



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 36 409 A1** 2004.02.12

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **102 36 409.5**

(22) Anmeldetag: **02.08.2002**

(43) Offenlegungstag: **12.02.2004**

(51) Int Cl.⁷: **B01J 13/10**

C08J 3/20, G01N 33/50, G01N 31/00

(71) Anmelder:

Capsulation NanoScience AG, 12489 Berlin, DE

(74) Vertreter:

Zimmermann & Partner, 80331 München

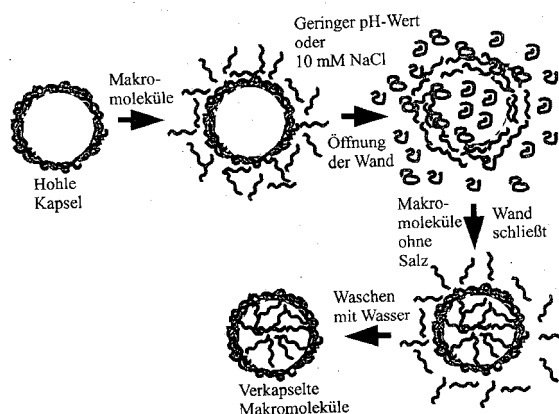
(72) Erfinder:

Dähne, Lars, 12587 Berlin, DE; Baude, Barbara, 14548 Caputh, DE; Voigt, Andreas, Dr., 13051 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Farbkodierte Nanopartikel**

(57) Zusammenfassung: Monodisperse, sphärische Kolloide wurden durch abwechselndes Aufbringen von Polyanionen und Polykationen mittels des "layer by layer" Verfahrens beschichtet. An die Polykationen werden Fluoreszenzfarbstoffe kovalent gebunden (gelabelt), welche bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren und emittieren. Pro Schicht wird eine definierte Menge eines Farbstoffes aufgebracht. Die Farbstoffmenge kann durch Variation des Labelgehalts der Polymere oder durch Co-Abscheidung von ungelabelten Polymeren variiert werden. Unterschiedliche Kombinationen von Farbstoffmarkierungen wurden auf die Partikel abgeschieden, wobei die Farbstoffmarkierungen voneinander durch Zwischenschichten aus Polyanionen getrennt sind. Unerwünschte Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen wie z. B. Selbstlöschung, Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) oder die Bildung von J- und H-Aggregaten kann durch Aufnahme von ausreichend vielen Zwischenschichten zwischen den Farbstoffen unterdrückt werden. Umgekehrt kann durch Einstellung eines definierten Abstandes (0-6 nm) zwischen geeigneten Farbstoffpaaren ein FRET-Signal erzeugt werden, welches durch über die Anzahl der Zwischenschichten unabhängig von der Farbstoffkonzentration kontrolliert werden kann. Die Kodierung kann durch Messung der Fluoreszenzsignale der Kapseln bei unterschiedlicher Anregung und unterschiedlicher Emissionswellenlänge ausgelesen werden. Dies kann mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie für einzelne Kapseln, mittels statischer ...



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft kombinatorische Bibliotheken auf der Basis von hohlen oder gefüllten Polyelektrolytkapseln, die mittels der Layer by Layer Methode hergestellt werden. Die LbL Methode ermöglicht die Kontrolle der Anzahl, der Konzentration und des Abstandes zwischen den Farbstoffmolekülen auf der Nanometerskala, wodurch sich eine höhere kodierte Informationsmenge in der Wand (Hülle) ergibt, als es von Partikeln (Beads, volle Mikropartikel) bekannt ist, die in ihrem Volumen oder an ihrer Oberfläche farblich kodiert sind. Der zweite Teil der Erfindung befaßt sich mit der Möglichkeit, Kapseln mit unterschiedlichen Makromolekülen zu füllen, jedoch die Kapseln weiterhin permeabel für kleine Moleküle zu halten. Derartige farb-kodierte Kapseln können als kombinatorische Fangbehälter verwendet werden, welche eine erhebliche Menge von spezifischen Substanzen aus einem Reaktionsgemisch aufnehmen können. Nachfolgend können die unterschiedlichen Kapseln mit unterschiedlichen Substanzen in ihrem Inneren aufgrund ihrer spezifischen Fluoreszenzsignale aussortiert werden. Diese kombinatorischen Bibliotheken können in vielen Gebieten in der Medizin, der Biologie und der Chemie angewendet werden.

[0002] Die Miniaturisierung von Assays und Mikrotiterplatten ist im Hinblick auf eine weitere Vergrößerung der Assayskapazität begrenzt. Eine alternative Methode eröffnen die auf Beads basierenden Bibliotheken. Neue Entwicklungen in der Flußzytometrie (Flow Cytometrie; z.B. COPAS™ bead flow sorting) erlauben einen Durchsatz von bis zu 100.000 Partikel pro Stunde. Daher könnten die auf Beads basierenden Bibliotheken die führende Technologie in Screening- oder Sammeloperationen werden.^{1-5,7} Wir haben hohle Kapseln aus Polyelektrolyten⁶ hergestellt, welche unterschiedliche Farbkombinationen in ihrer Wand enthalten. Die farb-kodierten Kapseln können wie Beads sortiert werden, jedoch sind sie hohl und können viele Bindungsstellen sowohl auf der Wandoberfläche als auch in ihrem Inneren aufweisen.

[0003] Diese Kapseln haben im Vergleich zu der Beads-Technologie verschiedene Vorteile:

1. Ihrer Masse ist sehr gering. Daher fallen Sie aus Lösungen mit unterschiedlicher Dichte wesentlich langsamer als Beads aus.
2. Infolge ihrer dünnen Wand und dem gleichen oder ähnlichem Material im Inneren wie im Äußeren ist die Lichtstreuung sehr klein. Bei Beads führen Unterschiede im Brechungsindex zwischen Bead und dem Lösungsmittel (gewöhnlich Wasser) zu starker Lichtstreuung, die den Sortierprozeß im Flußzytometer beeinträchtigt.
3. Reaktionen sind bei Beads nur an deren Oberfläche möglich. Daher ist die Anzahl ihrer Bindungsstellen stark begrenzt. Im Falle unserer Kapseln können die äußere Wandoberfläche, die innere Wandoberfläche und das gesamte Volumen der Kapseln für Reaktionen genutzt werden. Eine Kapseln (oder ein Bead) mit einem Durchmesser von 5 µm hat eine äußere Oberfläche von 78 µm² und ein Volumen von 65 µm³. Unter Annahme einer Konzentration der Bindungsstellen von 0.1 M weist ein Bead lediglich etwa 9×10^4 Bindungsstellen auf, wohingegen eine Kapseln etwa 5000 mehr Bindungsstellen, nämlich 4×10^8 Bindungsstellen aufweist.
4. Die Farbstoffmarkierungen können mit ausreichendem Abstand untereinander aufgebracht werden, um Wechselwirkungen wie die Bildung von H- oder J-Aggregaten, Selbstlöschung oder Förster-Resonanzenergietransfer zu vermeiden, welche die Fluoreszenzsignale im Falle der Markierung der Festkörperphase mit unterschiedlichen Farbstoffen stören. Dies gestattet mehr kombinatorische Möglichkeiten.
5. Förster Resonanzenergietransfersignale können kontrolliert zur fälschungssichere Kodierung von Handelsmarken eingestellt werden.
6. Der Innenraum der Kapseln kann mit hochaktiven Biowirkstoffen wie Enzyme, DNS oder dergleichen oder mit spezifisch funktionalisierten Polyelektrolyten gefüllt werden, welche ein selektives Fangen von Reaktionspartnern aus der Lösung durch Bioreaktionen, Physi- oder Chemisorption ermöglichen. Nachfolgend können die kodierten Kapseln aussortiert werden.
7. Die kodierte Information kann durch die Anzahl der Farbstoffen, ihr Verhältnis untereinander und durch abstandesabhängige Wechselwirkungen untereinander wie etwa dem Förster Resonanzenergietransfer eingestellt werden. Bei den bekannten fluoreszierenden Beads⁴ sind solche Wechselwirkungen unerwünscht, da der Abstand zwischen den Farbstoffmolekülen nicht kontrollierbar ist.
8. Herstellung von hohlen kodierten Kapseln und Nutzung ihres Innenraums für die Immobilisierung von Makromolekülen (Polyelektrolyte, Proteine, Enzyme). Die funktionalisierten Makromoleküle können komplementäre Verbindungen aus Reaktionslösungen durch Physisorption, Chemisorption biologische Bindungen herausfischen.

Beschreibung der Experimente

Farbstoffmarkierung von Polyelektrolyten

[0004] PAH wurde mit den Farbstoffderivaten Fluoreszeinisothiocyanat, Tetramethylrhodaminisothiocyanat

und einem Derivat von CY5 markiert. Die Formeln sind in **Abb. 1** dargestellt. Die Markierungsreaktionen wurde entsprechend allgemeiner Herangehensweise bei der Markierung von Proteinen durchgeführt. Anstelle eines Hydrogenkarbonatpuffers wurde NaOH für die Aktivierung von ca. 30% der PAH Gruppen verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde gegen Wasser dialysiert. Nach Zugabe von HCL zu der markierten PAH-Lösung zur Einstellung eines pH-Wertes von 4 – 5 wurde die Lösung lyophilisiert. Der Markierungsgehalt wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt und betrug für PAH-FI 53:1, PAH-Rho 580:1, PAH-Cy5 500:1 (Verhältnis der PAH Einheiten : Anzahl der markierten Moleküle). Die Ausbeute der Markierung betrug ca. 80% für Fluoreszein, 20% für Rhodamine und 40% für Cy5. Jedes PAH wurde nur mit einem Farbstoff markiert, da ein gleichzeitiges Markieren einer PAH-Kette den Nachteil der Selbstlöschung oder des Förster Resonanz Energie Transfer in sich birgt.

[0005] Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Farbstoffe sind in **Abb. 2a** und **b** gezeigt. Die Absorptionsmaxima der drei markierten PAH-Polymere wurden zu 495, 557 und 648 nm bestimmt. Die Fluoreszenzmaxima betragen 520, 582 und 665 nm, wobei die Absorptionswellenlänge für die Anregung verwendet wurde.

Herstellung der Kapseln

[0006] 3 µm große Silicatemplate wurden mit 10 alternierenden Schichten von Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH, MW 60 000 g/mol) und Poly(styrolsulfonat) (PSS, MW 70 000 g/mol) beschichtet.⁹ Um unterscheidbare Wände zu erhalten, wurden unterschiedlich markierte PAH-Polymere für die Beschichtung verwendet. Für die Färbung der Kapseln wurde lediglich eine Schicht des jeweiligen PAH verwendet. Nur im Falle von Cy5 wurden aufgrund der geringeren Fluoreszenzquantenausbeute und des geringen Farbstoffgehalts 2 Schichten zur Markierung verwendet. Es wurde versucht, einen gewissen Abstand zwischen den unterschiedlichen Farbstoffschichten zur Vermeidung von Förster-Resonanzenergietransfer einzuhalten. Folgende Kapseln wurden hergestellt:

Schicht/Kapsel	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
1. PAH	-	-	-	-	-	-	-	-
2. PSS	-	-	-	-	-	-	-	-
3. PAH	-	-	-	Cy5	Cy5	Cy5	Cy5	-
4. PSS	-	-	-	-	-	-	-	-
5. PAH	Rho	Rho	Fluo	Cy5	Cy5	Cy5	Cy5	-
6. PSS	-	-	-	-	-	-	-	-
7. PAH	-	-	-	-	Fluo	Rho	Fluo	-
8. PSS	-	-	-	-	-	-	-	-
9. PAH	-	Fluo	-	-	-	-	Rho	-
10. PSS	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 1
Farbkodierte Kapseln mit unterschiedlichen Arten von PAH-Farbstoff-Schichten

Hohle Kapseln wurde durch Auflösen des Silicatemplats mittels Fluorwasserstoffsäure und Waschen mittels Wasser gewonnen.

[0007] Die Kapseln wurden mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie unter gleichzeitiger Verwendung von 3 unterschiedlichen Kanälen untersucht (**Abb. 3a – c**). Die Anregungswellenlänge der Laser war 488 nm für Fluoreszein, 543 nm für Rhodamin und 633 nm für Cy5. Die Detektoren wurden auf maximale Emission der Farbstoffe und auf einen minimalen Überlapp ihrer Fluoreszenzemission eingestellt. Die Laserintensitäten und die Detektorempfindlichkeiten wurden auf etwa gleiche Signalintensität für jeden Kanal eingestellt. Die Überlagerung der 3 Kanäle ergab 7 verschieden gefärbte Kapseln (**Abb. 3d**).

[0008] Eine quantitative und sichere Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Kapseln bietet die Analyse der Fluoreszenzintensitäten entlang eines Profils durch die Kapseln. Die Profile zeigen die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten von unterschiedlichen Kanälen der gleichen Kapsel. **Abb. 4a** zeigt zum Beispiel das

Profil der Kapseln des 2, 7, 1 und 5.

[0009] Die Fluoreszenzintensitäten pro Farbstoffschicht sind unterschiedlich für unterschiedlich gefärbte Kapseln, was auf Resonanzenergieeffekte und unterschiedlichem Gehalt an adsorbiertem Material zurückgeführt werden kann. Der Resonanzenergietransfer kann bei Verwendung mehrerer Schichten zwischen den Farbstoffschichten deutlich reduziert werden. Oberhalb eines Abstands von 6 nm (ca. 4 Schichten) treten nahezu keine Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffmolekülen mehr auf.

[0010] Kontrollierter Förster-Resonanzenergietransfer Um feste Abstände zwischen den Farbstoffmolekülen zum Schutz von Handelsmarken gegen eine Fälschung zu verwenden, wurden Kapseln mit unterschiedlichem Abstand der Farbstoffe aber gleichem Farbstoffgehalt hergestellt. **Abb. 5** zeigt die hergestellten Schichtkombinationen.

[0011] Die in den Kapseln mittels zwei Farbstoffen kodierte Information kann unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen und Fluoreszenzmessung bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen ermittelt werden. Im Falle des Rhodamin/Fluoreszein-Systems bedeutet dies:

1. Anregungslicht bei 540 nm, Messung der Emission bei 576 nm: dies ergibt die absolute Konzentration von Rhodamine
2. Anregungslicht bei 495 nm, Messung der Emission bei 520 nm: dies ergibt die Konzentration von Fluoreszein abzüglich der Konzentration der Moleküle, die einen Energietransfer zu Rhodamin erfahren
3. Anregungslicht bei 495 nm, Messung der Emission bei 576 nm: dies ergibt die Intensität des FRET oder den mittleren Abstand zwischen den Farbstoffmolekülen (Fälschungsnachweis)

[0012] Jede der hergestellten Kapselarten ergibt ein spezifisches Verhältnis zwischen Signal 1 : Signal 2 : Signal 3. Für die Messung von kleinen Unterschieden in der Signalintensität genügen bereits diese zwei Farbstoffe, um eine große Anzahl von Kodierungsmöglichkeiten zu realisieren. Jedoch kann die Anzahl der Farbstoffe in Kapseln bis zu 7 betragen.

Füllen der Kapseln mit reaktiven Makromolekülen

[0013] Es gibt drei unterschiedliche Wege für die Immobilisierung von Makromolekülen im Inneren der Kapseln:

1. "Schiff in Flasche" Synthese (ship in bottle synthesis) von Polymeren innerhalb der Kapseln (**Abb. 6**).¹²
2. Schalten der Permeabilität von spezifischen Kapseln für korrespondierende Makromoleküle mittels Salze oder pH-Änderungen (**Abb. 7**).¹¹
3. Bilden eines Niederschlags eines instabilen Komplexen aus den Makromolekülen und einer Hilfssubstanz auf dem kolloiden Templat. Nachfolgendes Einkapseln des Materials durch die übliche LbL-Methode und Auflösen des Kerns und des Makromolekülkomplexes.⁸

Literatur

1. Battersby, Bronwyn Jean et. al. Patent WO 00/32542, Juni 2000
2. Payan, Donald US Patent 20010006787, A1, Juli 2001,
3. Still, et. al. US Patent 5,565,324, Oktober 1996; Still et.al., US Patent 6,001,579, März 1999
4. Norrman, Nils, Patent EP 1190256, März 2002
5. Trau, Mathias et.al. WO 99/24458, Mai 1999
6. Donath, E. et.al. WO 99/47252, März 1999
7. Spiro, A.; Lowe, M.; Brown, D. Appl. Env. Microbiology 66, 2000, 4258
8. Gaponik, N. Radtchenko, I.L.; Sukhorukov, G.B., Weller, H., Rogach, A.L. Adv. Mater. 14, 2002, 879
9. E. Donath, G.B. Sukhorukov, F. Caruso, S.A. Davis, H. Möhwald, Angew. Chem. Int. Ed. 1998, 37, 2002.
10. R. Steitz, V. Leiner, R. Siebrecht, R. v. Klitzing, Colloids a. Surf. A, 2000, 163, 63.
11. G. Ibarz, L. Dähne, E. Donath, H. Möhwald "Smart Micro- and Nanocontainers for Storage, Transport and Release" Adv. Mater. 13 (2001) 1324–1327.
12. L. Dähne, E. Donath, S. Loporatti, H. Möhwald, "Synthesis of micro reaction cages with defined chemical properties" J. Amer. Chem. Soc. 123 (2001), 5431–5436.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung für die Identifizierung von Substanzen, wobei die Zusammensetzung mindestens zwei Arten von Kapseln mit einem Durchmesser weniger als 100 µm aufweist, wobei die Kapseln einen Kern und eine Hülle besitzen und die Hülle mindestens drei Schichten aufweist, wobei zumindest eine dieser Schich-

ten mit einem Farbstoff markiert ist.

2. Zusammensetzung aus Anspruch 1, aufweisend zumindest 3 Arten von Kapseln.
3. Zusammensetzung aus Anspruch 1 oder 2, wobei die Kapseln einen mittleren Durchmesser von weniger als 10 μm , bevorzugt weniger als 1 μm besitzen.
4. Zusammensetzung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Hüllen aus Polyelektrolytschichten bestehen.
5. Zusammensetzung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei mindestens ein Kapseltyp durch Kapseln definiert ist, deren Hüllen aus mindestens zwei, mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten Schichten bestehen, wobei die mit unterschiedlichem Farbstoff markierten Schichten voneinander durch zumindest eine nicht mit Farbstoffen markierte Schicht getrennt sind.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

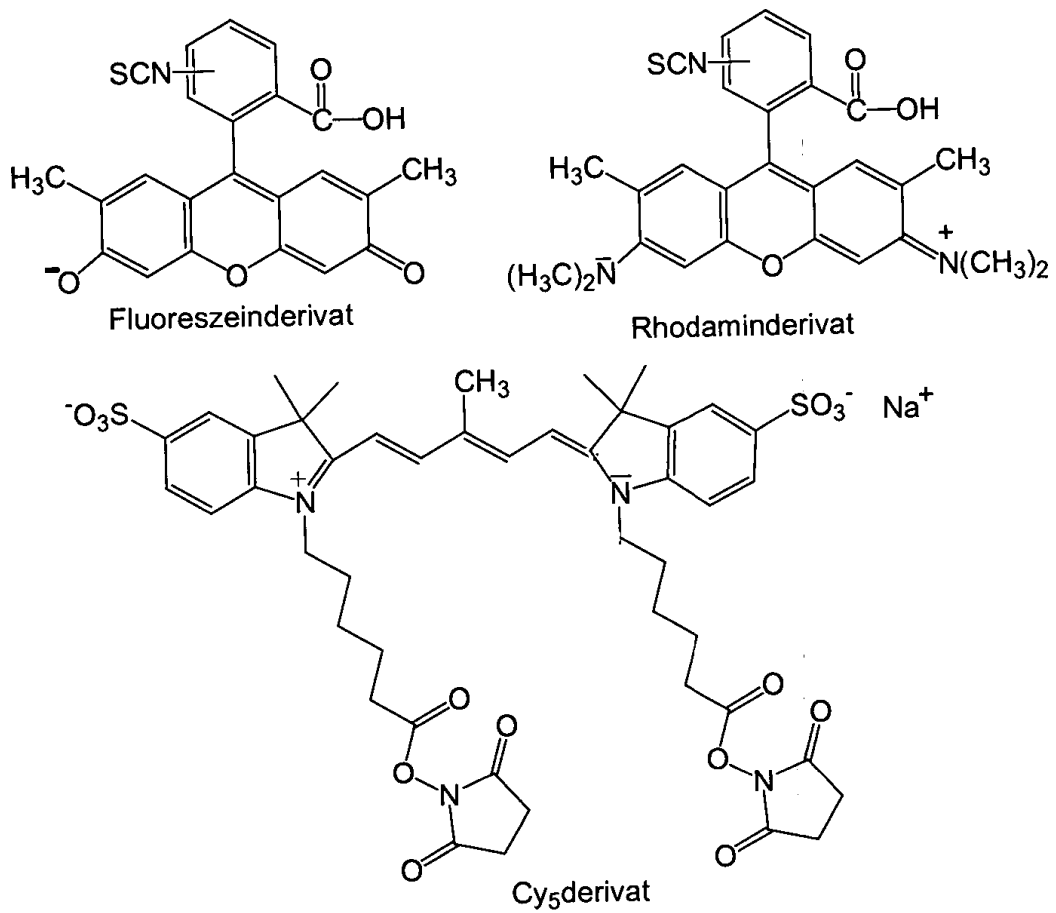
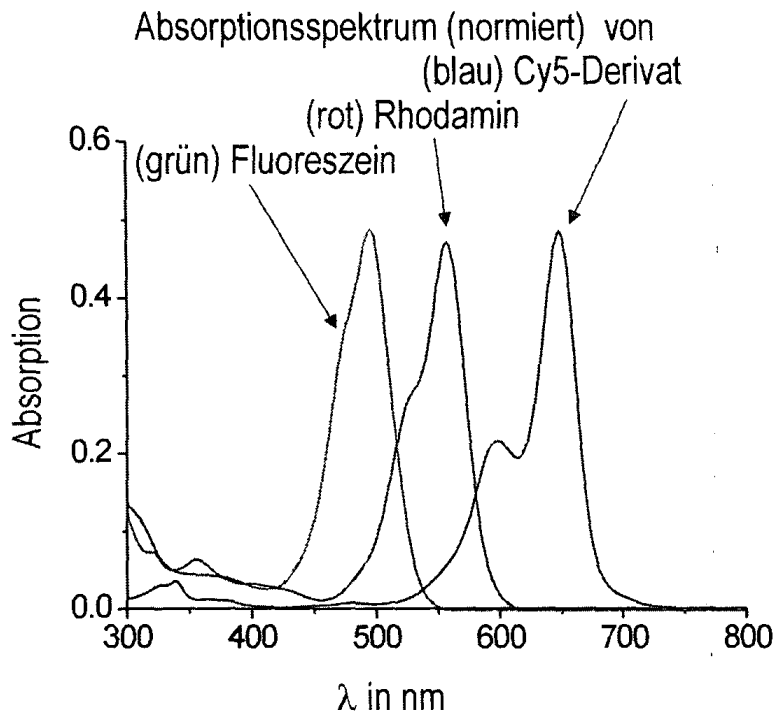
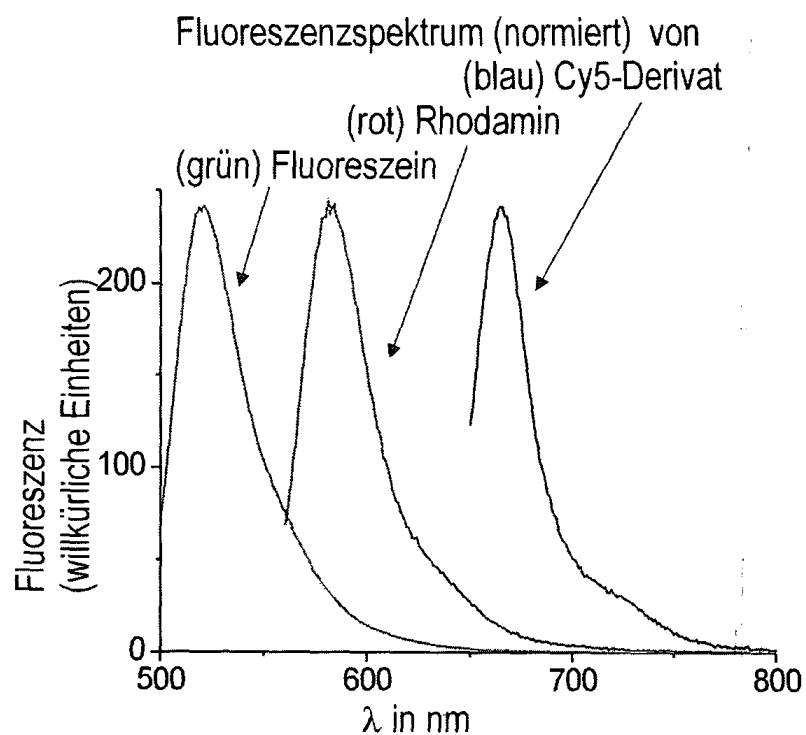


Abb. 1

a)



b)

**Abb. 2:**

- a) Absorptionsspektrum von PAH-Fl, PAH-Rho und PAH-Cy5, normalisierte Intensität
b) Fluoreszenzspektrum von PAH-Fl, PAH-Rho und PAH-Cy5, normalisierte Intensität

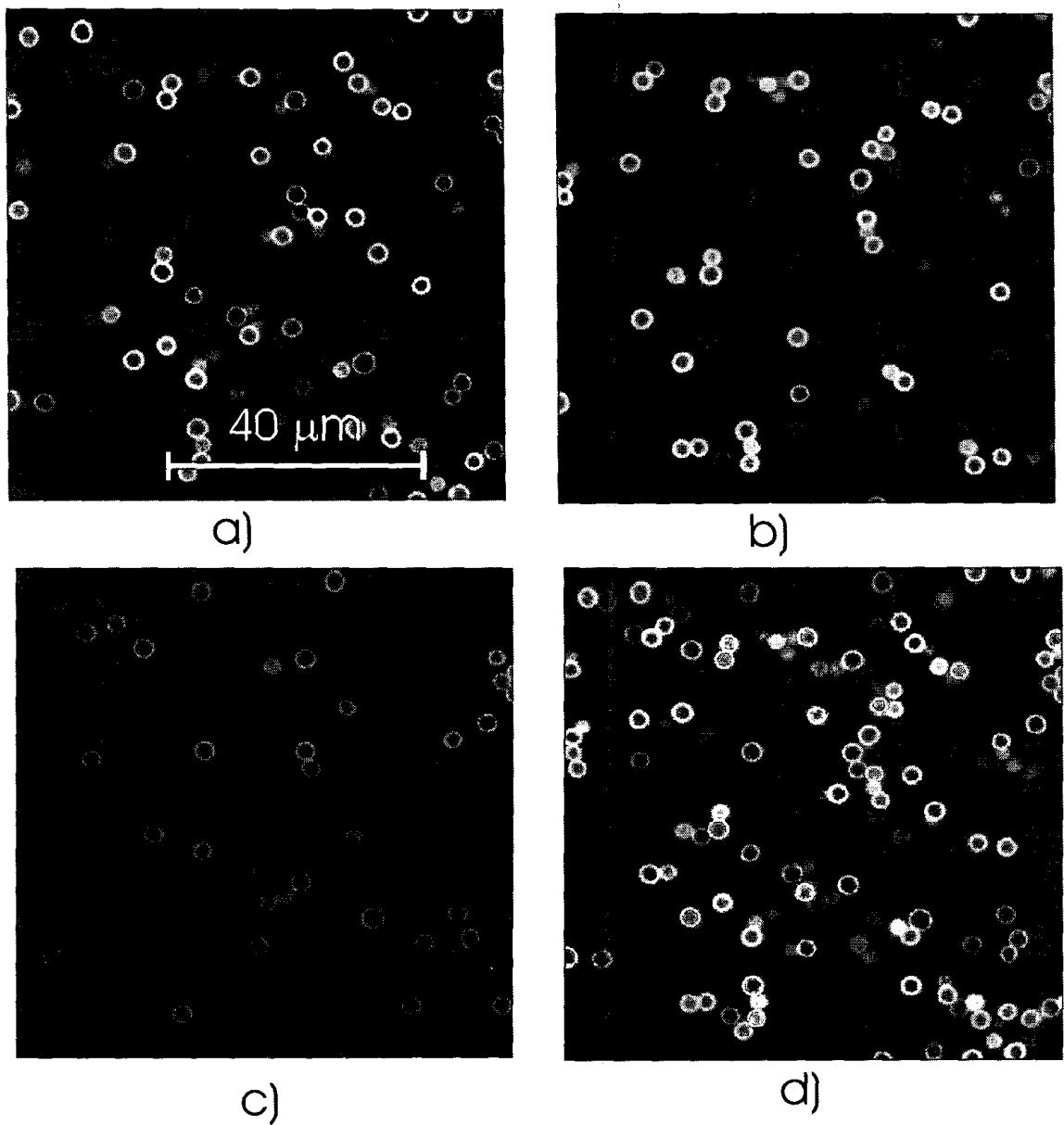


Abb. 3:

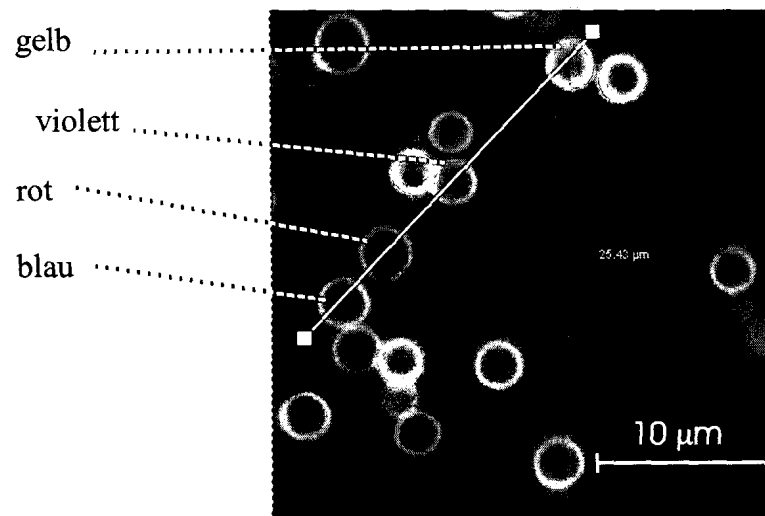
Konfokale Bilder einer Mischung von farbkodierten Kapseln

a) Fluoreszeinkanal

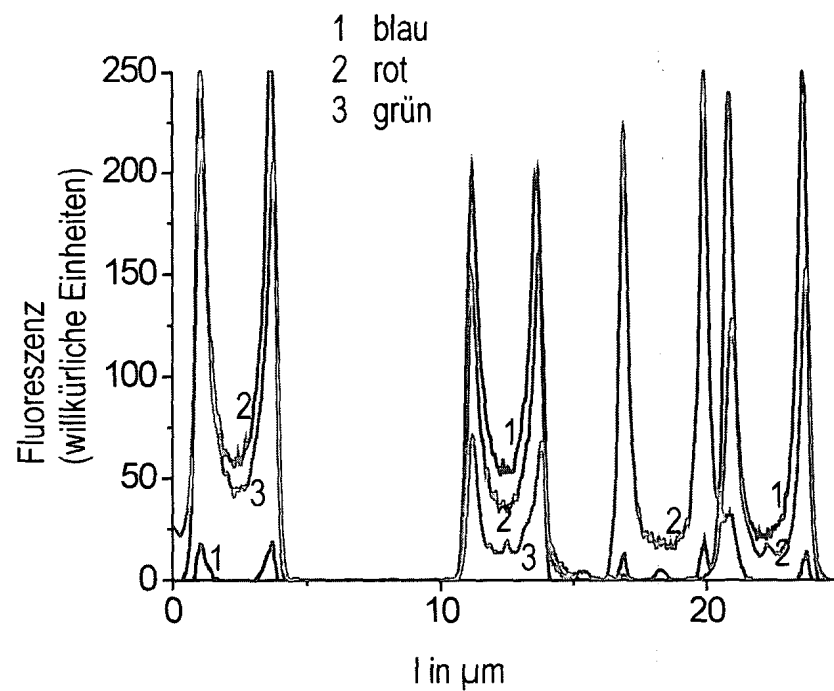
b) Rhodaminkanal

c) Cy5 Kanal

d) Überlagerung der 3 Farbkanäle



a)



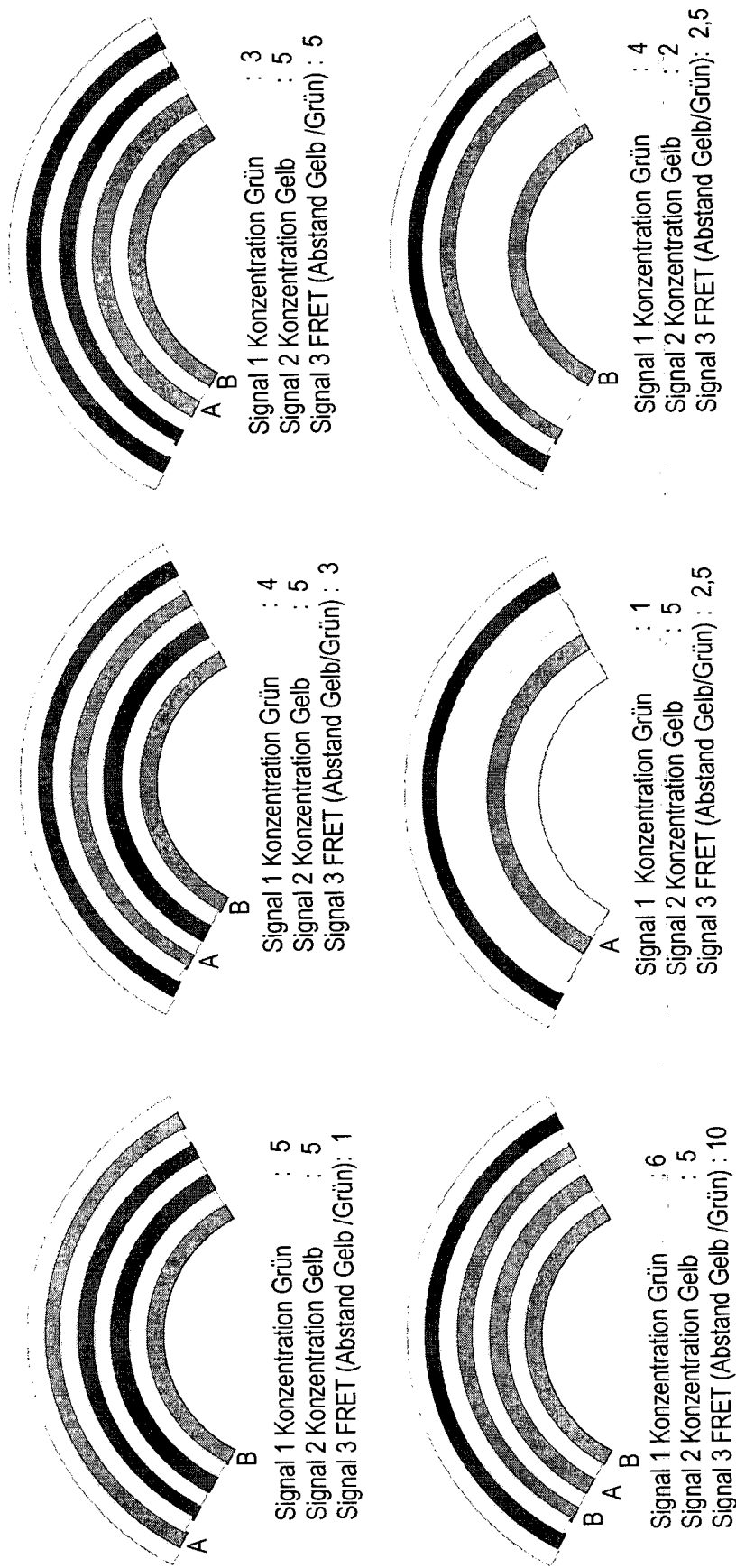
b)

Abb. 4:

Konfokale Bilder einer Mischung von gefärbten Kapseln 2, 7, 1, 5

a) Überlagerungsbild der drei Farbkanäle

b) Profil der Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linie im Bild a)



A Rot

B Grün

Abb. 5

Hergestellte Schichtkombinationen

a-c) unterschiedliche FRET-Signalintensitäten bei gleicher Farbstoffkonzentration

d-f) unterschiedliche FRET-Signalintensitäten bei unterschiedlicher Farbstoffkonzentration

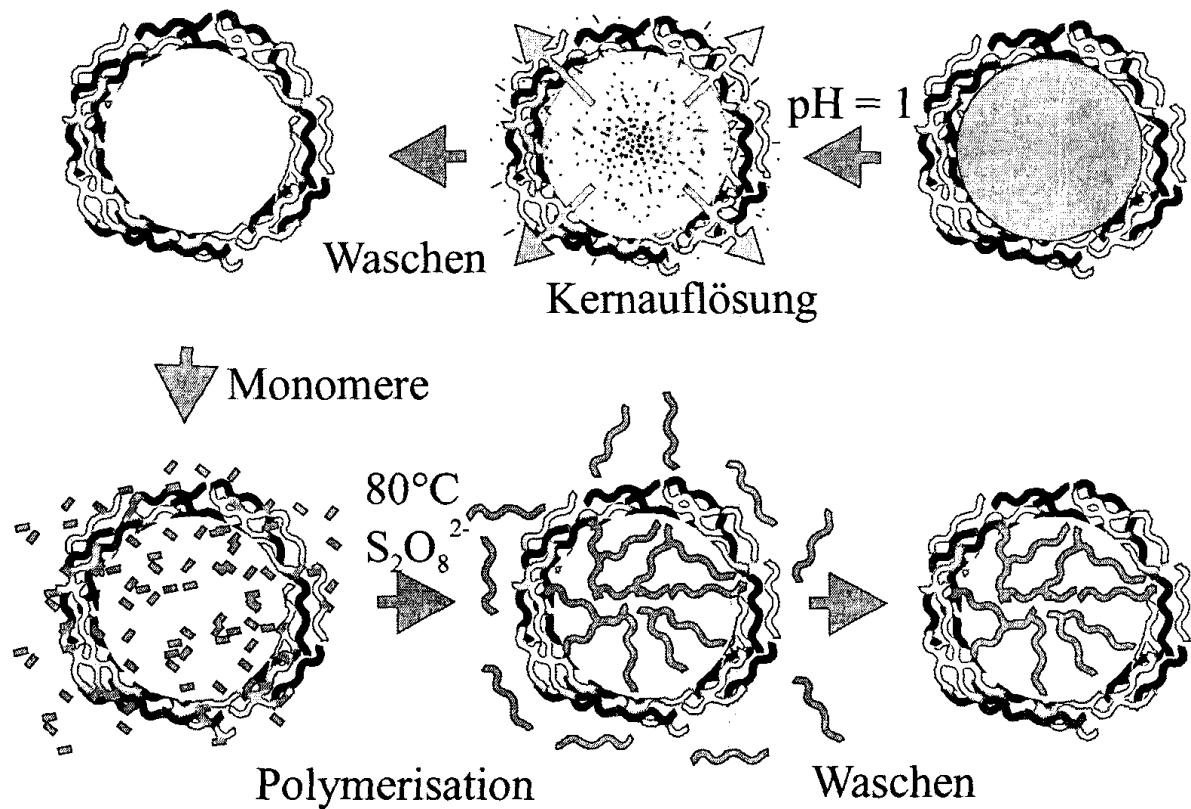


Abb. 6: „Schiff in Flasche“ Synthese der Polymere innerhalb der Kapseln

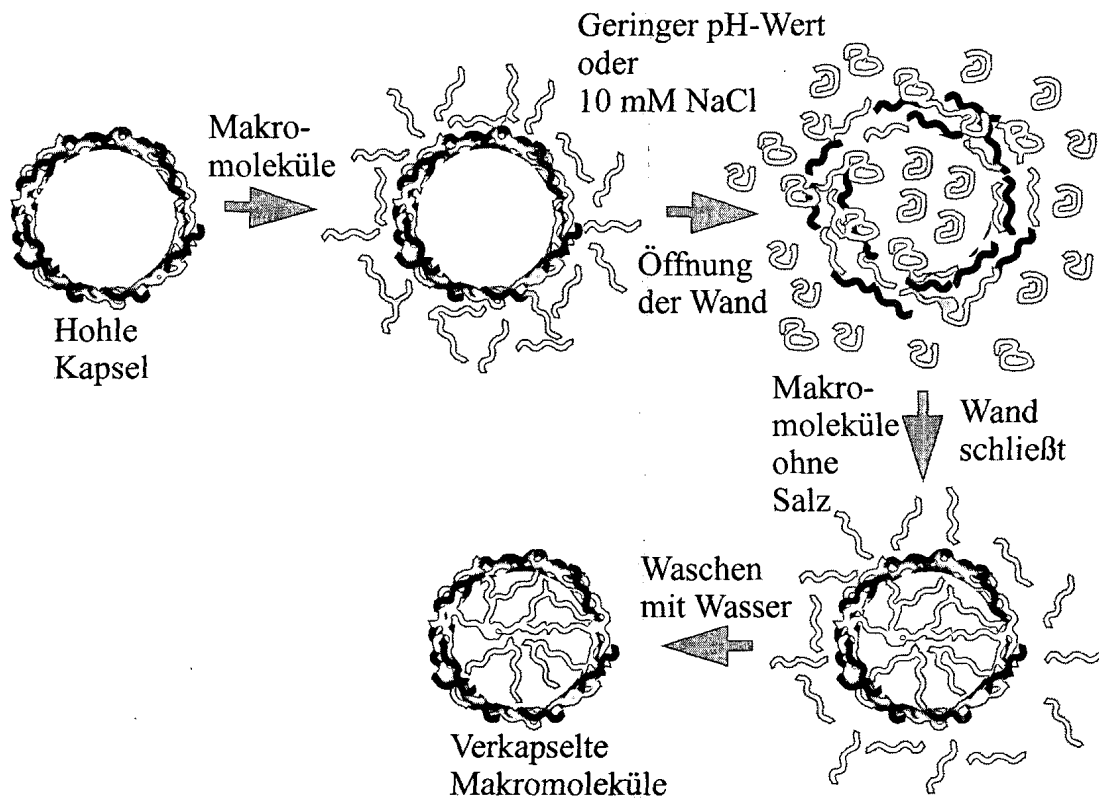


Abb. 7

Prinzip des Beladens von MF Kapseln (8 Schichten) durch Schalten der Permeabilität von speziellen Kapseln für korrespondierende Makromoleküle durch Salz oder pH-Wert