zusammensetzungen, die (a) ein Metallchelate, umfassend ein Metall, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Europium, Terbium, Dysprosium, Samarium, Osmium und Ruthenium, in zumindest einem sechsfach koordinierten Zustand, und (b) die Verbindung 11 umfassen. Die Zusammensetzung der Erfindung, die ein Metallchelate und Verbindung 11 umfasst, liegt im Allgemeinen in einem Medium vor, das flüssig oder fest sein kann, üblicherweise festes Teilchenmaterial. Das flüssige Medium ist üblicherweise eine hochsiedende, mit Wasser nichtmischbare Flüssigkeit, z. B. aus der Gruppe, bestehend aus Toluol, Lipiden, Fluorkohlenstoffen, Diphenylether, Chlorbenzol, Dioctylphthalat, Dimethoxybenzol, Mineralöl und Triacylglyceriden; das aus festem Teilchenmaterial gebildete Medium kann ein organisches Polymer, wie z. B. Polystyrol, Polymethylacrylat, Polyacrylat, Polyacrylamid, Polyvinylchlorid und Copolymere davon, Nylon und andere Polyamide usw. sein. Vorzugsweise ist die Zusammensetzung in einem teilchenförmigen Latexmaterial inkorporiert.

[0090] Das Metallchelate ist in einer Menge vorhanden, um die Chemolumineszenz-Quantenausbeute zu maximieren und die Abklingzeit der Chemolumineszenz zu minimieren. Üblicherweise ist das Metallchelate in einer Menge von 0,2–500 mM, vorzugsweise 2–100 mM, vorhanden. In einigen Fällen, üblicherweise wenn das Metallchelate sechsfach koordiniert ist, erfolgt die Reduktion der Abklingzeit durch Reduktion der Quantenausbeute, wobei man zwischen diesen zwei Wirkungen ein Gleichgewicht erzielen muss. Demzufolge sollte die Konzentration des Metallchelats in der Zusammensetzung darauf abgestimmt sein, ein solches Gleichgewicht zu

- erzielen. Die Konzentration der chemolumineszierenden Verbindung in der Zusammensetzung beträgt üblicherweise 0,1–500 mM, vorzugsweise 2 bis 100 mM.
- [0091] Ein Aspekt der Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, die einen Latex umfasst, in den Verbindung 11 inkorporiert ist. Die Latexteilchen sind üblicherweise suspendierbar und besitzen einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,04 bis 4000 nm. Für Assays besitzt das Teilchen ein daran gebundenes sbp-Element und weist einen durchschnittlichen Durchmesser von 100 bis 1000 µm auf.
- [0092] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten. Das Verfahren umfasst (a) das Bereitstellen in Kombination (1) eines Mediums, von dem vermutet wird, dass es einen Analyten enthält, (2) eines Photosensibilisators, der in seinem angeregten Zustand Sauerstoff in seinen Singulett-Zustand anregen kann, wobei der Photosensibilisator mit einem spezifischen sbp-Element assoziiert ist, und (3) eines suspendierbaren teilchenförmigen Latexmaterials, das Verbindung 11 umfasst. Das teilchenförmige Material weist ein daran gebundenes sbp-Element auf. Die Kombination wird mit Licht – üblicherweise mittels Bestrahlung – behandelt, um den Photosensibilisator anzuregen, und dann hinsichtlich der Menge ausgesendeter Lumineszenz untersucht. Das Ausmaß dieser Lumineszenz wird mit der Analytenmenge im Medium in Beziehung gesetzt. Der Photosensibilisator kann in ein zweites suspendierbares Teilchenmaterial inkorporiert werden.
- [0093] In der Testvorschrift werden die Komponenten in Kombination bereitgestellt, und das als Funktion der Aktivierung von Sauerstoff durch den Sensibilisator erzeugte Licht ist eine Funktion der Analytenkonzentration. Günstigerweise können die Verfahren der Erfindung ohne Erwärmen des Mediums durchgeführt werden, um Licht zu erzeugen. Daher kann der Test der Endung bei konstanter Temperatur erfolgen.
- [0094] Die chemolumineszierende Verbindung kann an ein sbp-Element gebunden sein, das zur direkten oder indirekten Bindung an den Analyten oder an eine Testkomponente fähig ist, deren Konzentration durch die Gegenwart des Analyten beeinflusst wird. Der Ausdruck „zur direkten oder indirekten Bindung fähig“ bedeutet hierin, dass sich die bezeichnete Struktur spezifisch (direkt) an die Struktur binden kann oder sich spezifisch an ein spezifisches sbp oder an einen Komplex von zwei oder mehr sbp-Elementen binden kann, die zur Bindung mit der anderen Struktur fähig sind (indirekt). Vorzugsweise verwenden erfindungsgemäß durchgeführte Assays eine der obigen Zusammensetzungen in einem Latexteilchen. Dieses Latexteilchen besitzt ein sbp-Element, das im Allgemeinen zur direkten oder indirekten Bindung an den Analyten oder einen Rezeptor für den Analyten fähig ist. Wenn die mit dem Photosensibilisator oder der chemolumineszierenden Verbindung assoziierten sbp-Elemente beide zur Bindung an den Analyten fähig sind, ist eine Sandwich-Assayvorschrift die Folge. Wenn eines der mit dem Photosensibilisator oder der chemolumineszierenden Verbindung assoziierten sbp-Elemente zur Bindung an den Analyten und einen Analytenanalog fähig ist, kann sich daraus eine kompetitive Assayvorschrift ergeben.
- [0095] Es wird üblicherweise bewirkt, dass der Photosensibilisator die chemolumineszierende Verbindung durch Bestrahlen des die obigen Reaktanden enthaltenden Mediums aktiviert. Das Medium muss mit Licht einer Wellenlänge bestrahlt werden, deren Energie ausreicht, um den Photosensibilisator in einen angeregten Zustand umzuwandeln und ihn dadurch in die Lage zu versetzen, molekularen Sauerstoff zu Singulett-Sauerstoff zu aktivieren. Der angeregte Zustand für den Photosensibilisator, der zur Anregung von molekularem Sauerstoff fähig ist, ist im Allgemeinen ein Triplett-Zustand, der mehr als etwa 20, üblicherweise zumindest 23, kcal/Mol energiereicher ist als der Grundzustand des Photosensibilisators. Vorzugsweise wird das Medium mit Licht einer Wellenlänge von etwa 450 bis 950 nm bestrahlt, obwohl auch kürzere Wellenlängen in Frage kommen, z. B. 230 bis 950 nm. Die erzeugte Lumineszenz kann in jeder geeigneten Weise, wie z. B. fotografisch, visuell oder photometrisch, gemessen werden, um ihr Ausmaß zu ermitteln, das mit der Analytenmenge im Medium in Beziehung gesetzt wird.
- [0096] Obwohl es üblicherweise vorzuziehen ist, den Photosensibilisator durch Bestrahlen mit Licht einer Wellenlänge anzuregen, die durch den Photosensibilisator wirkungsvoll absorbiert wird, eignen sich auch andere Möglichkeiten der Anregung, z. B. durch Energietransfer von einem angeregten Zustand eines Energie donors, wie z. B. eines zweiten Photosensibilisators. Wenn ein zweiter Photosensibilisator verwendet wird, können Licht-Wellenlängen gewählt werden, die vom Photosensibilisator ineffizient, aber vom zweiten Photosensibilisator effizient absorbiert werden. Der zweite Photosensibilisator kann an eine Testkomponente gebunden sein, die mit dem ersten Photosensibilisator assoziiert ist oder mit ihm assoziiert werden kann (z. B. gebunden an eine Oberfläche oder in das Teilchen mit dem ersten Photosensibilisator inkorporiert). Bei Verwendung eines zweiten Photosensibilisators weist er üblicherweise einen energieärmsten Singulett-Zustand bei höherer Energie auf als der energieärmste Singulett-Zustand des ersten Photosensibilisators.
- [0097] Die 632,6-nm-Emissionslinie eines Helium-Neon-Lasers ist eine billige Lichtquelle für die Anregung. Photosensibilisatoren mit Absorptionsmaxima im Bereich von etwa 620 bis etwa 650 nm sind mit der Emissionslinie eines Helium-Neon-Lasers kompatibel und eignen sich daher besonders gut.
- [0098] Das Verfahren und die Zusammensetzungen der Endung können auf die meisten Assays abgestimmt werden, in denen es um sbp-Elemente wie z. B. Ligand-Rezeptor geht; Beispiele dafür sind Antigen-Antikörper-Reaktionen; Polynucleotid-Bindungstests usw. Die Tests können homogen oder heterogen, kompetitiv

oder nichtkompetitiv sein. Die Testkomponenten – chemolumineszierende Verbindung und Photosensibilisator – können in unterschiedlicher Weise mit (1) einer Oberfläche (falls vorhanden), (2) Nucleinsäure oder Rezeptor und (3) Nucleinsäure oder Ligand verwendet werden. Die Assoziation kann kovalente oder nichtkovalente Bindungen vorsehen. Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung können unter Berücksichtigung der obigen Ausführungen und der nachstehenden veranschaulichenden Besprechung je nach dem konkreten Test die richtigen Assoziationen wählen.

[0099] In einem homogenen Testverfahren kann die Probe gegebenenfalls vorbehandelt werden, um unerwünschte Materialien zu entfernen. Die Reaktion für einen nichtkompetitiven Sandwich-Assay kann ein sbp-Element (z. B. einen Antikörper, eine Nucleinsäure-Sonde, einen Rezeptor oder einen Liganden), das zum Analyten komplementär und mit einer chemolumineszierenden Verbindung assoziiert ist; einen mit einem sbp-Element assoziierten Photosensibilisator (z. B. Antikörper, Nucleinsäure-Sonde, Rezeptor oder Ligand), der ebenfalls mit dem Analyten komplementär ist; die Probe von Interesse; und allenfalls erforderliche Zusatzreagenzien enthalten. Vorzugsweise ist zumindest die chemolumineszierende Verbindung in Teilchen inkorporiert, an denen ein sbp-Element gebunden ist. Der Photosensibilisator kann direkt an ein sbp-Element gebunden oder auch in Teilchen inkorporiert sein. In einer kompetitiven Arbeitsvorschrift kann ein sbp-Element ein Derivat des Analyten und das andere sbp-Element komplementär zum Analyten sein, z. B. Antikörper. In beiden Arbeitsvorschriften können die Komponenten entweder gleichzeitig oder gänzlich oder teilweise nacheinander kombiniert werden. Die Fähigkeit von durch einen aktivierten Photosensibilisator erzeugtem Singulett-Sauerstoff, mit der chemolumineszierenden Verbindung zu reagieren, wird durch die Bindung eines sbp-Elements an den Analyten bestimmt. Daher kann die Gegenwart oder Menge eines Analyten bestimmt werden, indem man die Lichtmenge misst, die nach Aktivierung des Photosensibilisators durch Bestrahlung, Erwärmung oder Zugabe eines chemischen Reagens, vorzugsweise durch Bestrahlung, ausgesendet wird. Sowohl die Bindungsreaktion als auch die Detektion ihres Ausmaßes können in einer homogenen Lösung ohne Trennung durchgeführt werden. Dies ist ein Vorteil der vorliegenden Erfindung gegenüber Verfahren des Stands der Technik unter Einsatz von Chemolumineszenz.

[0100] In einem heterogenen Testverfahren umfassen die Assaykomponenten eine Probe, die vermutlich einen Analyten enthält, der ein sbp-Element ist; ein an einen Träger gebundenes sbp-Element, welcher Träger entweder eine nichtdispersierbare Oberfläche oder ein Teilchen sein kann, mit dem ein Element einer Gruppe assoziiert ist, die aus der chemolumineszierenden Verbindung und dem Photosensibilisator besteht; und ein sbp-Element, mit dem das andere Element der Gruppe assoziiert ist, worin die sbp-Elemente unabhängig voneinander entweder direkt oder indirekt den Analyten oder einen Rezeptor für den Analyten binden können. Diese Komponenten werden im Allgemeinen entweder gleichzeitig oder gänzlich oder teilweise nacheinander kombiniert. Die Oberfläche oder die Teilchen werden dann von der flüssigen Phase getrennt, und es wird entweder die abgeschiedene Phase oder die flüssige Phase Bedingungen zur Aktivierung des Photosensibilisators unterworfen (üblicherweise durch Bestrahlen der jeweiligen Phase und Messen der ausgesendeten Lichtmenge).

[0101] Die Bindungsreaktionen in einem Test für den Analyten erfolgen normalerweise in einem wässrigen Medium bei moderatem pH-Wert – im Allgemeinen bei jenem, der für optimale Testsensitivität sorgt. Vorzugsweise erfolgt die Aktivierung des Photosensibilisators in einem wässrigen Medium. Wenn jedoch ein Abtrennungsschritt vorgesehen ist, können nichtwässrige Medien, wie z. B. Acetonitril, Aceton, Toluol, Benzonitril usw., und wässrige Medien mit sehr hohen pH-Werten, d. h. von mehr als 10,0, oder sehr niedrigen pH-Werten, d. h. weniger als 4,0, üblicherweise aber mit sehr hohen pH-Werten, verwendet werden. Wie oben erwähnt, kann der Test entweder ohne Abtrennung (homogen) oder mit Abtrennung (heterogen) jeglicher der Testkomponenten oder -produkte durchgeführt werden.

[0102] Das wässrige Medium kann lediglich Wasser sein oder 0,01 bis 80 Vol.-% eines Co-Lösungsmittels enthalten; üblicherweise enthält es aber weniger als 40% eines Co-Lösungsmittels, wenn ein sbp-Element verwendet wird, das ein Protein ist. Der pH-Wert für das Medium der Bindungsreaktion liegt üblicherweise im Bereich von etwa 4 bis 11, noch häufiger im Bereich von etwa 5 bis 10, vorzugsweise im Bereich von etwa 6,5 bis 9,5. Wenn sich der pH-Wert während der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff nicht ändert, ist er üblicherweise ein Kompromiss zwischen optimaler Bindung der Bindungselemente, dem pH-Optimum für die Signalproduktion und der Stabilität anderer Reagenzien des Assays. Wenn erhöhte pH-Werte für die Signalerzeugung notwendig sind, kann ein Schritt, der die Zugabe eines alkalischen Reagens vorsieht, zwischen der Bindungsreaktion und der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff und/ oder Signalproduktion erfolgen. Üblicherweise liegen die erhöhten pH-Werte über 10, noch häufiger liegen sie zwischen 10 und 14. Für heterogene Assays eignen sich auch nichtwässrige Lösungsmittel (siehe oben), wobei die Hauptüberlegung die ist, dass das Lösungsmittel nicht wirkungsvoll mit Singulett-Sauerstoff reagiert.

[0103] Verschiedene Puffer können dazu dienen, den gewünschten pH-Wert zu erzielen und diesen während des Tests aufrechtzuerhalten. Beispiele für Puffer sind Borat, Phosphat, Carbonat, Tris, Barbital und dergleichen. Der jeweils verwendete Puffer ist für die vorliegende Erfindung nicht entscheidend, doch in einem individuellen Assay können ein oder mehrere Puffer vorzuziehen sein.

[0104] Für die Durchführung der Bindungsreaktionen proteinhaltiger Liganden und Rezeptoren im Test herrschen während der Messphase normalerweise moderate Temperaturen, üblicherweise konstante Temperaturen, vorzugsweise zwischen 25°C und 40 °C. Die Inkubationstemperaturen für die Bindungsreaktion reichen normalerweise von etwa 5°C bis 45°C, üblicherweise von etwa 15°C bis 40°C, noch häufiger von 25 °C bis 40°C. Wenn die Bindung von Nucleinsäuren im Test auftritt, herrschen häufiger höhere Temperaturen (üblicherweise 20°C bis 90°C, noch häufiger 35°C bis 75 °C). Die Temperaturen während der Messungen, d. h. der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff und der Lichtdetektion, reichen im Allgemeinen von etwa 20°C bis 100 °C, noch häufiger von etwa 25°C bis 50°C, noch häufiger von 25°C bis 40°C.

[0105] Die Konzentration des untersuchten Analyten variiert im Allgemeinen und reicht von etwa 10^{-4} bis unter 10^{-6} M, noch häufiger von etwa 10^{-6} bis 10^{-4} M. Überlegungen wie z. B. die Frage, ob der Test qualitativ, semi-quantitativ oder quantitativ ist, das jeweilige Detektionsverfahren, die Konzentration des Analyten von Interesse und die maximalen gewünschten Inkubationszeiten bestimmen normalerweise die Konzentrationen der verschiedenen Reagenzien.

[0106] Während in kompetitiven Tests die Konzentrationen der verschiedenen Reagenzien im Testmedium im Allgemeinen durch den Konzentrationsbereich von Interesse des Analyten bestimmt wird, wird die Endkonzentration jedes Reagens normalerweise empirisch festgelegt, um die Sensitivität des Assays über den jeweiligen Bereich zu optimieren. Die Variation der Konzentration des Analyten von Interesse sollte daher eine präzise messbare Signaldifferenz liefern.

[0107] Die Konzentration der sbp-Elemente hängt von der Analytenkonzentration, der gewünschten Bindungsrate und dem Grad der nichtspezifischen Bindung der sbp-Elemente ab. Üblicherweise sind die sbp-Elemente zumindest in der niedrigsten erwarteten Analytenkonzentration vorhanden, vorzugsweise zumindest in der höchsten erwarteten Analytenkonzentration; in nichtkompetitiven Assays kann die Konzentration das 10- bis 10⁶-fache der höchsten Analytenkonzentration ausmachen – üblicherweise ist sie aber weniger als 10^{-4} M, vorzugsweise weniger als 10^{-6} M, und häufig liegt sie zwischen 10^{-11} und 10^{-7} M. Die Menge an Photosensibilisator oder chemolumineszierender Verbindung (mit einem sbp-Element assoziiert) ist üblicherweise zumindest ein Molekül pro sbp-Element und kann bis zu 10^5 , üblicherweise $10-10^4$, betragen, wenn der Photosensibilisator oder die chemolumineszierende Verbindung in einem Teilchen inkorporiert ist.

[0108] Die Reihenfolge der Zugabe kann zwar stark variieren, doch es gibt je nach Natur des Tests bestimmte Präferenzen. Die einfachste Reihenfolge der Zugabe ist die gleichzeitige Zugabe aller Materialien. Alternativ dazu können die Reagenzien gänzlich oder teilweise nacheinander kombiniert werden. Wenn der Test kompetitiv ist, ist es oft wünschenswert, den Analytenanalog nach dem Kombinieren der Probe mit einem sbp-Element zuzusetzen, das zur Bindung des Analyten fähig ist. Gegebenenfalls kann ein Inkubationsschritt nach dem Kombinieren der Reagenzien vorgesehen sein; seine Dauer reicht im Allgemeinen von etwa 30 Sekunden bis zu 6 Stunden, noch häufiger von etwa 2 Minuten bis zu 1 Stunde, bevor der Sensibilisator dazu veranlasst wird, Singulett-Sauerstoff zu erzeugen, und die Lichtaussendung gemessen wird.

[0109] In einer besonders bevorzugten Zugabereihenfolge wird eine erste Gruppe spezifischer Bindungspaarelemente, die zum Analyten komplementär und/oder mit diesem homolog sind, mit dem Analyten kombiniert, gefolgt von der Zugabe spezifischer Bindungspaarelemente, die zu den ersten sbp-Elementen komplementär sind, die jeweils mit einem unterschiedlichen Element der Gruppe bestehend aus einem Photosensibilisator und einer Zusammensetzung der Erfindung assoziiert sind. Das Assaygemisch oder eine getrennte Komponente davon wird dann bestrahlt und die Lichtemission gemessen.

[0110] In einem homogenen Assay können nach dem Kombinieren aller Reagenzien diese gegebenenfalls inkubiert werden. Dann wird die Kombination bestrahlt und das resultierende ausgesendete Licht gemessen. Das ausgesendete Licht wird mit der Menge des Analyten in der untersuchten Probe in Beziehung gesetzt. Die Mengen der in einem homogenen Assay verwendeten Reagenzien der Erfindung hängen von der Beschaffenheit des Analyten ab. Im Allgemeinen weist der homogene Test der Erfindung erhöhte Sensitivität gegenüber bekannten Assays wie z. B. dem EMIT[®]-Test auf. Dieser Vorteil ergibt sich vor allem aus dem verbesserten Signal-Rauschverhältnis, das hierin erzielt wird.

[0111] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Sets, die sich zur wirkungsvollen Durchführung eines Testverfahrens der Erfindung eignen, damit die Gegenwart oder Menge eines Analyten in einer Probe bestimmt wird, von der vermutet wird, dass sie den Analyten enthält. Die Sets umfassen in abgepackter Kombination Folgendes: (1) eine Zusammensetzung, die ein suspendierbares Latexteilchen umfasst, das Verbindung 11 enthält, und (2) einen Photosensibilisator, der in seinem angeregten Zustand Sauerstoff in seinen Singulett-Zustand aktivieren kann. Der Photosensibilisator kann ein Teil einer Zusammensetzung sein, die ein zweites suspendierbares Teilchen enthält, das den Photosensibilisator umfasst, worin das zweite Teilchen ein daran gebundenes sbp-Element besitzt oder direkt an ein sbp-Element gebunden sein kann. Das Set kann überdies eine schriftliche Beschreibung eines erfindungsgemäßen Verfahrens und Anleitungen zur Verwendung der Reagenzien des Sets in einem derartigen Verfahren enthalten.

[0112] Um die Vielseitigkeit der Erfindung zu erhöhen, können die Reagenzien in abgepackter Kombination in den gleichen oder getrennten Behältern bereitgestellt sein, sodass das Verhältnis der Reagenzien für Opti-

mierung des Verfahrens und des Tests sorgt. Die Reagenzien können jeweils in getrennten Behältern vorliegen, oder es können verschiedene Reagenzien in einem oder mehreren Behältern kombiniert sein; dies hängt von der Kreuzreaktivität und der Stabilität der Reagenzien ab. Das Set kann außerdem andere getrennt abgepackte Reagenzien zur Durchführung eines Assays mit Zusatzreagenzien usw. enthalten.

BEISPIELE

[0113] Die vorliegende Erfindung wird nun anhand der folgenden veranschaulichenden Beispiele näher erläutert. Die hierin angeführten Teile und Prozentsätze beziehen sich – sofern nicht anders angegeben – auf das Gewicht. Die Temperaturen sind in °C angegeben.

Abkürzungen:

Ab _F	(Anti-Fluorescein) – monoklonaler Mäuse-Antikörper gegen Fluorescein
Ab _{T₃}	(Anti-T ₃) – monoklonaler Mäuse-Antikörper gegen T ₃
t-Bu	t-Butyl
TF	Trifluoressigsäure
T ₃	
Φ	Chemolumineszenz-Quantenausbeute
PMT	
EtoAc	Ethylacetat
BSA	Rinderserumalbumin
Chl-a	Chlorophyll-a
D-H ₂ O	entionisiertes Wasser
DPPA	4,7-Diphenylphenanthrolin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerin
DPPE	Dipalmitoylphosphatidylethanolamin
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid
nC ₁₀	Tetra-(n-decyl)phthalocyanin-Aluminiumchlorid-Komplex
PB	Polystyrolperlen
PB/nC ₁₀	PB mit nC ₁₀
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, 0,02 M NaPi, 0,14 M NaCl/pH 7,2
Pi	Phosphat
Sulfo-NHS	Sulfo-N-hydroxysuccinimid
SATA	S-Acetylthioglykolsäure-N-hydroxysuccinimidester
RLU	Relative Lichteinheiten
NHS	N-Hydroxysuccinimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
TEA	Triethylamin
DC	Dünnschicht-Chromatographie
TNBSA	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
BGG	Rinder-γ-Globulin
TMSCI	Trimethylsilylchlorid
MeOH	Methanol
Biotin-LC ₇	-NHS Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoat
λ _{max} ABS	λ-Absorptionsmaximum
λ _{max} EMI	λ-Maximum der Fluoreszenzemission
λ CH.EM	λ-Maximum der Chemolumineszenzemission

[0114] Alle monoklonalen Antikörper wurden durch herkömmliche Hybridzellen-Technologie erzeugt. Kurz zusammengefasst wurde das geeignete Immunogen in einen Wirt, üblicherweise eine Maus oder ein anderes zweckmäßiges Säugetier, injiziert; nach einer ausreichend langen Zeit wurden die Milzzellen aus dem Wirt erhalten. Alternativ dazu wurden unsensibilisierte Zellen aus dem Wirt isoliert und direkt mit dem Immunogen in vitro sensibilisiert. Hybridzellen wurden durch Fusionieren der obigen Zellen mit einer geeigneten Myelom-Zelllinie und Kultivieren der fusionierten Zellen gebildet. Die durch die kultivierten Hybridzellen produzierten Antikörper wurden auf ihre Bindungsaffinität für das konkrete Antigen, z. B. THS oder HCG, gescreent. Es wurden

einige Screening-Techniken eingesetzt, z. B. ELISA-Screens. Die ausgewählten Fusionen wurden rekloniert.

BEISPIEL 1 (Vergleichsbeispiel)

Gesamt-Triiodthyronin-Test

1. Perlenpräparate

Materialien

[0115] 175 nm Carboxylat-modifizierter Latex (CML-Perlen) von Bangs Laboratories Ethylenglykol, ethoxyethanol, Benzylalkohol, Chlorophyll-a von Aldrich Europium(III)-thienoyltrifluoracetat (EuTTA) von Kodak Tri-octylphosphinoxid (TOPO) von Aldrich Dioxen[1-(4-dimethylaminophenyl)-6-phenyl-1,4-dioxen]: hergestellt nach einem modifizierten Verfahren gemäß Giagnon, S. D. (1982), University Microfilms International (Ann Arbor, Michigan, USA)

Verfahren

1. Chlorophyll-1-Sensibilisatorperlen

[0116] Eine Lösung Chlorophyll-a in Benzylalkohol (1,0 ml, 0,6 mM) wurde 8,0 ml Benzylalkohol bei 105°C zugesetzt. Eine Suspension von Carboxylat-modifiziertem Latex mit einer Größe von 175 nm in Wasser (10%, 1,0 ml) wurde der Benzylalkohol-Lösung zugesetzt. Das Gemisch wurde 5 min lang bei 105°C gerührt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Ethanol (10,0 ml) wurde zugesetzt und das Gemisch zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem 1 : 1-Ethanol-Wasser-Gemisch (10,0 ml) resuspendiert und die Suspension zentrifugiert. Die gleiche Resuspensions- und Zentrifugationstechnik wurde in Wasser (10,0 ml) angewendet und das Pellet in Wasser resuspendiert (1,8 ml).

Charakterisierung

A. Farbstoffkonzentration: Eine Lösung, gebildet durch die Zugabe von 10 µl der obigen Perlensuspension in Dioxan (990 µl), besaß eine Extinktion von 0,11 bis 660 nm, was 2,6 µMol Chlorophyll-a in 1 g Perlen entsprach.

B. Singulett-Sauerstoff-Erzeugung: Ein Gemisch aus Chlorophyll-a-Perlen (200 µg), 2×10^{-4} Mol Anthracen-9,10-dipropionsäure (ADPA) in 2 ml Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5, umfassend 100 mM NaCl) wurde mit einer Wolframhalogen-Lampe, ausgestattet mit einem 645 nm-Cutoff-Filter, 20 min lang bestrahlt. Die Perlen wurden durch Filtration entfernt und die Konzentration des Oxidationsprodukts spektralphotometrisch bei 400 nm bestimmt. Die Rate betrug 3,0 nMol Oxidationsprodukt pro min. Unter den gleichen Bedingungen erzeugten 38 pMol eines löslichen Sensibilisators, Aluminiumphthalocyanintetrasulfonat, die gleiche Menge an Oxidationsprodukt (die Menge an Sensibilisator in den Perlen betrug $200 \cdot 10^6$ $2,6 \cdot 10^{-6}$ = 520 pMol).

2. Chlorophyll-a/Tetrabutylsquat-Sensibilisatorperlen

[0117] Eine Suspension von carboxylierten Latexperlen (Größe 175 nm, 10% Feststoffanteil in Wasser, 30,0 ml) wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Ethylenglykol (60,0 ml) resuspendiert. Die Suspension wurde auf 100°C erhitzt. 9,0 ml einer Benzylalkohol-Lösung – 1,67 mM an Chlorophyll-a und 3,33 mM an Tetrabutylsquat [1,3-bis(4-Dibutylaminophenyl)squat] – wurde langsam im Lauf von 3 min der Suspension zugesetzt. Die Erhitzung wurde 7 min lang fortgesetzt und dann die Suspension in einem Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Benzylalkohol-Suspension wurde kaltem Ethanol (120 ml) zugesetzt. Das Gemisch wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50% Ethanol und Wasser resuspendiert und die Suspension zentrifugiert. Die gleiche Resuspensions- und Suspensions-Vorgangsweise wurde in 5% Ethanol in Wasser (30 ml) wiederholt.

Charakterisierung

A. Farbstoffkonzentration: Die Konzentration des Tetrabutylsquats in den Perlen wurde – wie oben in Zusammenhang mit den Chlorophyll-a-Perlen beschrieben – spektralphotometrisch bestimmt. Der gemessene Wert betrug 44 µM Farbstoff in den Perlen.

B. Singulett-Sauerstoff-Erzeugung: 25 µl einer 5 mM Lösung von ADPA in Ethanol wurden der Perlensuspension (100 µg) in Phosphatpuffer, pH 7,0 (2 mM, umfassend 50 mM NaCl) zugesetzt. Das Gemisch wurde wie

oben mit einem 610 nm-Langpassfilter bestrahlt. Die Erzeugungsrate von Singulett-Sauerstoff wurde anhand der Abnahmerate der Extinktion (bei 400 nm) von ADPA errechnet. Es stellte sich heraus, dass die Perlen $7 \cdot 10^{-2}$ μMol Singulett-Sauerstoff/min erzeugen.

3. Dioxen/EuTTA/OPO-Akzeptorperlen

[0118] 20 ml 175 nm carboxylierter Latexperlen (10% Suspension in Wasser) wurde Ethoxyethanol (20,0 ml) zugesetzt. Das Gemisch wurde auf 90°C erhitzt. 20 ml einer Lösung – 10 mM 2-(p-Dimethylaminophenyl)-3-phenyldioxen, 20 mM Eu-TTA und 60 mM TOPO in Ethoxyethanol – wurden dem Gemisch zugesetzt. Das Erhitzen wurde weitere 7 min lang bei Raumtemperatur bis 97°C fortgesetzt. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt. Ethanol (40,0 ml) wurde zugegeben und das Gemisch zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80% Ethanol resuspendiert und die Suspension zentrifugiert. Die Resuspensions- und Zentrifugations-Vorgänge wurden in 10% Ethanol (36 ml) wiederholt.

Charakterisierung

A. Farbstoffkonzentration: Die Konzentration von EuTTA in den Perlen wurde spektralphotometrisch bestimmt und betrug 0,07 M. Da die Konzentration von Dioxen in der Gegenwart von EuTTA nicht bestimmbar ist, wurde sie unter den gleichen Bedingungen in Perlen gemessen, die nur mit dem Dioxen, 2-(p-Dimethylaminophenyl)-3-phenyldioxen, gefärbt waren. Die Konzentration stellte sich als 0,016 M heraus.

B. Signalerzeugung: Eine Suspension von Perlen (25 μg) in Phosphatpuffer (0,5 ml, 20 mM Phosphat, 50 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,0) wurde mit einer Lösung von 2 μM Aluminiumphthalocyanintetrasulfonat (0,5 ml) im gleichen Puffer vermischt. Das Gemisch wurde 1 min lang mit einer 125 W-Wolframhalogen-Lampe, ausgestattet mit einem 610 nm-Langpassfilter, bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das Gemisch in ein LTurner TD-20e-Luminometer gefüllt und die Lumineszenz 20 s lang gemessen. Die Intensität betrug 327 RLU/s. Die Wellenlänge des ausgesendeten Lichts wurde mittels eines Perkin-Elmer 650-40-Scanning-Spektralfluorimeter gemessen. Die Mitte des Haupt-Emissionspeaks lag in der Nähe von 615 nm.

II. Testverfahren

EDAC/NHS-Bindung von Antikörper an 40 nm-Perlen

[0119] 73,6 mg Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimid, Pierce Chemical Co. # 24510 G) wurden in 6 ml einer Suspension von 4 mg/ml Carboxylat-modifizierten 40 nm-Polystyrolperlen (gefärbt mit Chlorophyll-a und Tetra-butylsquatrat) in Wasser gelöst. 136 μl 0,5 M NaHP_2O_4 wurden zugesetzt. Der pH-Wert wurde auf 5,2 eingestellt. 136 μl zusätzliches Wasser wurden zugesetzt. 130,4 mg EDAC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid, Sigma Chemical Co. #E-6384) in 454 μl Wasser wurden langsam einer Perlen-Rührlösung zugesetzt. Die Suspension wurde 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Perlen wurden 20 min lang bei 15.000 U/min im Sorvall SA-600-Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Perlen wurden anschließend in 1,2 ml 5 mM Natriumphosphat, pH 5,8, resuspendiert und die Suspension ultraschallbehandelt, um die Perlen erneut zu dispersieren. Die Perlen wurden langsam 4,8 ml einer Rührlösung zugesetzt, umfassend 1,7 mg/ml IgG (monoklonales Mäuse-Anti-Fluorescein) und 6,7 mg/ml BSA sowie 17 mM Borx, pH 9,2, und vorsichtig über Nacht bei 4°C gemischt. 800 μl 2 M Glycin und danach 2,8 ml 50 mg/ml BSA in 0,1 M Borax wurden der Perlensuspension zugesetzt. Die Suspension wurde ultraschallbehandelt und 3 h lang vorsichtig bei 4°C vermischt. Die Perlen wurden 30 min lang bei 15.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Perlen wurden in 3 ml 50 mM Natriumphosphat und 150 mM NaCl, pH 7,6, resuspendiert und die Suspension ultraschallbehandelt. Die Schritte der Zentrifugation, Resuspension und Ultraschallbehandlung wurden für insgesamt drei Spins wiederholt. Nach dem dritten Spin wurden die Perlen in 2,4 ml 50 mM Natriumphosphat und 150 mM NaCl, pH 7,6, resuspendiert. Die resultierende Suspension wurde ultraschallbehandelt und bei 4°C gelagert.

III. EDAC/NHS-Bindung von Avidin-D an 175 nm-Perlen

[0120] 4,4 mg Sulfo-NHS wurden in 0,4 ml einer Suspension von 25 mg/ml Carboxylatmodifizierten 175 nm Polystyrolperlen (gefärbt mit 2-(p-Dimethylaminophenyl)-3-phenyldioxen/Eu(TTA)TTOPO) in Wasser gelöst. 0,0160 ml 0,25 M NaHP_2O_4 wurden zugesetzt. 8 mg EDAC, gelöst in 0,030 ml Wasser, wurde langsam der wirbelnden Perlensuspension zugegeben. Die Suspension wurde 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Perlen wurden 20 min lang bei 15.000 U/min im Sorvall SA-600 Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Perlen wurden in 0,6 ml 0,005 M Natriumphosphat, pH 5,8, resuspendiert. Die Suspension wurde ultraschallbehandelt, um die Perlen zu resuspendieren. Die Perlen wurden wiederum langsam 3 ml

einer Rührlösung zugesetzt, die 1,33 mg/ml Avidin-D (Vector) und 17 mM Borax, pH 9,2, enthielt, und vorsichtig über Nacht bei 4°C vermischt. 0,004 ml 1 M Bernsteinsäureanhydrid in DMF wurde zugegeben. Die Suspension wurde 1 h lang bei 4°C unter leichtem Mischen inkubiert. 0,4 ml 50 mg/ml BSA in 10 mM Natriumphosphat und 150 mM NaCl, pH 7,0, wurden zugesetzt. Die Suspension wurde 3 h lang bei 4°C vorsichtig gemischt. Die Perlen wurden 30 min lang bei 15.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Perlen wurden in 3 ml 50 mM Natriumphosphat und 150 mM NaCl, pH 7,6, resuspendiert. Die Suspension wurde ultraschallehandelt. Die Schritte der Zentrifugation, Resuspension und Ultraschallbehandlung wurden für insgesamt drei Spins wiederholt. Nach dem dritten Spin wurden die Perlen in 2,25 ml 50 mM Natriumphosphat und 150 mM NaCl, pH 7,6, resuspendiert. Die Suspension wurde ultraschallehandelt und bei 4°C gelagert.

IV. Gesamter T₃-Assay

Assaypuffer

[0121] 0,075 M Barbital, 0,2 M NaCl, 0,4% BSA, 1,25% Mäuse-IgG, 10 mg/ml Dextransulfat (Molekulargewicht 500.000), 1,0 mg/ml Dextran T-500, 10 µg/ml aggregiertes IgG

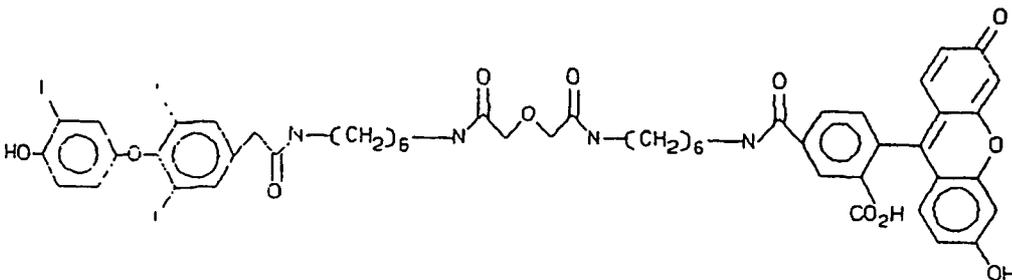
Perlen

[0122] Akzeptorperlen: Avidin.EDAC, 175 nm, gefärbt mit 2-p-Dimethylaminophenyl)-3-phenyldio-
xen/Eu(TTA)₃/TOPO Sensibilisatorperlen: Anti-Fluorescein-EDAC, 40 nm, gefärbt mit Chlorophyll-a/Squarar

Assay-Arbeitsvorschrift

[0123] 50 µl einer Lösung von 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure und Ammoniumsalz (Sigma, A-3125) in Assaypuffer (0,75 mg/ml) wurde 50 µl T₃-Standard oder Probe zugesetzt. 100 µl Assaypuffer wurden zugesetzt. Biotinyliertes Anti-T₃ wurde auf herkömmliche Weise durch Reaktion von Biotin-LC₇NHS (Pierce Chemical Company) mit monoklonalem Anti-T₃, gefolgt von Reinigung durch Chromatographie auf einer Sephadex-Säule, hergestellt. 50 µl biotinyliertes Anti-T₃ (70 ng/ml) in Assaypuffer wurden zugesetzt. Der Tracer, T₃LC₂₁-F1 (1,8 ng/ml)

T₃-LC₂₁-F1



in Assaypuffer (50 µl) wurde zugesetzt. Das Gemisch wurde 15 min lang bei 37 °C inkubiert. 500 µl einer Suspension von Sensibilisatorperlen (50 µg) und Akzeptorperlen (6,25 µg) in Assaypuffer wurden zugesetzt und das Gemisch 15 min lang bei 37°C inkubiert. Es wurde „Stop Solution“ (50 µl; 10 µM Fluorescein, 0,5 mM Biotin) zugesetzt.

[0124] Signal wurde durch eine Halogenlampe mit einem 610 nm-Cutoff-Filter mittels einminütiger Bestrahlung sowie 20-s-Messung abgelesen.

Ergebnisse

[0125] Das Lumineszenzsignal wurde als Funktion der T₃-Konzentration aufgetragen. Die Signalmodulation betrug 94% mit 8,5 ng/ml T₃. Bei 0,5 ng/ml betrug die Signalmodulation 38%.

BEISPIEL 2

Chemolumineszenz-Quantenausbeute und Bestimmung der Abklingrate

Herstellung von Verbindung 11

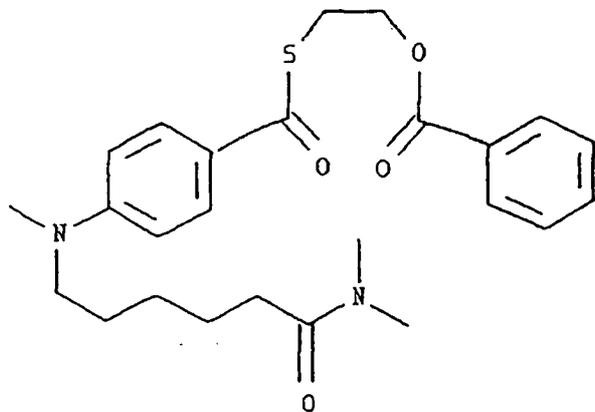
[0126] Einer gerührten Lösung von 2,55 g 4-Dimethylaminobenzoin (10 mMol) in 50 ml trockenem Toluol wurden 1,2 ml 2-Mercaptoethanol (15 mMol) und anschließend 2,5 ml TMSCl zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 18 Stunden lang unter Argon am Rückfluss gehalten, auf Raumtemperatur abgekühlt und in 150 ml einer gesättigten Bicarbonatlösung gegossen. Das Zweiphasen-Gemisch wurde getrennt. Die organische Phase wurde mit 100 ml gesättigter Bicarbonatlösung gewaschen. Die kombinierten wässrigen Phasen wurden mit 75 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat (20 g) getrocknet und eingedampft. Der verbleibende Rückstand wurde Flashchromatographie unterzogen (CH_2Cl_2), um 2,6 g der Verbindungen 11 und 20 (4 : 1-Gemisch der 2-Regioisomere) zu ergeben.

[0127] Der aschfarbene Feststoff wurde aus einem CH_2Cl_2 -MeOH-Gemisch (10 : 90) umkristallisiert, um 1,8 g nadelförmige Kristalle eines einzigen Regioisomers der Verbindung 11 zu ergeben.

[0128] Fp.: 108°C–110°C $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz): δ 2,85 (s, 6H), 3,22 (t, 2H), 4,5 (t, 2H), 6,55 (d, 2H), 7,1 – 7,3 (m, zH) Massenspektrum: (Cl: m/e, relative Intensität) Hauptpeaks: 297 (M^+ , 40), 165 (100) Absorptionsspektren (Toluol): 330 nm (ϵ 13.000)

Photooxidations-Verfahren

[0129] 25 mg Verbindung 11 (Haupt-Regioisomer, siehe oben) wurden in 10 ml CH_2Cl_2 in einen Photooxidations-Röhrchen gelöst. Etwa 50 mg Polystyrol-gebundenes Diodeosin wurde zugesetzt und ein Sauerstoff-Einleitrohr angeschlossen. Sauerstoff wurde langsam durch die Lösung geleitet, während die Probe mit einer Dolan-Jenner-Lampe (ausgestattet mit einem 500 nm-Cutoff-Filter) bestrahlt wurde. Der Reaktionsverlauf wurde durch DC überwacht. Ein Fleck für das Thioesterprodukt konnte detektiert werden und besaß einen niedrigeren $R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2)$ als Verbindung 11. Die Reaktion wurde als abgeschlossen betrachtet, als Verbindung 13 vollständig aufgebraucht war. Der Sensibilisator wurde abfiltriert und die Lösung auf einem Rotationsverdampfer eingedampft, um 26 mg Thioester 32 als einziges Produkt zu ergeben.



(32)

[0130] $^1\text{H-NMR}$: (CD_2Cl_2): δ 3,05 (s, 6H), 3,4 (5, 2H), 4,45 (5, 2H), 6,72 (d, 2H), 7,5 (m, 3H), 7,85 (d, 2H), 8,05 (d, 2H).

[0131] Massenspektren (Cl, relative Intensität) Hauptpeaks 329 (M^+ , 25) 148 (100) Absorptionsspektrum (CH_2Cl_2): 342 nm (\sim 30.000) Fluoreszenzspektrum (Toluol): 370 nm

Fluoreszenzmessungen

[0132] Eine Lösung von Thioester 32 wurde in vier unterschiedlichen Lösungsmitteln gebildet (trockenes Toluol; CH_2Cl_2 ; Hexan; und Acetonitril) und in eine 1-cm²-Quarzkuvette im Probenfach eines Perkin-Elmer 650-40-Fluorimeters gefüllt. Die Probe wurde an den Absorptionsmaxima jedes Lösungsmittels angeregt (Schlitzbreite: 2 nm) und die Emissionsspektren (Schlitzbreite: 3 nm) durch Abtasten von 350 nm bis 470 nm aufgezeichnet. Der Fluoreszenz-Wirkungsgrad wurde bestimmt und ist in Tabelle 1 angegeben.

[0133]

Tabelle 1
Wirkungsgrad von Thioester in unterschiedlichen Lösungsmitteln

Verbindung	Lösungsmittel	λ ABS (nm)	λ EMI (nm)	Φ
Diester*	Toluol	314	360	0,1
			400	
Thioester 32**	Toluol	338	370	0,025
	CH ₂ Cl ₂	340	390	0,07
	Hexan	332	370	-0,006
	CHCN	342	390	-0,006

* 2-(p-Dimethylaminophenyl)3-phenylethyldiester, Giagnon, S.D. (1982), University Microfilms International (Ann Arbor, Michigan, USA)

** Thioester wird bei Anregung mit 340 nm in Toluol rasch fotogebleicht.

Bestimmung der Quantenausbeute der Chemolumineszenz

Herstellung von Eu(TTA)₃Phen

[0134] 8,69 g Eu(TTA)₃·3H₂O (10 mMol, Kodak) und 1,8 g 1,10-Phenanthrolin (10 mMol, Aldrich) in 50 ml trockenem Toluol wurden in einem Ölbad 1 h lang auf 95°C erhitzt. Toluol wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der aschfarbene Feststoff wurde aus 10 ml Toluol kristallisiert, um 10 g Eu(TTA)₃Phen zu ergeben.

[0135] Absorptionsspektrum. 270 nm (20.000), 340 nm (60.000) (Toluol) IR(KBr): Cm⁻¹: 3440(s), 1600(s), 1540(s), 1400(s), 1300(s)

Energietransfer von Eu(TTA)₃Phen

[0136] Eine Lösung von Verbindung 11 (Regioisomere, siehe oben; 0,1 mM; 8 : 2-Gemisch), Aluminiumphthalocyanin (0,1 µM) und Eu(TTA)₃Phen (siehe oben; 0 – 4,0 mM) in trockenem Toluol wurden in eine 1 cm²-Quazküvette (zweiseitig versilbert) im Probenfach eines Spex Fluorolog-Spektralphotometers gefüllt. Die Temperatur der Probenhalterung wurde durch ein externes zirkulierendes Wasserbad bei 25°C gehalten. Ein 640-nm-Cutoff-Filter wurde vor dem Anregungsstrahl angeordnet. Die Probenlösungen wurden zumindest 3 min lang im Probenfach gehalten, bis thermisches Gleichgewicht erzielt wurde. Die Emission wurde im zeitabhängigen Modus aufgezeichnet. Die Proben wurden bei 680 nm (Schlitzbreite 24 nm) bestrahlt, bis ein stationärer Emissionszustand bei 613 nm (Schlitzbreite 8 nm) erreicht wurde. Die Lichtintensität im stationären Zustand bei verschiedenen Konzentrationen von Eu(TTA)₃-Phen wurde aufgezeichnet und ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Anhand der Lichtintensität im stationären Zustand wurden die Quantenausbeuten bestimmt. Reziproke Doppelkurven der Chemolumineszenzintensität über der Eu(TTA)₃Phen-Konzentration waren linear.

[0137]

Tabelle 2 Chemolumineszenz-Wirkungsgrad als Funktion von $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{Phen}$ -Konzentration

Verbindung 11*	$\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{Phen}$	RLU bei 613 nm
nM	nM	
0,1	0	-
0,1	0,05	$7,43 \times 10^4$
0,1	0,1	$1,8 \times 10^5$
0,1	0,2	$2,89 \times 10^5$
0,1	0,5	$6,13 \times 10^5$
0,1	1,0	$9,45 \times 10^5$
0,1	2,0	$1,17 \times 10^6$
0,1	4,0	$1,32 \times 10^6$
0,1**	4,0	$1,6 \times 10^6$

* Außer für den letzten Lauf enthielt die in diesen Versuchen verwendete Verbindung 11 20 % ihres Regioisomers 20

** Die in diesem Versuch verwendete Verbindung 11 enthielt mehr als 98 % eines einzigen Regioisomers.

Chemolumineszenz von Dioxen 9

[0138] Versuch 1: Eine Lösung von Dioxen 9 (0,1 mM) und Aluminiumphthalocyanin (0,1 μM) in trockenem Toluol wurde mit 680 nm wie oben bestrahlt. Es wurde die Emission bei einer Lichtintensität von 400 nm (Schlitzbreite 8 nm) als Funktion der Bestrahlungszeit aufgezeichnet. Die Lichtintensität betrug für 180 s Bestrahlung 8793 RLU (Mittelwert von drei Versuchen).

[0139] Versuch 2: Die Rate der Dioxen 9-Dioxetan-Zersetzung wurde durch Abklingen der Chemolumineszenz einer belüfteten Lösung in trockenem Toluol bei 25°C überwacht. Die Zersetzungsrate wurde in Gegenwart von 1,0 μM Aluminiumphthalocyanin und Dioxen (weniger als 0,1 mM Dioxen) überwacht. Das Abklingen der Chemolumineszenz wurde auf einem Spex-Fluorolog-Spektralphotometer unter den oben genannten Bedingungen überwacht. Die Geschwindigkeitskonstante des Abklingens bei 25°C betrug $2,88 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Herstellung von Akzeptorperlen

[0140] 4 ml einer 20% Suspension (400 mg) von 175 nm gewaschenem Carboxylat-modifiziertem Latex wurde mit 3 ml Ethoxyethanol in einem 25 ml Rundkolben mit einem Rührer verdünnt. Der Rundkolben wurde dann bei 105°C in ein Ölbad eingebracht und 10 min lang gerührt. Danach wurden 3,3 mM Thioxen 11 und 15,5 mM $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$ zugesetzt. Die Perlen wurden 5 weitere min lang gerührt. Zu diesem Zeitpunkt wurde 1,0 ml 0,1 n NaOH langsam im Lauf von 5 min zugesetzt. Während aller Zugaben wurde die Ölbadtemperatur auf 105°C gehalten. Die Ölbadtemperatur wurde im Lauf von 2 h langsam auf Raumtemperatur gesenkt.

[0141] Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch mit 20 ml Ethanol verdünnt und zentrifugiert (12.500 U/min, 30 min). Überstände wurden verworfen und die Pellets in Ethanol durch Ultraschallbehandlung resuspendiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und das Pellet in Wasser resuspendiert; dann wurde die Zentrifugation nochmals wiederholt. Das Pellet wurde in 5 ml wässrigem Ethanol in einem Endvolumen von 40 ml resuspendiert. Die Endkonzentration der Perlen betrug 10 mg/ml.

[0142] Die Konzentration von $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$ wurde spektralpotometrisch bestimmt. Eine Aliquote der Perlen-suspension wurde unter einem Strom von trockenem Argon bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in Dioxan gelöst. Unter Annahme einer Dichte von 1,06 g/cm³ für Polystyrol, (ϵ 340 nm = $6,7 \times 10^4$) für $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$ und (ϵ 270 nm = $4,0 \times 10^4$) für DPP wurde die Konzentration von $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$ mit 100 mM bestimmt. Die Konzentration von Verbindung 11 in den Perlen konnte nicht bestimmt werden, da ihre Extinktion durch $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$ maskiert war.

[0143] Die Chemolumineszenz der Perlen wurde in einem ORIEL-Luminometer unter Einsatz von wasserlöslichem Aluminiumphthalocyanin als Sensibilisator gemessen. Eine Aliquote von Perlen wurde in Phosphatpuffer, pH 8,0, mit 0,1% Tween-20 auf 100 µg/ml verdünnt. 1,0 µM Aluminiumphthalocyanintetrasulfonsäure wurde zugesetzt und das chemolumineszierende Signal als Funktion der Bestrahlungszeit gemessen. Eine identische Probe wurde auch in ein Spex-Fluorolog-Fluorimeter eingebracht und bei 680 nm (Schlitzbreite: 20 nm; 640-nm-Cutoff-Filter) bestrahlt. Die Chemolumineszenz-Emissionsspektren wurden durch Abtasten von 570 nm bis 620 nm aufgezeichnet und sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Bestimmung von Quantenausbeuten in Perlen

Dioxen 9-Perlen

[0144] Eine Lösung von Dioxen 9-Perlen (0,2 mg) in Aluminiumphthalocyanintetrasulfonsäure (2,5 µM) in Phosphatpuffer (pH 8,2; 50 mM 0,1% Tween-20) wurde in eine 1-cm²-Quarzküvette (zweiseitig versilbert) im Probenfach eines Spex-Fluorolog-Spektralphotometers gefüllt. Die Temperatur der Probenhalterung wurde auf 25°C gehalten. Ein 640-nm-Cutoff-Filter wurde vor dem Anregungsstrahl positioniert. Die Probenlösungen wurden zumindest 3 min lang im Probenfach gehalten, damit thermisches Gleichgewicht erzielt werden konnte. Die Lichtemission bei 360 nm wurde im zeitabhängigen Modus aufgezeichnet. Die Proben wurden bei 680 nm (Schlitzbreite: 24 nm) 60 s lang bestrahlt. Die Emission bei 360 nm (Schlitzbreite: 16 nm) wurde im Zeitverlauf 5000 s lang aufgezeichnet. Das gesamte ausgestrahlte Licht wurde mittels das „Cut-and-weigh“-Verfahrens bestimmt. Auch die Peakform-Korrektur erfolgte durch das Cut-and-weigh-Verfahren. Das gesamte bei 360 nm ausgestrahlte Licht betrug $8,87 \pm 0,2 \times 10^4$ RLU (45000 s (nach der Peakform-Korrektur; Mittelwert von 2 Versuchen}).

Dioxen 9: Eu(TTA)₃TOPO-Perlen

[0145] Eine Lösung von Dioxen 9 Eu(TTA)₃TOPO-Perlen (0,2 mg) und Aluminiumphthalocyanintetrasulfonsäure (2,5 µM) in Phosphatpuffer (pH 8,2, 50 mM 0,1% Tween-20) wurde in eine 1-cm²-Quarzküvette (zweiseitig versilbert) im Probenfach eines Spex-Fluorolog-Spektralphotometers gefüllt. Der Rest des Versuchs erfolgte wie für die Dioxen 9-Perlen. Die Lichtemission der Perlen wurde bei 613 nm (Schlitzbreite: 16 nm) aufgezeichnet.

[0146] Das gesamte ausgesendete Licht wurde durch das Cut-and-weigh-Verfahren bestimmt. Die PMT-Korrektur erfolgte wie zuvor in Lösungsstudien beschrieben. Das gesamte ausgesendete Licht bei 613 nm betrug $25,0 \pm 0,3 \times 10^5$ RLU/4500 s (nach PMT-Korrektur; Mittelwert von 2 Versuchen).

Verfahren betreffend den stationären Zustand

Dioxen 9: Eu(TTA)₃TOPO-Perlen

[0147] Eine Lösung von Dioxen 9 (Eu(TTA)₃TOPO-Perlen; 0,5 mg) und Aluminiumphthalocyanintetrasulfonsäure (0,05 µM) in Phosphatpuffer (pH 8,2; 50 mM 0,1% Tween-20) wurde in ein 12–75 mM Reagenzglas im Probenfach eines ORIEL-Chemoluminometers gefüllt. Die Temperatur der Probenhalterung betrug 37°C. Ein 610-nm-Cutoff-Filter wurde vor dem Anregungsstrahl positioniert. Die Probenlösungen wurden zumindest 5 min lang im Probenfach gehalten, damit thermisches Gleichgewicht erzielt werden konnte. Die Probe wurde in 30 s-Intervallen bestrahlt, gefolgt von einer 5 s dauernden Ablesezeit, bis ein stationärer Emissionszustand erreicht wurde. Die durchschnittliche Intensität bei Emission in stationärem Zustand betrug 21.000 ± 1000 RLU (3 Versuche).

Verbindung 11: Eu(TTA)₃DPP-Perlen

[0148] Eine Lösung von Thioxen 11 (Eu(TTA)₃DPP-Perlen (0,5 mg) und Aluminiumphthalocyanintetrasulfonsäure (0,05 µM) in Phosphatpuffer (pH 8,2, 50 mM, 0,1% Tween-20) wurde in ein 12-75 mM Reagenzglas im Probenfach eines ORIEL-Chemoluminometers gefüllt. Die Temperatur der Probenhalterung betrug 37°C. Ein 610-nm-Cutoff-Filter wurde vor dem Anregungsstrahl positioniert. Die Probenlösungen wurden zumindest 5 min lang im Probenfach gehalten, damit thermisches Gleichgewicht erzielt werden konnte. Die Probe wurde in 6 s-Intervallen bestrahlt, gefolgt von einer 3 s dauernden Ablesezeit, bis ein stationärer Emissionszustand erreicht wurde. Die durchschnittliche Intensität bei Emission in stationärem Zustand betrug 32.000 ± 1000 (3 Versuche).

[0149]

Tabelle 3 Chemolumineszenz-Eigenschaften von Thioxen 11 und Dioxen 9

Verbindung	Medium	λ_{\max} (CH.EM)	$t_{1/2}$	Φ
11 (100 μM)	Toluol	400 nm	2,1 s	niedrig*
11 + Eu(TTA) ₃ Phen (4 mM)	Toluol	613 nm	1,8 – 2,1 s	0,20***
11 + Eu(TTA) ₃ DPP (100 mM)	CML-Perlen	613 nm	Abklingen mehrphasig (anfängliche $t_{1/2}$ bei 37 °C: -0,5 s)	0,46
9 (100 μM)	Toluol	420 nm	3462 s	0,015
**	CML-Perlen	360 nm	Abklingen mehrphasig	0,008
9 + Eu(TTA) ₃ ·TOPO (16 mM)	CML-Perlen	613 nm (Haupt) 400 nm	Abklingen mehrphasig	0,31

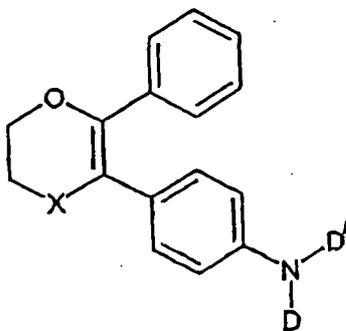
* weniger als 0,0003

** Vergleich, keine Verbindung vorhanden

*** 0,37 für Eu(TTA)₃Phen-Konzentration bis zur Unendlichkeit extrapoliert

Patentansprüche

1. Chemolumineszierende Verbindung der Formel:



worin X = S ist und D und D' = Methyl sind.

2. Zusammensetzung, umfassend

(a) ein Metallchelate, das ein Metall, das aus der aus Europium, Terbium, Dysprosium, Samarium, Osmium und Ruthenium bestehenden Gruppe ausgewählt ist, in zumindest sechsfach koordiniertem Zustand umfasst; und

(b) eine chemolumineszierende Verbindung nach Anspruch 1.

3. Zusammensetzung, die einen Latex umfasst, in dem eine Verbindung nach Anspruch 1 enthalten ist.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, die weiters ein Metallchelate umfasst, worin das Metall aus der aus Europium, Terbium, Dysprosium, Samarium, Osmium und Ruthenium bestehenden Gruppe in zumindest sechsfach koordiniertem Zustand ausgewählt ist.

5. Verfahren zum Bestimmen eines Analyten, das Folgendes umfasst:

(a) das Bereitstellen einer Kombination aus (1) einem Medium, von dem vermutet wird, dass es einen Analyten enthält, (2) einem Photosensibilisator, der in seinem angeregten Zustand in der Lage ist, Sauerstoff in den Singlett-Zustand zu aktivieren, wobei der Photosensibilisator mit einem Element eines spezifischen Bindungspaares (sbp) assoziiert ist, und (3) suspendierbarem Latex-Teilchenmaterial, das eine chemolumineszierende Verbindung umfasst, wobei an das Teilchenmaterial ein sbp-Element gebunden ist, wobei die chemolumineszierende Verbindung eine Verbindung nach Anspruch 1 ist;

(b) das Behandeln der Kombination mit Licht, um den Photosensibilisator anzuregen, und

(c) das Untersuchen der Kombination bezüglich der Menge an davon ausgesandter Lumineszenz, wobei die Menge der Lumineszenz mit der Menge an Analyt im Medium in Beziehung steht.

6. Verfahren nach Anspruch 5, worin der Photosensibilisator in einem zweiten suspendierbaren Teilchenmaterial enthalten ist.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, worin der Photosensibilisator ein Farbstoff ist, der im angeregten Zustand molekularen Sauerstoff zu Singlett-Sauerstoff aktivieren kann.

8. Verfahren nach Anspruch 7, worin der Farbstoff aus der aus Methylenblau, Diodeosin, Porphyrinen und Phthalocyaninen bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8, worin die sbp-Elemente unabhängig voneinander aus der aus Rezeptoren, Liganden und Polynucleotiden bestehenden Gruppe ausgewählt sind.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9, worin der Analyt aus der aus Arzneimitteln, Proteinen, Nucleinsäuren und Mikroorganismen bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 10, worin das Verfahren ein homogener Immuntest ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 11, worin die Kombination mittels Bestrahlung behandelt wird, um den Photosensibilisator anzuregen.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 12, worin die Kombination mit Licht mit einer Wellenlänge von 450 bis 950 nm bestrahlt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 13, worin das mit dem Photosensibilisator assoziierte sbp-Element Avidin oder ein Antikörper ist und das sbp-Element der chemolumineszierenden Verbindung Avidin oder ein Antikörper ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 14, worin das Teilchenmaterial ein Metallchelate umfasst, das ein Metall umfasst, das aus der aus Europium, Terbium, Dysprosium, Samarium, Osmium und Ruthenium bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

16. Set, das eine abgepackte Kombination aus Folgendem umfasst: (1) einer Zusammensetzung, die ein suspendierbares Latexteilchen umfasst, das eine chemolumineszierende Verbindung nach Anspruch 1 umfasst, wobei an das Teilchen ein Element eines spezifischen Bindungspaares (sbp) gebunden ist, und (2) einem Photosensibilisator, der in seinem angeregten Zustand dazu fähig ist, Sauerstoff in seinen Singlett-Zustand zu aktivieren.

17. Set nach Anspruch 16, das eine Zusammensetzung umfasst, die ein zweites suspendierbares Teilchen umfasst, das den Photosensibilisator umfasst, wobei an das zweite Teilchen ein sbp-Element gebunden ist.

18. Set nach Anspruch 16 oder 17, worin das Teilchenmaterial ein Metallchelate umfasst, das ein Metall um-

DE 694 32 640 T2 2004.03.25

fasst, das aus der aus Europium, Terbium, Dysprosium, Samarium, Osmium und Ruthenium bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen