



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 14 654 T2 2004.02.19**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 811 626 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 14 654.5**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 109 029.5**

(96) Europäischer Anmeldetag: **04.06.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.12.1997**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **14.08.2002**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.02.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C07D 487/22**
G01N 33/533

(30) Unionspriorität:
96108951 04.06.1996 EP

(73) Patentinhaber:
Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IE, IT, LI, NL, SE

(72) Erfinder:
Sagner, Dr., Gregor, 82377 Penzberg, DE; De Haas, Richard Robert, 2316 DB Heiden, NL; Van Gijlswijk, Rob, 24016 J Alphen A/D Rijn, NL; Tanke, Prof. Dr., Hans, 2231 2P Rijnsburg, NL

(54) Bezeichnung: **Verwendung von einem Metalloporphyrinkonjugat für den Nachweis biologischer Verbindungen**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines aktivierten Metall-Porphyrin-Derivates und auf neue aktivierte Metall-Porphyrin-Derivate, die durch das Verfahren erhältlich sind. Weiter bezieht sich die vorliegende Erfindung auf Konjugate von Metall-Porphyrinen mit Molekülen, die mindestens eine primäre Aminogruppe besitzen, insbesondere Biomoleküle. Die Konjugate werden in einem Verfahren zum Nachweis einer biologischen Substanz verwendet, insbesondere in einem Immunoassay oder in einem Nukleinsäure-Hybridisierungsassay.

[0002] Porphyrine sind substituierte Tetrapyrrol-Strukturen, worin Pyrrole miteinander verbunden sind, wobei Methylenbrücken zyklische konjugierte Strukturen mit chelatbildenden inneren Hohlräumen bilden. Sie sind in einer Anzahl von biologischen und synthetischen Pigmenten, so wie Hämin und Häminproteinen (Hämoglobin, Myoglobin, Cytochrom), Chlorophyllen usw. zu finden.

[0003] Porphyrine zeigen starke lumineszente Eigenschaften. Metall-Porphyrine so wie Pt- und Pd-Metall-Porphyrine sind bekannt dafür, bei Raumtemperatur in geeigneten Lösungsmitteln Phosphoreszenz zu zeigen. Im Stand der Technik sind mehrere Anwendungen für Porphyrine und Metall-Porphyrine bekannt. EP-A-0 071- 991 und EP-A-0 127 797 offenbaren Verfahren zur Verwendung der Porphyrine als Markierungen in Fluoreszenz-Immunoassays. In EP-A-O 127 797 sind die Porphyrine an einen Antikörper gekoppelt durch in Kontakt bringen eines Porphyrinderivates, das eine Carbonsäuregruppe besitzt, mit einem wasserlöslichen Carbodiimid-Derivat, und dann durch in Kontakt bringen des resultierenden Produkts mit dem Antikörper. In EP-A-0071 991 ist das Metall-Porphyrin-Bakteriochlorophyll b über Carbodiimid, Isobutylchlorformiat/Dioxan, Glutaraldehyd oder Bernsteinsäureanhydrid/Pyridin/Carbodiimid an verschiedene Biomoleküle gekoppelt.

[0004] In einer Veröffentlichung von Mantrova et al. (Anal. Biochem. 219 (194), 109-114) ist die Verwendung von Metall-Porphyrin-Antikörper-Konjugaten in einem Phosphoreszenz-Immunoassay offenbart. Die Verknüpfung des Metall-Porphyrins an den Antikörper wird wie in EP-A-O 127 797 beschrieben durchgeführt.

[0005] US-A-4,375,972 offenbart die Herstellung eines Eisen-Porphyrin-Antikörper-Konjugats durch Erreichen eines Ziege-Anti-Human-Serum mit Hämoglobin.

[0006] WO 95/29921 offenbart Pyrazolinon-Derivate und ein Verfahren zur Markierung von Amin-funktionalisierten Molekülen, insbesondere von Biomolekülen, mit Reportergruppen so wie Biotin und Fluorescein. Metall-Porphyrin-Derivate sind in WO 95/29921 nicht erwähnt.

[0007] Ein Nachteil der aus dem Stand der Technik bekannten Metall-Porphyrin-Konjugate besteht aber in der Tatsache, dass sie nicht geeignet sind für in situ-Anwendungen, d. h. für den Nachweis von zellulären Makromolekülen in Gewebeextrakten und morphologisch intakten Zellen. Ebenso erwies sich eine Reihe anderer Verfahren zur Verknüpfung von Markierungsgruppen an Biomoleküle, bekannt durch den genannten Stand der Technik, als nicht geeignet zur Herstellung von Metall-Porphyrin-Konjugaten, die für in situ-Anwendungen verwendet werden können.

[0008] Somit war das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Problem, ein Verfahren zur Herstellung von Metall-Porphyrin-Konjugaten bereitzustellen, die für in situ-Anwendungen geeignet sind.

[0009] Dieses Problem wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines aktivierten Metall-Porphyrin-Derivats mit der allgemeinen Formel (I):



worin M Palladium oder Platin ist,

P ein Porphyrin-Anteil ist,

RCOOX eine aktivierte Carbonsäureester-Gruppe ist, die kovalent an den Porphyrin-Anteil gebunden ist,

R jeweils unabhängig bei jedem Vorkommen eine chemische Bindung oder eine Linkergruppe ist und

n von 1 bis 4 ist,

worin ein Metall-Porphyrin mit der allgemeinen Formel (II)



worin M, P und R wie oben definiert sind und m die Anzahl der Carbonsäuregruppen ist, die kovalent an den Porphyrin-Anteil gebunden sind,

mit einem Carbodiimid, 1-Hydroxybenzothiazol und einem aktiven Ester-Kopplungsmittel ausgewählt aus N-Hydroxysuccinimid, Thiophenylestern, Arylestern und Vinylestern in einem organischen Lösungsmittel umgesetzt wird und das resultierende reaktive Metall-Porphyrin-Derivat (I) erhalten wird.

[0010] Überraschenderweise wurde gefunden, dass ein Metall-Porphyrin, das mindestens eine und normalerweise ein bis vier Carbonsäuregruppen besitzt, aktiviert werden kann durch Umsetzen mit einem Carbodiimid, 1-Hydroxybenzothiazol und einem aktiven Ester-Kopplungsmittel, wobei ein aktives Metall-Porphyrin-Esterderivat erhalten wird, das geeignet ist, an Moleküle zu binden, die mindestens eine primäre Aminogruppe besitzen.

[0011] Insbesondere zeigen die Konjugate, die durch Reagieren des aktiven Metall-Porphyrin-Esterderivats mit dem Molekül, das mindestens eine primäre Aminogruppe besitzt, erhalten werden, überraschende Vorteile, wenn sie in einem Nachweisverfahren verwendet werden, z. B. in einem Verfahren zum Nachweis einer biologischen Substanz. Die Konjugate zeigen überraschend hohe Phosphoreszenz-Quantenausbeuten, insbesondere bei in situ-Messungen, z. B. bei immunhistochemischen Messungen, immunzytochemischen Messungen oder Hybridisierungsmessungen. Im Gegensatz dazu ergaben Konjugate aus Metall-Porphyrinen und biologischen Substanzen, die durch andere Verfahren, z. B. in einer wässrigen Lösung, hergestellt wurden, keine positiven Ergebnisse bei in situ-Messungen.

[0012] Im Verfahren der Erfindung werden die Carbonsäuregruppen von verschiedenen Porphyrinstrukturen mit einem Gemisch aus einem Carbodiimid, bevorzugt einem Dicyclocarbodiimid, 1-Hydroxybenzothiazol und einem aktiven Ester-Kopplungsmittel umgesetzt. Normalerweise lässt man dieses Gemisch über Nacht und bei Raumtemperatur reagieren, wobei ein Präzipitat aus weißen Dicycloharnstoff-Kristallen als ein Nebenerzeugnis gebildet wird. Die aktiven Ester der vorliegenden Erfindung werden in einem organischen Lösungsmittel hergestellt, bevorzugt in einem trockenen organischen Lösungsmittel so wie zweifach destilliertem DMF, um eine Hydrolyse der aktiven Ester aufgrund der Reaktion mit Wasser zu vermeiden. Die aktiven Ester können bei -20°C gelagert werden und sie behalten ihre Reaktivität für mindestens sieben Monate.

[0013] Da die Porphyrin-Startprodukte (II) mehrere, normalerweise bis zu 4 Carbonsäuregruppen enthalten können, kann die Anzahl der aktivierten Carbonsäuregruppen modifiziert werden. Dies kann durch Variieren des Molverhältnisses des Porphyrins (II) und der anderen Reagenzien erreicht werden. Bevorzugt ist das Molverhältnis der zu aktivierenden Carbonsäuregruppen (n) zu Carbodiimid zu 1-Hydroxybenzothiazol zum aktiven Ester-Kopplungsmittel etwa 1 : 1 : 1 : 1. Mehr bevorzugt ist das Molverhältnis so ausgewählt, dass ein aktiviertes Metall-Porphyrin-Derivat erhalten wird, das von 2 bis 3 aktivierte Carbonsäureester-Gruppen enthält. Es sollte angemerkt werden, dass die Anzahl der aktivierten Carbonsäuregruppen n wie gemäß der vorliegenden Erfindung definiert, eine statistische durchschnittliche Anzahl ist und somit nicht notwendigerweise eine ganze Zahl ist.

[0014] In Formel (I) bezeichnet das Symbol R eine chemische Bindung oder eine Linkergruppe, durch die die aktivierte Carbonsäureester-Gruppe an die Porphyrinstruktur gebunden ist. Die Linkergruppe kann beispielsweise eine aliphatische, alzyklische und/oder aromatische Kohlenwasserstoffgruppe sein, die Heteroatome enthalten kann. Bevorzugt ist die Linkergruppe eine $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ Alkylengruppe, die Heteroatome enthalten kann, eine Arylengruppe und eine Aralkylengruppe oder eine Alkarylengruppe. Mehr bevorzugt ist R eine chemische Bindung, eine $\text{C}_1\text{-C}_5$ Alkylengruppe oder eine Phenylengruppe.

[0015] Für das Verfahren der vorliegenden Erfindung werden Metall-Porphyrin-Startmaterialien (II) verwendet, die mindestens eine Carbonsäuregruppe enthalten, bevorzugt mindestens zwei Carbonsäuregruppen und am meisten bevorzugt vier Carbonsäuregruppen. Typische Beispiele für geeignete Porphyrine sind Pt- oder Pd-Coproporphyrine und Uroporphyrine, die vier Propionsäuregruppen beziehungsweise vier Essigsäuregruppen enthalten. Weitere Beispiele für geeignete Porphyrine sind Pd- oder Pt-Mesoporphyrine, Deuteroporphyrine, Protoporphyrine, Hematoporphyrine und Cyttoporphyrine, die zwei Propionsäuregruppen besitzen. Noch weitere Beispiele für geeignete Porphyrine sind dem Fachmann bekannt.

[0016] Im Hinblick auf die Synthese von Metall-Porphyrinen und insbesondere von Pt und Pd-Porphyrinen wird verwiesen auf „The porphyrins, structure and synthesis, Part B (1978), Chapter 10“, von J. W. Buchler, „Synthesis and properties of metallo-porphyrins“, Seiten 390–483, insbesondere Seiten 471–474, Editor: D. Dolphin, Academic Press Inc., London, welches hierin als Literaturangabe enthalten ist.

[0017] Besonders bevorzugte Beispiele für geeignete Metall-Porphyrine sind Pd- oder Pt- 3,8,13,18-Tetramethyl-21 H,23H-porphin-2,7,12,17-tetrapropionsäure (**Fig. 1**) und Pd- oder Pt-meso-tetra(4-Carboxyphenyl)porphin (**Fig. 2**).

[0018] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung wird in einem organischen und bevorzugt wasserfreien Lösungsmittel durchgeführt. Das Carbodiimid ist ein Carbodiimid, das in dem organischen Lösungsmittel löslich ist. Bevorzugt sind Dicyclocarbodiimide, so wie Dicyclohexylcarbodiimid.

[0019] Das aktive Ester-Kopplungsmittel ist bevorzugt eine Substanz, die in organischen Lösungsmitteln so wie DMF löslich ist. Gemäß der Erfindung sind die aktiven Ester-Kopplungsmittel N-Hydroxysuccinimid, Thiophenylester, Arylester und Vinylester.

[0020] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein aktiviertes Metall-Porphyrin-Derivat mit der allgemeinen Formel (I):

worin M, P, R und n wie oben definiert sind und RCOOX das Reaktionsprodukt von einer Carbonsäuregruppe und einem aktiven Ester-Kopplungsmittel, ausgewählt aus N-Hydroxysuccinimid, Thiophenylestern, Arylestern und Vinylestern ist.

[0021] Bevorzugt ist n 2 oder 3.

[0022] Es wurde gezeigt, dass die aktivierten Metall-Porphyrin-Derivate gemäß der vorliegenden Erfindung ausreichende Reagenzien sind, um primäre Aminogruppen zu modifizieren. Dieses Modifikationsverfahren schließt ein Verfahren zur Herstellung eines Metall-Porphyrin-Konjugats ein, worin das aktivierte Metall-Porphyrin gemäß der vorliegenden Erfindung an ein Molekül gekoppelt wird, das mindestens eine primäre Aminogruppe besitzt, wobei mindestens eine Bindung zwischen einer aktivierten Carbonsäureester-Gruppe und einer primären Aminogruppe gebildet wird. Verschiedene Moleküle, so wie Biomoleküle oder Polymere, können an das aktivierte Metall-Porphyrin gekoppelt werden. Zum Beispiel können Biomoleküle aus der Gruppe umfassend Biogene Amine, Hormone, Vitamine, Metaboliten, Nukleoside, Nukleotide, Oligonukleotide, Nukleinsäuren, Peptide, Polypeptide, Glycoproteine, Saccharide, Lipide, zelluläre und virale Bestandteile, Zellen und Viren ausgewählt werden. Typische Beispiele für Biomoleküle sind Tyramin, Allylamin-modifizierte Nukleotide, Immunglobuline, Immunglobulinfragmente und Avidin. Ein Beispiel für ein Polymer ist ein aminomodifizierter Polyvinylalkohol (PVA-NH₂).

[0023] Es wurde gefunden, dass die aktiven Ester von Porphyrinen, worin die Carbonsäuregruppe an eine aliphatische Kette angeheftet ist, reaktiver sind als aktive Ester von Porphyrinen, worin die Carbonsäureester-Gruppe an eine aromatische Gruppe angeheftet ist, wenn das aktivierte Metall-Porphyrin an Moleküle gekoppelt ist, die mindestens eine primäre Aminogruppe besitzen. Weiter wurde herausgefunden, dass aktivierte Porphyrine enthaltend mehrfache aktive Estergruppen, bevorzugt von 2 bis 3, reaktiver sind als die Monoester-Verbindungen eines gegebenen Porphyrins.

[0024] Zur Markierung von Biomolekülen, so wie Proteine, ist die Verwendung von Metall-Porphyrin-Derivaten mit 2 bis 3 Estergruppen besonders bevorzugt, weil dann das höchste Verhältnis von Porphyrin zu Protein (F/P-Verhältnis), und eine geringe Interferenz mit Avidin/Antikörpern gefunden wurde, verglichen mit Monoester-Derivaten. Weiter wurde gefunden, dass das Kopplungsverfahren mit einer nicht zu hohen Proteinkonzentration durchgeführt werden sollte, z. B. einer Proteinkonzentration bis zu 5 mg/ml, z. B. eine Avidinkonzentration von 1 mg/ml oder einer igG-Konzentration von 2 mg/ml. Das Protein wird bevorzugt mit einem 3- bis 6fachen Überschuss an di- oder triaktivem Ester eines Porphyrins gekoppelt. Die Reaktionstemperaturen hängen von der Reaktivität des aktivierten Metall-Porphyrin-Derivats ab und sind für Porphyrin-Derivate, worin die aktiven Estergruppen an eine aliphatische Kette angeheftet sind, geeignet im Bereich von 0° bis 4°C, und für Porphyrin-Derivate, worin die aktiven Estergruppen an eine aromatische Kette angeheftet sind, im Bereich von 30° bis 40°C.

[0025] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Metall-Porphyrin-Konjugat, worin ein Metall-Porphyrin-Derivat (I) über mindestens eine seiner aktivierten Carbonsäureester-Gruppen an ein Molekül gekoppelt ist, das mindestens eine primäre Aminogruppe besitzt, gebunden ist. Das Konjugat gemäß der vorliegenden Erfindung wird in einem Verfahren zum Nachweis einer biologischen Substanz verwendet. Dieses Verfahren umfasst im Allgemeinen einen Nachweis des Konjugats durch Phosphoreszenz. Bevorzugt wird die Phosphoreszenz in einer zeitaufgelösten Messung nachgewiesen aufgrund der Abklingzeit der vorliegenden Verbindungen von 10 bis 200 µs, bevorzugt von 50 bis 150 µs.

[0026] Wenn die Phosphoreszenz des Metall-Porphyrin-Konjugats durch eine zeitaufgelöste Messung nachgewiesen wird, kann ein Vorteil aus der spezifischen Hintergrund-Fluoreszenz gezogen werden. In diesem Nachweisschema kann eine Stoßerregung in Kombination mit einem durchlassenden Nachweis der Emission verwendet werden. Wenn eine zeitaufgelöste Mikroskopie angewendet wird, wird die Lebensdauer des Metall-Porphyrin-Konjugats im Allgemeinen in einer solchen Weise ausgewählt, dass die spezifische Phosphoreszenz unter Ausschluss des unerwünschten Hintergrundsignals nachgewiesen werden kann.

[0027] Wenn die Metall-Porphyrin-Konjugate der vorliegenden Erfindung verwendet werden, war eine Impulsdauer des Erregerlichts im Bereich von 10–100 µs, z. B. etwa 50 µs geeignet. Die Wiederholungsperiode der Sequenz kann so kurz sein wie 100 µs, z. B. 100–500 µs, bevorzugt etwa 250 µs. Das Nachweisfenster kann eine Länge von z. B. 1 – 100 µs, z. B. etwa 10 µs besitzen, in Kombination mit einer Verzögerungszeit, die bevorzugt im Bereich von 5 bis 10 µs ist, bei der Verwendung mit biologischen autofluoreszierenden Materialien, oder die weniger als 1 µs beträgt, bei der Verwendung in Hybridisierungsassays auf Membranen.

[0028] Insbesondere können die Konjugate der vorliegenden Erfindung in Immunoassays, Nukleinsäure-Hybridisierungsassays und anderen Arten von Assays, so wie spezifische Ablagerungsassays verwendet werden.

[0029] Die Konjugate der vorliegenden Erfindung sind besonders geeignet für in situ und/oder in vitro-Messungen in einer autofluoreszierenden Umgebung, so wie Gewebeschnitte, ganze Zellen und Metaphase-Prä-

parationen. Ein weiteres Beispiel einer autofluoreszierenden Umgebung sind autofluoreszierende Membranen, so wie Nitrozellulose oder Polyvinylidenfluorid-Membranen.

[0030] Die Konjugate gemäß der vorliegenden Erfindung können in mehreren verschiedenen Ansätzen verwendet werden, um Antigene oder Nukleinsäuren bei in situ-Anwendungen nachzuweisen. Eine ist ein enzymatisches Verfahren, basierend auf der Ablagerung von mit Biotin oder mit Metall-Porphyrin markierten Tyramiden durch Meerrettich-Peroxidase. Biotinablagerungen können durch Metall-Porphyrin-markiertes Avidin nachgewiesen werden. Weiter können konventionelle Immunfluoreszenzverfahren angewendet werden, unter Verwendung von Metall-Porphyrin-markierten Antikörpern oder Avidinen.

[0031] Mit dem auf das Tyramin basierenden Verfahren kann eine gute Empfindlichkeit erreicht werden, sowohl mit einer kontinuierlichen als auch mit einer zeitaufgelösten Anregung/Detektion unter Verwendung verschiedener Mikroskope. Es wurde gefunden, dass es möglich ist, Targets ohne die Verwendung integrierender Kameras sichtbar zu machen, die so klein wie Housekeeping-Gen mRNAs in kultivierten Zellen und Cosmidproben auf Metaphase-Präparationen sind. Spezifische Signale sind mit Tyramiden, die direkt mit Metall-Porphyrin markiert sind, intensiver gefärbt, als durch das Biotin-Verfahren erhalten. Aber das direkte Verfahren zeigt auch einen gesteigerten Hintergrund, insbesondere auf Gewebeschnitten. Dieser Hintergrund kann aber durch Zugabe von Rinderserumalbumin gesenkt werden.

[0032] Konventionelle Immunfluoreszenz-Verfahren können auch angewendet werden. Ohne die Verwendung integrierender Kameras können nur relativ reichlich vorkommende Targets, so wie 28SrRNA in kultivierten Zellen, und (mittelmäßig) häufig auftretende Proben auf Metaphase-Präparationen sichtbar gemacht werden. Um dies zu erreichen, wird die Anwendung von mehrfachen Runden von Antikörpern/Avidin bevorzugt. Für Anwendungen der in situ-Hybridisierung werden die besten Ergebnisse erhalten mit Hapten-markierten Proben (z. B. Digoxigenin-markierten Proben), die durch biotinylierte Anti-Hapten-Antikörper und Metall-Porphyrin-markiertes Avidin nachgewiesen werden können. Normalerweise sind 3 bis 4 Inkubationen mit Antikörpern bevorzugt, um die oben erwähnten Targets sichtbar zu machen. Mit der Verwendung integrierender Kameras steigt die Sensitivität dieser Mehrschicht-Ansätze insofern, dass zum Beispiel auch Cosmidproben nachgewiesen werden können.

[0033] Weiterhin sind andere immunochemische Verfahren, so wie die Anwendung von Metall-Porphyrin-markierten Antikörpern und Metall-Porphyrin-markierten DNA-Proben, geeignet für die Anwendung von immunhistochemischen, immunzytochemischen und in situ-Hybridisierungen.

[0034] Eine andere Anwendung für die Konjugate der vorliegenden Erfindung ist das Sauerstoff-Imaging. In der Veröffentlichung Wilson & Cerniglia (Cancer Res. 52(1992), 3988–3993) wird die Lokalisierung von Tumoren und die Evaluation deren Oxygenierungsstatus durch Phosphoreszenz-Imaging beschrieben. Eine Veröffentlichung von Vanderkooij et al. (Biochemistry 29, (1990) 5332–5338) offenbart eine Untersuchung von Sauerstoffgradienten in Mitochondrien mit verzögerter Lumineszenz aus Triplet-Proben in angeregtem Zustand. Diese Messungen basieren auf einem Sauerstoff-abhängigen Quenchen der Phosphoreszenz, das es ermöglicht, die Verteilung des Sauerstoffdrucks in Gewebe-Umgebungen, so wie Tumoren oder Mitochondrien, abzubilden. Wenn die Konjugate gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können Resultate erzielt werden, die denen mit Konjugaten gemäß dem Stand der Technik überlegen sind.

[0035] Weiter soll die vorliegende Erfindung ausführlicher durch die folgenden Zeichnungen und Beispiele erklärt werden: Die Zeichnungen bestehen aus 3 Figuren.

[0036] **Fig. 1** zeigt die Formel eines bevorzugten Metall-Porphyrins, das als eine Startverbindung für die vorliegende Erfindung verwendet wird (PtCP);

[0037] **Fig. 2** zeigt die Formel eines weiteren bevorzugten Metall-Porphyrins, das als eine Startverbindung für die vorliegende Erfindung verwendet wird (PtP); und

[0038] **Fig. 3** zeigt einen Reaktionsweg zur Durchführung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung.

BEISPIELE

1. Präparation von PtP- und PtCP-NHS-Estern

[0039] N-Hydroxy-Succinimidester- (NHS) Derivate von Pt-meso-tetra(4-Carboxyphenyl)porphin (PtP **Fig. 2**) und 3,8,13,18-Tetramethyl-21H,23H-porphin-2,7,12,18-tetrapropionsäure (PtCP **Fig. 1**) wurden durch Umsetzen von äquimolaren Mengen an COOH, N-Hydroxysuccinimid (Aldrich), DCC (Dicyclocarbodiimid, Pierce) und HBTO (1-Hydroxybenzothiazol, Aldrich) in trockenem DMF synthetisiert. Ein Harnstoff-Präzipitat wurde während einer Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur (RT) gebildet. Die NHS-Ester-Derivate wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Der Reaktionsweg ist in **Fig. 3** veranschaulicht.

[0040] Die jeweiligen Mengen der Reagenzien, um die folgenden NHS-Derivate herzustellen, waren:

	Pt-Porph.	HBTO	DCC	NHS	Vol.	PtP-NHS
	mg	mg	mg	mg	ml	[mM]
PtP-Mono-NHS-Ester PtP-1-NHS	19,3	2,7	4,1	2,3	2,8	7,0
PtP-Di/Tri-NHS-Ester PtP-2,5-NHS	26,6	11,2	7,3	6,2	12,0	2,2
PtcP-Mono-NHS-Ester PtP-1-NHS	20,6	5,0	3,3	2,8	1,13	18,7
PtcP-Di-NHS-Ester PtcP-2-NHS	17,9	8,7	5,7	4,9	1,24	17,0
PtcP-Tri-NHS-Ester PtcP-3-NHS	10,8	7,9	5,2	4,4	0,78	17,7
PtcP-Tetra-NHS-Ester PtcP-4-NHS	10,8	10,5	6,9	5,9	0,79	<17,5

2. Präparation von PtP- und PtcP-markierten Antkörper-Konjugaten

2.1 Präparation von Ziege-Anti-DIG-IgG-PtP-Konjugaten

[0041] Die IgG-Gesamtfraction von Ziege-Anti-DIG-IgG-Antiserum wurde zuerst durch Ammoniumsulfat-Präzipitation gereinigt, gefolgt von einer Reinigung mit einer Superdex 200-Säule (Pharmacia) unter Verwendung von 1 × NHS-Puffer als einem Elutionsmittel. IgG wurde entweder mit PtP-NHS oder mit Fluoreszein-NHS markiert. Für die PtP-markierten IgG wurde bei einer Konzentration von 2 . mg/ml (13,33 µM) in 1 × NHS-Puffer mit entweder 33, 83, 132 oder 220 µM PtP2,5-NHS oder mit 47, 83, 140 oder 210 µM PtP-1-NHS markiert. Die Reaktion wurde für 16 Stunden auf Eis fortgesetzt. Eine Reinigung wurde durch Gelfiltration auf Sephadex G50f mit PBSE als ein Elutionsmittel durchgeführt.

NHS-Ester	PtP:IgG	F/P ¹	Aktivität ² (%)
PtP-2,5-NHS	2,5	1,9	84
	6,2	4,9	42
	9,9	6,8	25
	16,3	7,6	15
PtP-1-NHS	3,0	2,0	42
	6,0	4,4	23
	9,0	5,0	21
	13,5	6,8	12

¹ $F/P = \text{Pt-Porphyrin:IgG-Verhältnis} = 0,9 \frac{A^{397}}{(A^{280} - 0,35 A^{397})}$

² Die Aktivität des Proteins in OD495 pro μM markiertem IgG x 100%
 OD495 pro nM unmarkiertem IgG
 aus Anti-DIG-ELISA

2.2 Präparation von Ziege-Anti-Maus-Antikörper-PtcP-Konjugaten

A 1 mg oder 434 μl Ziege-IgG-Anti-Maus-IgG (Pierce, Anti-Maus-IgG H + L, Affinitäts-isolierter Antikörper, 2,3 mg/ml in 10 mM Phosphat pH 7,6, 0,25 M NaCl) wurde mit 1,4 oder 2,5 μl PtcP-3-NHS (17,7 mM in DMF) behandelt. Die Reaktion wurde für 2 Stunden auf Eis fortgesetzt und durch Gelfiltration (Seph. G50f, PBSE) gereinigt. Typische Ausbeuten an IgG betragen > 95%.

B 1 mg oder 770 μl Ziege-Anti-Maus-IgG (Pierce, F(ab')₂, Fragment eines Affinitäts-isolierten IgG, 1,3 mg/ml in 10 mM Phosphat pH 7,6, 0,25 M NaCl) wurde mit 2,3 μl PtcP-3-NHS-Ester behandeln. Die Reaktion wurde für 2 Stunden auf Eis fortgesetzt und durch Gelfiltration (Seph. G50f, PBSE) gereinigt. Typische Ausbeuten an F(ab')₂ betragen 93,2%.

C Die IgG-Gesamtfraction eines Ziege-Anti-Maus- (GaM) Antiserums wurde gegen PBS (pH 7,7) dialysiert und bei einer Proteinkonzentration von 1,8 mg/ml (12 μM) markiert. Zu 1 mg (\pm 0,5 ml) IgG wurden entweder 1 oder 2,5 μl PtcP-3-NHS zugegeben. Die Reaktion wurde für 1,5 Stunden auf Eis fortgesetzt und durch Gelfiltration (Seph. G50f, PBSE) gereinigt. Typische Ausbeuten an IgG betragen > 85%.

Verfahren ¹	PtcP:IgG	F/P ²	Aktivität ³ (%)
A	3,8	2,9	> 95
A	7,1	6,0	> 95
B	3,7	2,5	> 95
C	7,4	7,0	> 95
C	3,0	2,6	> 95

¹ Verfahren A,B oder C wie oben beschrieben.

² $F/P (\text{IgG}) = \text{Pt-Coproporphin:IgG-Verhältnis} = 3,8 A^{380} / (A^{280} - 0,3 A^{380})$

$F/P (\text{Fab}'_2) = 2,5 A^{380} / (A^{280} - 0,3 A^{380})$

³ Die Aktivität des Proteins in % ist $\text{OD495 pro } \mu\text{M markiertem IgG} / \text{OD495 pro } \mu\text{M unmarkiertem Protein} \times 100\%$, wie aus dem GaM-ELISA erhalten.

[0042] Alle PtP- oder PtcP-markierten Antikörper wurden in ICH- und ISH-Assays getestet (Beispiel 8). Entweder wurde ein monoklonaler Antikörper durch, GaM-Konjugate nachgewiesen oder DIG-markierte Proben wurden durch Ziege-Anti-DIG-PtP-Konjugate nachgewiesen. Während einer kontinuierlichen Fluoreszenz unter Verwendung des DM-Mikroskops (grüne oder violette Anregung) wurde keine spezifische Fluoreszenz beobachtet. Unter Verwendung von Ratte-Anti-Ziege-FITC-Konjugaten als eine dritte/zweite Schicht wurde gezeigt, dass diese Antikörper spezifisch gebunden hatten, aber nicht nachgewiesen wurden. Auch die fluoresceinierten Antikörper, markiert zusammen mit den PtP-Konjugaten, zeigten sowohl eine gute Markierung als auch einen spezifischen (und sensitiven) Nachweis von Maus-Anti-IgG oder DIG-Proben.

3. Avidin-D-Konjugate

[0043] Avidin-D, erhalten von Vector, wurde als eine Quelle für Avidin verwendet. Es besitzt einen isoelektrischen Punkt von $\pm 7,5$ und enthält keine Kohlenhydrate.

[0044] F/P-Verhältnisse wurden entweder durch UV/VIS-Spektroskopie oder unter Verwendung von BCA-Reagenz (Pierce) gemessen, um Avidin-Konzentrationen kombiniert mit Messungen in einem Spektrometer bei 397 nm (PtP) oder 380 nm (PtcP) zu messen. Formeln, um F/P-Verhältnisse zu berechnen:

Avidin-D-PtP: $1,1 A^{397} / (A^{280} - 0,4 A^{397})$
 Avidin-D-PtcP: $1,7 A^{380} / (A^{280} - 0,3 A^{380})$

3 1 Präparation von Avidin-PtcP- und Avidin-PtP-Konjugaten

[0045] Avidin D wurde als eine Lösung mit 2 mg/ml in $1 \times$ NHS-Puffer (30 μM) markiert. Die Markierung wurde mit PtP-1/2,5-NHS und PtcP1,2 oder 3-NHS durchgeführt und für 16 Stunden auf Eis fortgesetzt. Eine Reinigung wurde mit Standard-Gelfiltration durchgeführt.

5 \times NHS-Puffer

[0046] Dieser Puffer enthält: 0,25 M Na-Phosphat pH 8,0
 0,5 M NaCl

25 mM EDTA pH 8,0

1. Präparation von 500 ml 0,5 M Na-Phosphat pH 8,0.

2. Zugabe von 100 ml 5 M NaCl und 50 ml 0,5 M EDTA pH 8,0.

3. Autoklavieren für 20 min bei 120°C.

4. Einstellen des Volumens auf 1 Liter mit autoklaviertem, bidestilliertem Wasser.

[0047] Die folgenden Konjugate wurden erhalten:

Markierung	Pt(c)P:Avidin	Ausbeute (%)	F/P
PtcP-1-NHS	2	67	2,0
	4	46	3,3
	8	23	7,4
PtcP-2-NHS	2	68	2,2
	4	41	3,3
	8	15	7,3
PtcP-3-NHS	2	70	2,3
	4	49	3,1
	8	15	6,8
PtP-1-NHS	2	67	0,1
	4	40	0,3
	8	24	0,6
PtP-2,5-NHS	2	72	0,2
	4	55	0,4
	8	31	0,8

[0048] Aus den PtcP-Markierungen wurden alle Konjugate, die mit einem 2fachen Überschuss hergestellt wurden, vereinigt und über Centrion30-Ausschluss-Filter (Avidin-PtcP A, 3,9 mg/ml, F/P 2,2) aufkonzentriert. Ebenso wurden alle Proben mit 4fachem Überschuss (Avidin-PtcP B, 1,1 mg/ml, F/P 3,2) und alle Proben mit 8fachem Überschuss vereinigt (Avidin-PtcP C, 0,33 mg/ml, F/P 7,1).

[0049] Die 3 PtcP-Konjugate wurden in dem Biotin-ELISA-Assay getestet. Die Daten zeigten, dass die PtcP-Konjugate A 82%, die PtcP-Konjugate B 68% und die PtcP-Konjugate C 43% ihrer ursprünglichen Aktivität (OD 490/ng Avidin) behielten.

3.3 Avidin-PVA-PtP-Konjugate

Präparation von PtP- und Biotin-markiertem Polyvinylalkohol (PVA)

1. Zu 1 1,5 mg PVA-NH₂ (1/3 OH = NH₂, 0,4 ml in DMSO), wurden 50 µl Triethylamin (TEA) zugegeben und entweder wurden 0,5 ml PtP-1-NHS-Ester (7 mM) + 50 µl 10 mM Biotin-LC-NHS-Ester (Pierce in DMSO) zugegeben, um PtP1B15 (15% der NHS-Ester enthielten ein Biotin) zu erhalten, oder es wurden 5 ml PtP-2,5-NHS-Ester (2,2 mM) + 25 µl 10 mM Biotin-LC-NHS-Ester in DMSO zugegeben, um PtP2B20 zu erhalten. Die Inkubation betrug 18 Stunden bei 60°C.

2. Nach der Zugabe von 4 ml bidestilliertem Wasser zu jeder Probe wurden die markierten PVA-Moleküle unter Verwendung von 2 Centricon 100-Filtern (Amicon) pro Probe gereinigt. 1 × TE wurde verwendet, um das Produkt > 100 kDa zu waschen. Sie wurden 3 × 90 min bei 3000 rpm in einer Sorvall-Zentrifuge bei 4°C rotiert. Die Ausbeuten betragen 2 × 50 µl PtP1B15 (sehr dunkel gefärbt) oder 2 × 500 µl PtP2B20 (orange). Unter Verwendung des Mono-NHS-Esters tauchte mehr Produkt > 100 kDa auf, als mit dem Di-NHS-Ester erhalten wurde. Es wurde gefunden, dass biotinylierter PVA > 100 kDa bessere Ergebnisse ergibt als ein PVA < 100 kDa.

Präparation von PtP-PVA-Avidin-D-Konjugaten

3. Die PtP/Biotin-markierten PVA-Produkte > 100 kDa wurden mit Avidin-D behandelt, um Avidin-PVA-PtP-Konjugate mittels Affinitätschemie herzustellen. Dazu wurden 0,5 mg Avidin-D in 100 µl 4 × SSPE zu 100 µl PtP1 B15 zugegeben, oder 1 mg Avidin-D in 200 µl 4 × SSPE wurde zu 1 ml PtP2B20 zugegeben. Die Proben reagierten 2 Stunden bei 30°C, wonach das Volumen von beiden Proben unter Verwendung von PBSE (PBS + 2 mM EDTA) auf 1,5 ml gebracht wurde. Die Farbe von beiden Proben war braun.

4. Die Proben wurden von nicht gebundenem Avidin-D unter Verwendung von Centricon 100-Filtern (3 × 90 min 3000 rpm gegen PBSE) gereinigt. Ein Test mit bloßem Avidin-D zeigten eine Ausbeute von < 1%, was anzeigt, dass mit diesem Verfahren alles ungebundene Avidin-D entfernt wird. Die Ausbeuten betragen:

APP1: 0,2 ml Avidin-PtP1B15, dunkelbraun gefärbt. 4

APP2: 1,0 ml Avidin-PtP2B20, orange gefärbt.

[0050] Die Produkte < 100 kDa zeigten eine geringe Färbung (APP1) oder fast überhaupt keine Färbung (APP2).

4. ELISA-Experimente

4.1. Anti-DIG-ELISA

[0051] Ziel dieses ELISA ist es, die Bindungsaktivität von Porphyrin-markierten Ziege-Anti-IgG-Anti-DIG-Antikörpern (GaDIG) gegenüber Digoxigenin (DIG) zu bestimmen. DIG wird auf die Platte geschichtet und mit einer sequenziellen Verdünnung von verschiedenen GaDIG-Konjugaten unter Verwendung von sequenziellen Verdünnungen von nicht markiertem GaDIG als eine 100%ige Kontrolle inkubiert. Die Menge an gebundenem (= immunaktivem) Ziege-IgG pro Masseinheit IgG wird durch Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase- (HRP) markierten Anti-Ziege-IgG-Antikörpern gemessen. Die HRP wird mit o-Phenylendiamin (OPD) analytisch bestimmt.

1. Eine 96well-Platte (Greiner) wird 2 Stunden bei 37°C beschichtet mit 150 µl 10 µg/ml DIG-markiertem Kaninchen-IgG (1 : 500) in 0,1 M Na-Carbonat pH 10. Die Platte wird 3 × mit TNT (50 mM TrisHCl pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20) gewaschen.
2. Es wird mit 150 µl TNB (50 mM TrisHCl pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,5% (w/v) Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim)) für 30 min bei 37°C inkubiert
3. Es wird für 1 h bei 37°C mit 100 µl eines GaDIG-Konjugats (unmarkiertes GaDIG ist die 100%ige Kontrolle) inkubiert. Die besten Ergebnisse wurden mit einer 2fachen sequenziellen Verdünnung in TNB erhalten, ausgehend von 50 µg/ml IgG. Die Platte wird 3 × mit TNT gewaschen.
4. Es wird 1 h bei 37°C mit 125 µl eines Kaninchen-Anti-Ziege-Antikörper-HRP-Konjugats (Sigma, 1 : 2500), verdünnt in TNB, inkubiert. Die Platte wird 3 × mit TNT gewaschen.
5. Es wird mindestens für 30 min bei RT mit 150 µl 0,4 mg/ml OPD in OPD-Puffer (0,1 M Citrat/Phosphat pH 5,3), enthaltend 0,03% H₂O₂ inkubiert. Die Reaktion wird mit 50 µl 0,18 M H₂SO₄ gestoppt. Die optische Dichte (OD) bei 492 nm wird abgelesen.

4.2. GaM-ELISA

[0052] Ziel dieses ELISA ist es, die Bindungsaktivität von Porphyrin-markierten Ziege-IgG-Anti-Maus-IgG (GaM) gegenüber Maus-IgG zu bestimmen. Maus-IgG wird auf die Platte geschichtet und mit einer sequenziellen Verdünnung von verschiedenen GaM-Konjugaten unter Verwendung von sequenziellen Verdünnungen von nicht markiertem GaM als einer 100%igen Kontrolle inkubiert. Die Menge an gebundenem (= immunaktivem) Ziege-IgG pro Masseinheit IgG wird durch Inkubation mit HRP-markierten Anti-Ziege IgG-Antikörpern gemessen. Die HRP wird mit OPD analytisch bestimmt.

- 1: Eine 96well-Platte (Greiner) wird 2 Stunden bei 37°C beschichtet mit 150 µl 10 µg/ml Maus-IgG (Sigma) in 0,1 M Na-Carbonat pH 10. Die Platte wird 3 × mit TNT gewaschen.
2. Es wird mit 150 µl TNB für 30 min bei 37°C inkubiert
3. Es wird für 1 h bei 37°C mit 100 µl eines GaM-Konjugats (unmarkiertes GaM ist die 100%ige Kontrolle) inkubiert. Die besten Ergebnisse wurden mit einer 2fachen sequenziellen Verdünnung in TNB erhalten, ausgehend entweder von 50 µg/ml IgG (wenn die IgG-Gesamtfraktion des Antiserums verwendet wird) oder von 10 µg/ml IgG (wenn die Affinitäts-isolierte IgG-Fraktion des Antiserums verwendet wird). Die Platte wird 3 × mit TNT gewaschen.
4. Es wird 1 h bei 37°C mit 125 µl eines Kaninchen-Anti-Ziege-Antikörper-HRP-Konjugats (Sigma, 1 : 2500), verdünnt in TNB, inkubiert. Die Platte wird 3 × mit TNT gewaschen.
5. Es wird mindestens für 30 min bei RT mit 150 µl 0,4 mg/ml OPD in OPD-Puffer, enthaltend 0,03% H₂O₂,

inkubiert. Die Reaktion wird mit 50 µl 0,18 M H₂SO₄ gestoppt. Die optische Dichte (OD) wird bei 492 nm abgelesen.

4.2. Biotin-ELISA

[0053] Ziel dieses ELISA ist es, die Biotin-Bindungsaktivität von Porphyrin-markiertem Avidin-D zu bestimmen. Biotinyliertes BSA wird auf die Platte geschichtet und mit sequenziellen Verdünnungen von verschiedenen Avidin-D-Konjugaten unter Verwendung ähnlicher sequenzieller Verdünnungen von nicht markierten Avidin-D-Konjugaten als eine 100%ige Kontrolle inkubiert. Die Menge an gebundenem Avidin-D pro Masseinheit Avidin-D wird durch Inkubation mit HRP-markierten Anti-Avidin-D-Antikörpern analytisch bestimmt. Die HRP wird mit OPD analytisch bestimmt.

1. Eine 96well-Platte (Greiner) wird 2 Stunden bei 37°C beschichtet mit 150 µl 10 µg/ml biotinyliertem BSA (20 mg/ml Stammlösung, BSA wurde bei 20 mg/ml für 2 Stunden bei 30°C mit 5 mg/ml Biotin-LC-NHS markiert, erhalten von Pierce, gelöst in DMSO als 50 mg/ml Stammlösung) in 0,1 M Na-Carbonat pH 10. Die Platte wird 3 × mit TNT gewaschen.
2. Es wird mit 150 µl TNB für 30 min bei 37°C inkubiert
3. Es wird für 1 h bei 37°C mit 100 µl des Avidin-D-Konjugats inkubiert (nicht markiertes GaM ist die 100%ige Kontrolle). Die besten Ergebnisse wurden mit einer 2fachen sequenziellen Verdünnung in TNB erhalten, ausgehend von 200 µg/ml Avidin-D. Die Platte wird 3 × mit TNT gewaschen.
4. Es wird für 1 h bei 37°C mit 125 µl eines Ziege-Anti-Avidin-D-HRP (Vector, 1 : 400), verdünnt in TNB, inkubiert. Die Platte wird 3 × mit TNT gewaschen.
5. Es wird mindestens für 30 min bei RT mit 150 µl 0,4 mg/ml OPD in OPD-Puffer, enthaltend 0,03% H₂O₂, inkubiert. Die Reaktion wird mit 50 µl 0,18 M H₂SO₄ gestoppt. Die optische Dichte (OD) wird bei 492 nm abgelesen.

6. Präparation von PtP- und PtcP-markierten Tyramiden

6.1. DCC/HBTO-Verfahren (vergleichend)

[0054] Die Carboxylgruppen von PtP wurden mit der Aminogruppe von Tyramin (Tyr) umgesetzt. PtP-(COOH)₄ (8 mM) wurde mit 1, 2...4fachem Überschuss an DCC, HBTO und 0, 1...4fachem Überschuss an Tyramin in frisch geöffnetem DMSO umgesetzt.

[0055] Die Tyramide wurden mittels einer CD4-Detektion auf Lymphozyten in Konzentrationen von 8 und 80 µM getestet. Die Kontrolle ohne Tyramin zeigte einen relativ hohen Hintergrund auf allen Lymphozyten. Es wurde kein spezifischer Nachweis mit den verschiedenen PtP-Tyr beobachtet.

[0056] Dann wurde dasselbe Verfahren angewendet, um PtP-(COOH)₂(Tyr)₂ herzustellen. Die Reaktion wurde nun in DMF und in zwei Schritten durchgeführt: 1. Reaktion von DCC und HBTO (PtP : Tyr = 2 : 1) dann 2. Reaktion mit Tyramin (PtP : DCC, HBTO = 2 : 1). Die erste Reaktion wurde bei verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt. Diese Tyramide wurden getestet bei 20 µM, durch eine in situ-Hybridisierung auf Lymphozyten-Chromosomen. Keine Ergebnisse wurden erhalten.

6.2. Gemischtes Anhydrid-Verfahren (vergleichend)

[0057] PtP wurde mit Triethylamin (TEA), Ethylchlorformiat (ECF) und Tyramin umgesetzt. DMF wurde als ein Lösungsmittel verwendet. PtP : TEA, ECF oder Tyr betrug 2 : 1. Diese Tyramide wurden getestet bei 20 µM, durch eine in situ-Hybridisierung auf Lymphozyten-Chromosomen. Keine Ergebnisse wurden erhalten

6.3. DCC/HBTO-NHS-Verfahren (Erfindung)

[0058] PtP- und PtcP-NHS-Ester wurden gemäß Beispiel 1 hergestellt, und dann mit Tyramin in DMF + 0,3 – 10% TEA umgesetzt. Die Inkubationen wurden über Nacht bei 42°C oder für 4 Stunden bei 50°C durchgeführt. Die Proben wurden bei –20°C gelagert und in einem Filterassay getestet. i ng Maus-IgG 1 : 3 fg in 0,1% BSA wurde auf Hybond Cextra aufgetupft. TNB wurde verwendet, um die Antikörper zu blocken/verdünnen und TNT wurde verwendet, um zwischen den Inkubationsschritten zu waschen, mlgG wurde durch ein Schaf-Anti-Maus-DIG-Konjugat (1 : 2500) und ein Schaf-Anti-DIG-HRP-Konjugat (1 : 1000) detektiert. Der Tyramin-Nachweis wurde bei pH 8,0/0,003% H₂O₂ und einer Konzentration von 50 µM durchgeführt. Alle hergestellten Tyramide wurden bei ± 10 pg (Extinktion) nachgewiesen.

[0059] Die hergestellten Tyramide waren:

<u>Beschreibung</u>	<u>Verwendeter</u>	<u>NHS-</u>	<u>[PtP]</u>	<u>[NHS]</u>	<u>[Tyramid]</u>
	<u>Ester</u>		mM	mM	mM
PtP(COOH) ₃ (Tyr) ₁	PtP-1-NHS		5,5	5,5	4,5
PtP(COOH) ₂ (Tyr) ₂	PtP-2,5-NHS		1,8	4,5	4,5
PtP(COOH) ₃ (Tyr) ₁	PtP-2,5-NHS		1,8	4,5	1,8
PtcP(COOH) ₃ (Tyr) ₁	PtcP-1-NHS		14,5	14,5	16,3
PtcP(COOH) ₂ (Tyr) ₂	PtcP-2-NHS		11,6	23,2	22,9

[0060] In einem Filtertest war die Empfindlichkeit von mehrfach mit Tyramin markierten Pt-Porphyrinen besser als die Empfindlichkeit von einfach mit Tyramin markierten Pt-Porphyrinen.

7. Präparation von PtP- und PtcP-markierten DNA-Proben

[0061] DNA wurde mit Pt-Porphyrin-NHS-Estern unter Verwendung von 2 Verfahren markiert.

7.1. Nick-Translation mit PtP/PtcP-dUTP.

[0062] 7.2. Nick-Translation mit Allylamin-dUTP, gefolgt von einer Inkubation mit PtP/PtcP-NHS-Estern.

Präparation von Pt-Porphyrin-dUTP

[0063] Zu Allylamin-dUTP wurde ein 5facher Überschuss von PtP- oder PtcP-1-NHS-Ester zugegeben (gesamt: 1 × NHS-Puffer, 10–25% DMF) und für 1–4 Stunden bei 37°C inkubiert.

[0064] PtP-dUTP und PtcP-dUTP wurden durch Dünnschichtchromatographie gereinigt. Kieselgel HPTLC 254 nm-Platten wurden als feste Phase verwendet und 70% Etanol, 30% H₂O wurde als ein Elutionsmittel verwendet. Gefundene R_f-Werte:

PtP-2,5-NHS (nach der Inkubation) R _f =	0,95
PtP-dUTP (1 PtP/dUTP)	0,80–0,85
Allylamin-dUTP	0,2
N-Hydroxysuccinimid	0,85

[0065] Präparation von NH₂-markierter DNA und Markierung mit Pt-Porphyrin-NHS

[0066] DNA-Proben wurden mit primären Aminogruppen markiert. Dafür wurde eine Standard-Nick-Translation durchgeführt. Das Nick-Gemisch enthielt unter anderem: 50 µM dATP, dCTP, dGTP und 54 µM Allylamin-dUTP (1/50 2,7 mM Stammlösung). Die DNA wurde gereinigt und durch Ethanolpräzipitation aufkonzentriert. Das Pellet wurde in 1 × NHS-Puffer gelöst und mit PtP/PtcP-NHS-Estern umgesetzt. Die Probe wurde dann durch Gelfiltration, gefolgt von einer Ethanolpräzipitation in der Gegenwart von Carrier-DNA gereinigt.

8. Immunhisto/zytochemische Experimente (IHC) und in situ-Hybridisierungsexperimente (ISH)

8.1. Auf Tyramid basierende INC

[0067] Der Biotin-Tyramid- (BT) Nachweis von HPR zum immunochemischen Nachweis von Antigenen mit Pt-Porphyrin-markiertem Avidin-D wurde in 2 verschiedenen Assays getestet. Zuerst wurde Vimentin in 4 µM-Kryostatschnitten einer Rattenleber aus Ratten, die mit polymeren Ratten-IgG-Komplexen injiziert wurden, immunologisch gefärbt. Nach einer Aceton-Fixierung für 10 min bei RT wurden die Schnitte für 1 h bei 37°C mit Maus-IgG-Anti-Vimentin (Amersham RPN 1 102, 1 : 40 in TNB verdünnt) inkubiert, 3 × 5 min in TNT gewaschen und für 30 min bei 37°C mit HRP-markierten-Anti-Maus-Antikörper-Avidin-Komplexen inkubiert, die 1 : 250 in TNB verdünnt wurde. Nach 3 × 5 min Waschen in TNT wurden die Schnitte in 0,15 M NaCl gespült. Dann wurden 0,5 ml Tyramid-Nachweislösung appliziert und für 30 min bei RT inkubiert. Der Nachweispufer bestand aus 20 µM BT, 0,2 M TrisHCl pH 7,5, 10 mM Imidazol und 0,001% H₂O₂. Biotinylierte Tyramide wurden durch Avidin-D nachgewiesen, das mit PtP oder PtcP (Inkubation für 30 min, 37°C, verdünnt in TNB) markiert war. Dann wurden die Proben 3 × 5 min bei RT in TNT gewaschen, entwässert und in Vectashield® eingebettet.

[0068] Verschiedene CD-Marker wurden auf humanen mononukleären weißen Blutkörperchen nachgewiesen, die mit 1% Formaldehyd fixiert waren. Monoklonale Maus-IgG-Antikörper gegen CD4, 9, 13, i 4 und i 9 (Dakopatts, Beckton and Dickinson) wurden auf Zytospin-Präparationen der Zellen inkubiert. Die Objektträger wurden nacheinander mit HRP-markierten Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörper-Avidin-Komplexen inkubiert. Die Inkubationen mit Antikörpern und das Waschen wurde in TNB beziehungsweise TNT durchgeführt. Der Nachweis wurde durchgeführt, wie für Gewebeschnitte beschrieben.

8.2. Tyramid-basierende Phosphoreszenz in situ-Hybridisierung (PHISH)

[0069] Humane Metaphase-Präparationen wurden als Target für die Tyramid-basierende PHISH verwendet. Mit Methanol/Essigsäure fixierte Lymphozyten-Präparationen wurden auf Objektträger aufgetropft, für 2 min getrocknet und in 70%ige Essigsäure eingetaucht. Die Objektträger wurden über Nacht getrocknet. Dann wurden die Objektträger für 15 min bei 37 ° C mit 0,1 mg/ml RNase A (Promega) in 2 × SSPE (vgl. „Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Second Ed., 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, B.13“) behandelt, zweimal für 5 min mit PBS und einmal für 5 min bei 37°C mit 0,01 M HCl gewaschen. Dann wurden sie für 10 min bei 37°C in 0,05% (w/v) Pepsin (Sigma)/0,01 M HCl inkubiert, zweimal in PBS gewaschen und für 10 min bei RT in 1% Formaldehyd/PBS nachfixiert. Nach zwei Waschgängen mit PBS wurden die Objektträger durch eine Alkoholreihe entwässert und getrocknet.

[0070] Sowohl Proben geringer Komplexität (Plasmide) als auch Proben hoher Komplexität (Cosmide, Chromosomen, Bibliotheken) wurden verwendet. Plasmidproben (spezifisch für die 28S rRNA-Gene) wurden denaturiert und in einem Gemisch enthaltend 50% Formamid, 2 × SSPE, 10% Dextransulfat, 0,3-1 µg/µl Probe und 50 ng/µl Heringssperma-DANN hybridisiert. Chromosomen-Bibliotheken und Cosmidproben wurden denaturiert durch Inkubation für 10 min bei 80°C in 50% Formamid, 2 × SSPE, 10% Dextransulfat. Das Gemisch enthielt weiterhin einen 10fachen (Bibliotheken) oder 50fachen (Andere) Überschuss an humanem Cot1-DNA (Boehringer). Die Probe wurde an die Cot1-DNA durch Inkubation des Gemischs für 60 min bei 37°C „preannealed“. Die Objektträger wurden durch Inkubation für 2 min bei 80°C denaturiert. Sie wurden dann für 2 min in 70%igem EtOH (-20°C) gewaschen und nachfolgend entwässert. Das „preannealed“ Probe/Cot1-DNA-Gemisch wurde darin zugegeben und in demselben Gemisch enthaltend 10 ng/µl markierte Probe und 100-500 ng/µl humane Cot1-DNA hybridisiert. Die Hybridisierung wurde für 16 - 20 Stunden bei 37 ° C durchgeführt. Die Objektträger wurden nacheinander einmal bei RT und 2 × 5 min bei 60°C in 2 × SSPE/0,1% Tween 20 (Sigma) gewaschen, gefolgt von zwei 5minütigen Waschgängen in 0,1 × SSPE bei 60°C.

[0071] Biotinylierte oder Digoxigenin-markierte Proben wurden durch Nick-Translation hergestellt und mit Streptavidin-HRP (Vector, 5 µg/µl in TNB) oder Schaf-Anti-Digoxigenin-HRP (Boehringer, 1 : 200 in TNB verdünnt) immunologisch nachgewiesen. Bessere Ergebnisse wurden durch einen immunologischen 2-Schritt-Nachweis der Proben entweder durch Maus-Anti-Biotin (Sigma, 1 : 200) + Kaninchen-Anti-Maus-HRP (DAKO, 1 : 150) für biotinylierte Proben oder Maus-Anti-DIG-Biotin (Sigma, 1 : 200) + Streptavidin-HRP (Vector, 1 : 100) erhalten. Antikörper wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und 3 × 5 min in TNT gewaschen. Ein Tyramid-Nachweis wurde wie für Gewebeschnitte beschrieben durchgeführt, außer, dass 20% w/v Dextransulfat zu dem Nachweismischung zugegeben wurde. Die Dextransulfat-Konzentration in dem Substratpuffer wurde auf 5% (w/v) abgesenkt, wenn Bibliotheken als eine Probe verwendet werden. Schließlich wurde anstelle von Dextransulfat 10%iger PVA (Mw 72 kDa) zugegeben, wenn hochrepetitive sequenzspezifische Proben (z. B. Zentromer-spezifische Proben) verwendet wurden.

[0072] Nach dem letzten TNT-Waschgang wurden die Objektträger für 10 min bei RT in TNT enthaltend 10 ng/µl des „blue fluorescent DNA counterstaining diamino propidium iodide“ (DAPI) inkubiert, und nachfolgend durch eine Alkoholreihe entwässert. Die Objektträger wurden entweder in Vectashield® oder in Merckoglas® (1 : 1 verdünnt mit Xylol, polymerisiert für mindestens 30 min bei 37 ° C) eingebettet.

8.3. Konventionelle PHISH

[0073] Hybridisierungs- und Post-Hybridisierungs-Waschschritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die Probenkonzentrationen für Plasmidproben wurden auf 5-10 ng/µl angehoben und Cosmide wurden bei 20 ng/µl + 1 µg/µl Cot1-DNA hybridisiert.

[0074] Normalerweise wurde ein immunochemischer Ansatz in drei oder vier Schritten verwendet, um PHISH-Signale auf Metaphase-Präparationen sichtbar zu machen. Die Proben wurden mit Fluorescein-12-dUTP, Dig-11-dUTP oder Oestradiol-11-dUTP durch Nick-Translation markiert, und entweder durch Maus-Anti-DIG (Sigma, 1 : 200), Kaninchen-Anti-FITC (DAKO, 1 : 100) oder Kaninchen-Anti-Oestradiol (Boehringer, 1 : 250) immunologisch nachgewiesen. Für den Ansatz in drei Schritten wurden die Objektträger entweder mit einem Schaf-Anti-Maus-Biotin-Konjugat (Boehringer, 1 : 200) oder einem Ziege-Anti-Kaninchen-Biotin-Konjugat (Sigma, 1 : 400) inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit Avidin-D-PtP/PtCP. Alle Verdünnungen wurden in TNB durchgeführt und alle Inkubationen waren für 30 min bei 37°C. In Zwischenschritten wurden die

Objektträger 3 × 5 min in TNT gewaschen.

[0075] Biotinylierte Proben wurden nachgewiesen durch 1. Avidin-PtcP, 2. Ziege-Anti-Avidin-D-Biotin-Konjugate (Vector, 1 : 100) und 3. Avidin-PtcP. Alle Verdünnungen wurden in TNB durchgeführt und die Inkubationen waren für 30 min bei 37°C. In Zwischenschritten wurden die Objektträger 3 × 5 min in TNT gewaschen.

[0076] Digoxigenin-markierte Proben wurden auch durch einen Ansatz in vier Schritten nachgewiesen. Nach einer Inkubation mit Maus-Anti-DIG-Biotin-Konjugat, wurden die Objektträger mit den 3 Schichten inkubiert, wie für die biotinylierten Proben beschrieben.

[0077] Nach dem letzten TNT-Waschgang wurden die Objektträger für 10 min bei RT in TNT enthaltend 10 ng/µl DAPI inkubiert, und nachfolgend durch eine Alkoholreihe entwässert. Die Objektträger wurden in Vectashield® eingebettet.

8.4. mRNA-Nachweis

[0078] Verschiedene in vitro kultivierte Zelllinien wurden verwendet, um verschiedene mRNAs nachzuweisen.

– Rat9G-Zellen (enthält einen Teil des humanen CMV-1EA-Gens)

– HelaX 1-Zellen (enthält das Luziferase-Gen)

– Hela-Zellen

[0079] Nachdem das Medium verworfen worden war, wurden die Zellen, die auf mikroskopischen Objektträgern gewachsen waren, zweimal mit PBS gewaschen und nachfolgend für 20 min bei RT in 4% Formaldehyd, 5% Essigsäure, 0,9% NaCl fixiert. Die Zellen wurden dann mit 70%igem Ethanol gewaschen und in dieser Lösung bei 4°C gelagert.

[0080] Die Objektträger wurden durch eine Ethanolreihe entwässert und für 10 min bei RT in HistoClear® oder Xylol gewaschen, um Lipide zu entfernen. Nach einem Waschgang in 100%igem Ethanol wurden die Objektträger mit 90%igem und 70%igem Ethanol rehydriert. Sie wurden dann in 0,01 M HCl gewaschen und für 1 min in 0,1% Pepsin/0,01 M HCl bei 37°C inkubiert. Nach einer kurzen Spülung in bidestilliertem Wasser wurden die Objektträger durch eine Alkoholreihe entwässert.

[0081] Das Hybridisierungsgemisch (60% Formamid, 2 × SSC (vgl. Maniatis et al., oben, B.13), 10% Dextransulfat und 5 ng/µl DIG-markierte Probe) wurde appliziert. Probe und Target wurden für 2,5 min bei 80°C denaturiert und eine Hybridisierung wurde für 16–20 Stunden bei 37°C fortgesetzt. Die Objektträger wurden für 5 min in 2 × SSC bei RT gewaschen, um die Deckgläser zu entfernen und dann für 3 × 5 min in 60% Formamid, 2 × SSC bei 37 ° C gewaschen.

[0082] Der immunochemische Nachweis wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

8.5. Nachweis von Gluthation-S-Transferase (GSTP) auf in Technovit®8100 eingebetteten Rattenleber-Schnitten

[0083] Leberbiopsien wurden für 2 Stunden bei RT in 2% Paraformaldehyd fixiert, gefolgt von einer Inkubation über Nacht in Sucrose. Die Leber wurde dann in Technovit®8100 eingebettet. Schnitte von 4 µm wurden geschnitten und auf Objektträger platziert, die mit Ethanol/Ether (1 : 1) gereinigt wurden. Die Objektträger wurden bei 4°C gelagert.

[0084] Die Objektträger wurden für 2 Stunden bei 37°C getrocknet und für 5 min bei 37°C mit 0,01% Trypsin (Boehringer) in 0,1 M TrisHCl pH 7,8/0,1% CaCl₂ behandelt. Nach zwei Waschstufen für 10 min in PBS wurden die Objektträger für 15–30 min bei 37°C in TNB inkubiert, ehe ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Ratte-GSTP-Antikörper appliziert wurde (1 : 150 in TNB verdünnt). Nach einer Inkubation für 2 Stunden bei 37°C wurden die Objektträger für 3 × 5 min in PBS gewaschen und für 30 min bei 37°C mit einem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper-HRP-Konjugat (Sigma, 1 : 200 in TBN verdünnt) behandelt. Nach 3 × 5 min Waschen in PBS wurde die BT-Reaktion wie oben beschrieben durchgeführt, ohne RVA oder Dextransulfat, und nach 30 min bei RT wurde 3 × 5 min in PBS gewaschen und die Biotin-Ablagerungen wurden immunochemisch durch Avidin-PtP (30 min bei 37°C in 30–50 µg/ml in TBN) nachgewiesen. Nach 3 × 5 min Waschen in PBS wurden die Schnitte durch eine Ethanolreihe getrocknet und in Merckoglas® eingebettet.

9. Biotin-Tyramid-basierter immunhisto-/cytochemischer und in situ-Hybridisierungsassay

9.1. GSTP-Nachweis in Rattenleber-Schnitten (eingebettet in Technovit®8100)

[0085] Die Schnitte wurden in Kunststoff (Technovit®8100) eingebettet. Eine hohe Autofluoreszenz der Schnitte wurde unter Verwendung verschiedener Filtersets auf dem Mikroskop beobachtet. GSTP-Protein wurde durch ein Verfahren in 2 Schritten immunhistochemisch nachgewiesen: zuerst ein Kaninchen-Anti-GSTP-Antikörper gefolgt von einem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper-HRP-Konjugat. Nach der Reaktion mit

einem Biotin-Tyramid-Konjugat wurden die Biotin-Ablagerungen dann durch Avidin-PtP gefärbt. Die Ergebnisse zeigten, dass unter Verwendung eines zeitaufgelösten Mikroskops GSTP leicht durch das Pt-Porphyrin-markierte Avidin nachgewiesen werden konnte, mit einem komplett schwarzen Hintergrund. Die Signal-Rausch-Verhältnisse waren denen weit überlegen, die mit fluoresceinierten Antikörpern erhalten wurden.

9.2. RNA-PHISH CMV-mRNA-Nachweis auf Rat9G-Zellen

[0086] pSS, eine 7 kb Plasmidprobe, die für das „immediate early“ Antigen des humanen Cytomegalovirus (CMV) spezifisch ist, wurde mit Digoxigenin-11-dUTP markiert und als eine Probe zum Nachweis der CMV-mRNA verwendet, die in Rat9G-Zellen vorhanden ist, die mit Cycloheximid stimuliert wurden. Die hybridisierte Probe wurde durch ein Schaf-Anti-DIG-Anti-HRP-Konjugat (1 : 100 verdünnt) immunochemisch nachgewiesen, gefolgt von einer Reaktion mit Biotin. Biotin-Ablagerungen wurden dann mit Avidin-PtP gefärbt.

[0087] Ein Signal wurde in etwa 20% der Zellen beobachtet. Die Signale wurden sowohl durch das Auge unter Verwendung eines normalen Fluoreszenz-DM-Mikroskops (Leica) als auch durch eine zeitaufgelöste Mikroskopie unter Verwendung einer CCD-Kamera (CH250, Photometrics Ltd., Tuscon, USA) sichtbar gemacht.

10. Biotin-Tyramid-basierte IHC und ISH mit PtcP-markiertem Avidin-D

10.1. PHISH auf humanen Metaphase-Präparationen

[0088] Proben von verschiedener Targetgröße wurden verwendet, um zeitaufgelöste PHISH mit Proben, eingebettet in Vectashield® (10,1–10,4), durchzuführen. Diese schließen verschiedene, für Chromosomenzentromere spezifische Proben ein, die für humane Satelliten III-DNA oder Alpha-Wiederholungen spezifisch sind. Weiterhin wurden eine für die 28S ribosomale Gene spezifische Probe, verschiedene Cosmide und Chromosombibliotheken verwendet.

[0089] Alle genannten Proben wurden leicht nachgewiesen. Signale konnten mittels Fluoreszenz unter Verwendung eines DM-Mikroskops oder verschiedener Mikroskope, die für eine zeitaufgelöste Messung geeignet sind, gesehen werden.

[0090] Verschiedene immunologische Verfahren wurden getestet für die Kombination von BT und Avidin-PtP/PtcP unter Verwendung von Cosmiden, die spezifisch sind für den kurzen Arm von Chromosom 2 (Carbamoyl-P-Synthetase-Aspartat-Transcarbamoylase-Dihydroorotase- (CAD) Gen) oder Chromosom X (Duchenne-Muskeldystrophie- (DMD) Gen).

[0091] Wenn eine Biotin-Probenmarkierung verwendet wurde, wurden besonders gute Ergebnisse mit einem Maus-Anti-Biotin- (Sigma) und einem Kaninchen-Anti-Maus-HRP-Konjugat (DAKO) erhalten. Wenn eine Digoxigenin-Probenmarkierung verwendet wurde, wurden besonders gute Ergebnisse mit einem Maus-Anti-DIG-Biotin-Konjugat (Sigma) und einem Streptavidin-HRP-Konjugat (Vector) erhalten.

[0092] Mit diesen Verfahren war es möglich, jedes Target auf humanen Metaphase-Präparationen nachzuweisen. Die Empfindlichkeit war besser als bei konventioneller Immunologie mit Fluorescein- oder Rhodamin-markierten Proben/Antikörpern.

[0093] Targets mit einer hohen Kopienzahl (z. B. zentromere Proben) wurden in BT mit 10% (w/v) PVA (72 kDa) inkubiert, und die anderen Proben wurden in BT mit 15–15% (w/v) Dextransulfat inkubiert. Dies erfolgte, um eine optimale Auflösung der Signale sicherzustellen.

[0094] 10.2. Doppelte Hybridisierung auf Basis einer zeitaufgelösten Fluorometrie

[0095] Ein doppeltes ISH-Experiment auf humanen Metaphase-Präparationen wurde durchgeführt. Das mit Rhodamin-4-dUTP (Boehringer) markierte Plasmid pUC1,77 (ein pUC-Plasmid, das ein 1,77 kb großes Insert enthält, das spezifisch ist für humane Satelliten III-DNA, die auf Chromosom 1, Band 1 q 12 lokalisiert ist), das für Chromosom 1 (c#1) spezifisch ist, wurde mit einer DIGmarkierten 28S rRNA-Probe cohybridisiert. Die DIG-Probe wurde durch HRPmarkierte Anti-DIG-Fab-Fragmente, gefärbt mit BT, nachgewiesen, und die Biotin-Ablagerungen wurden durch Avidin-PtcP nachgewiesen.

[0096] Ergebnisse, die aus einer kontinuierlichen Fluoreszenz erhalten wurden, zeigten eine positive Färbung des c#1 und der kurzen Arme aller akozentrischen Chromosomen (28S rDNA-Gene). Die Targets, die schließlich mit PtcP gefärbt waren, waren dunkler rot als die mit Rhodamin gefärbten Targets. Während der zeitaufgelösten Fluorometrie (Lasermikroskop) waren die 28S-Signale noch stark sichtbar, aber die c#1-Signale waren nicht mehr länger nachweisbar. Dies zeigt, dass die PtcP-Signale noch zeitaufgelöst waren, und eine Hintergrundsubtraktion unter Verwendung dieses Mikroskops hoch ist.

10.3. mRNA-Nachweis

[0097] Verschiedene mRNS-Sequenzen wurden durch zeitaufgelöste ISH und durch das BT-System nachgewiesen. HeLaX1-Zellen wurden verwendet, und rRNA, mRNA des humanen Elongationsfaktors (HEF) und Lu-

ciferase-mRNA wurden erfolgreich nachgewiesen mit BT/Avidin-PtcP unter Verwendung DIGmarkierter Proben, die mit HRP-markierten Anti-DIG-Fab-Fragmenten kombiniert waren.

10.4. Vergleich von Avidin-PtcP Avidin-PtP und Avidin-PVA-PfP

[0098] Eine Vimentinfärbung auf Rattenleber-Kryostatschnitten wurde verwendet, um verschiedene Avidin-Pt-Porphyrin-Konjugate zu vergleichen. Nach einer Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper wurden die Schnitte mit einem Kaninchen-Anti-Maus-HRP-Konjugat (DAKO) inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit BT. Die Biotin-Ablagerungen wurden durch Avidin-PtcP, Avidin-PtP und Avidin-PVA-PtP nachgewiesen. Die höchsten spezifischen Signale wurden mit dem PVA-Konjugat erhalten. Alle Schnitte wurden durch grüne und violette Extinktion kontrolliert. Die violette Extinktion erwies sich als effizienter, sowohl für PtP als auch für PtcP. Unter Verwendung eines Lasermikroskops wurden bessere Ergebnisse als mit PtP-markierten Konjugaten erhalten, aufgrund der Tatsache, dass PtP mehr Licht bei 514 nm adsorbiert als PtcP .

10.5. PtP- und PtP-Tyramid-basierende IHC und ISH mit Proben, die in Merckglas® eingebettet sind.

[0099] PtP und PtcP-Tyramide erwiesen sich als nützlich in einer Vimentinfärbung von Rattenleber-Gewebschnitten, die in Merckglas® eingebettet sind. Der Nachweis des Signals wurde durch zeitaufgelöste Mikroskopie verbessert.

11. Konventionelle IHC und ISH mit PtcP-markierten immunreaktiven Reagenzien

12.1. Zeitaufgelöste ISH mit c#18- 28S- und Cosmid.g2-Proben auf humanen Metaphase-Präparationen

[0100] Proben mit verschiedenen Targetgrößen wurden verwendet, um die Leistungsfähigkeit von Avidin-PtcP-Konjugaten zu kontrollieren. Die Targetgröße betrug wenige hundert kb (c#18-Probe), 50–200 kb (28S-Probe, abhängig von der Anzahl an rRNA-Genen, die im Bereich von ± 20 für c#22 bis zu ± 100 für c#15 liegt) bis zu ± 30 kb (Cosmidprobe, CAD-Gen-spezifisch, das auf dem q2 lokalisiert ist).

[0101] Einzel- bis mehrschichtige immunologische Ansätze wurden unter Verwendung von entweder Biotin-, DIG-, Fluorescein-, oder Oestradiol- (E2) markierten Proben getestet.

1 Schicht	BIO-Probe	nachgewiesen durch Avidin-PtcP
2 Schichten	DIG-Probe	nachgewiesen durch Maus-Anti-DIG-Biotin-Konjugat + Avidin-PtcP
3 Schichten	BIO-Probe	nachgewiesen durch Avidin-PtcP + Ziege-Anti-Avidin-Biotin-Konjugat + Avidin-PtcP
	DIG-Probe	nachgewiesen durch Maus-Anti-DIG + Schaf-Anti-Maus-Biotin-Konjugat + Avidin-PtcP
	FLU-Probe	nachgewiesen durch Kaninchen-Anti-FITC + Ziege-Anti-Kaninchen-Biotin-Konjugat + Avidin-PtcP
	E2-Probe	nachgewiesen durch Kaninchen-Anti-E2 + Ziege-Anti-Kaninchen-Biotin-Konjugat + Avidin-PtcP

4 Schichten DIG-Probe nachgewiesen durch Maus-Anti-DIG-Biotin-Konjugat + Avidin-PtcP + Ziege-Anti-Avidin-Biotin-Konjugat + Avidin-PtcP

Ergebnisse:

[0102] Die Ergebnisse wurden entweder unter Verwendung eines DM-Mikroskops (kontinuierliche grüne Anregung), CCD-Imaging (kontinuierliche grüne Anregung) oder mit dem Lasermikroskop (zeitaufgelöste 514 nm-Anregung) kontrolliert.

1 Schicht: Es erfolgte fast keine Visualisierung der verschiedenen Targets. Nur die c#18-Probe zeigte in Kombination mit der CCD-Kamera einiger Ergebnisse.

2 Schichten: Sowohl die c#18-Probe als auch die 28S-probe waren schwach gefärbt mit dem DM-Mikroskop. CCD-Imaging zeigte, dass im Durchschnitt 7 von 10 akrozentrischen Chromosomen nachweisbar waren. Die Cosmidprobe wurde mit diesem Ansatz nicht nachgewiesen.

3 Schichten: Ergebnisse, die aus der BIO-Probe erhalten wurden, waren schlechter, verglichen mit dem Ansatz mit 2 Schichten. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Verwendung fluoresceinierter Antikörper gefunden. Für die DIG-Probe wurden verschiedene biotinylierte Anti-Maus-IgG-Antikörper getestet, die von bioSPA, Sigma, DAKO und Boehringer erhalten wurden. Das Schaf-Anti-Maus-F(ab')₂-Biotin-Konjugat (Boehringer) lieferte die besten Ergebnisse. Es wurden intensivere Signale erhalten im Vergleich zu dem Ansatz mit 2 Schichten. CCD-Imaging zeigte, dass im Durchschnitt 9,5 von 10 akrozentrischen Chromosomen nachweisbar waren. Weiterhin wurde gefunden, dass DIG-, FLU- oder E2-markierte Proben ähnliche Sensitivitäten liefern. Die Cosmidprobe wurde nicht mit diesen Proben bearbeitet.

4 Schichten: Alle Proben (außer dem Cosmid) wurden unter Verwendung dieses Ansatzes leicht nachgewiesen, und die am intensivsten gefärbten Signale wurden mit diesem Verfahren gefunden. Die Cosmidprobe wurde mit dem DM-Mikroskop nicht nachgewiesen, aber sie wurde sowohl durch die CCD-Kamera als auch unter Verwendung des Lasermikroskops (ohne Kamera) nachgewiesen.

11.3. mRNA-Nachweis

[0103] HelaX 1-Zellen wurden unter Verwendung des Ansatzes mit zwei Schichten und dem DM-Mikroskop (kontinuierliche grüne oder violette Anregung) verwendet, um 28S rRNA-Moleküle nachzuweisen. Die 28S-Probe konnte nachgewiesen werden.

1 2. Palladium-Coporphin

12.1 . Präparation von PdcP-di-NHS und Avidin-PdcP

Präparation von PdcP-di-NHS-Ester

[0104] Der Di-NHS-Ester von Palladium-Coporphyrin (PdcP) wurde durch Lösen von 6,2 mg PdcP in 0,8 ml trockenem DMF hergestellt. Dann wurden .34 µl DCC (100 mg/ml in DMF), 22 µl HBTO (100 mg/ml in DMF) und 19 µl N-Hydroxysuccinimid (100 mg/ml in DMF) zugegeben. Nach einer 16stündigen Inkubation bei RT wurde PdcP-2-NHS (7,1 mM in DMF) bei -20°C gelagert.

12.2 Präparation von Avidin-PdcP-Konjugaten

[0105] 2,5 mg Avidin-D wurde als eine Lösung von 1 mg/ml in 1 × NHS-Puffer (15 µM) markiert. PdcP-2-NHS wurde entweder zu einer Konzentration von 45 oder 90 µM (3- und 6facher Überschuss) zugegeben und wurde für 4 Stunden auf Eis umgesetzt. Eine Reinigung wurde durch eine Standard-Gelfiltration durchgeführt. Gefärbte Konjugate wurden erhalten. In beiden Fällen wurde ein Teil der PdcP-Markierung als ein Produkt mit geringem Molekulargewicht beibehalten, das folglich nicht mit dem Avidin reagiert hatte. Diese Konjugate wurden bei -20°C gelagert als ± 0,75 mg/ml in PBSE. Zweitens wurde 0,5 mg Avidin-D als eine 1 mg/ml-Lösung in 1 × NHS-Puffer (15 µM) markiert. PdcP-2-NHS wurde entweder zu einer Konzentration von 150, 525 oder 750 µM (10, 35 und 50facher Überschuss) zugegeben und für eine 1 h bei 30°C umgesetzt. Eine Reinigung wurde durch eine Standard-Gelfiltration durchgeführt. Intensiver gefärbtes Avidin wurde erhalten. Die Intensität der Markierung nahm mit dem Überschuss an PdcP-2-NHS zu. Diese Konjugate wurden bei -20°C gelagert als ± 0,3 mg/ml in PBSE.

[0106] Aus allen Konjugaten wurde die optimale Verdünnung durch Auftropfen von Verdünnungsreihen von biotinylierten BSA (angefangen mit 1 µl einer Lösung mit 0,5 µg/µl auf Blots bestimmt. Nach 30 min in TNB wurden die Nitrocellulose-Blots mit verschiedenen Verdünnungen des PdcP-markierten Avidins in TNB inkubiert, wobei verschiedene Verdünnungen von Avidin-PdcP A.05 als eine Kontrolle verwendet wurden. Nach 3 × 5 min Waschen in TNT wurden die Blots mit Ziege-Anti-Avidin-D-Alkalische-Phosphatase- (AP) Konjugat (Vector, 1 : 1500 in TNB verdünnt) inkubiert. Nach 3 × 5 min Waschen in TNT und einer kurzen Spülung in bidestilliertem Wasser wurden die Filter in NBT/BCIP (Rockland) inkubiert.

Avidin-PdcP	3facher Überschuss	1:250	-----> 1:50 für IHC/ISH
"	6facher Überschuss	1:150	-----> 1:30 für IHC/ISH
"	10facher Überschuss	1:80	-----> 1:15 für IHC/ISH
"	35facher Überschuss	1:80	-----> 1:15 für IHC/ISH
"	50facher Überschuss	1:50	-----> 1:10 für IHC/ISH

12 3 Biotin-Tyramid-basierte IHC und ISH mit PdcP-markiertem Avidin-D

[0107] Die Avidin-PdcP-Konjugate wurden in 2 Assays mit Proben getestet, die in Vectashield® eingebettet waren. Einer war der Nachweis von 28S rRNA in Hela-Zellen. Eine doppelte Hybridisierung mit p1-Rhodamin, und 28S-DIG wurde durchgeführt. Unter Verwendung des zeitaufgelösten DM-Mikroskops in Kombination mit der CCD-Kamera und einer kontinuierlichen violetten Anregung wurden sowohl die p1-Signale in den Nuclei als auch die PdcP-Signale (28S rRNA) in den Nuclei und im Zytoplasma beobachtet. Dies zeigt, dass die Verringerung der (Auto)Fluoreszenz durch Verwendung des Pd-Coproporphyrins als Markierung in Kombination mit dem zeitaufgelösten D,M-Mikroskop völlig ausreichend war.

[0108] Zweitens wurde Vimentin auf Rattenleber-Kryostatschnitten nachgewiesen. Es wurde nur grüne kontinuierliche Anregung verwendet. Alle Avidin-PdcP-Konjugate wurden getestet und Avidin-PtcP wurde als eine positive Kontrolle verwendet. Die besten Ergebnisse wurden mit dem 3fachen und 50fachen Überschuss an Konjugaten erhalten, aber die anderen 3 Konjugate zeigten auch einen spezifischen Nachweis von Vimentin in epithelialen Zellen der Arterien, Venen und Gallengängen. Die Signale wurden mit denen verglichen, die durch Avidin-PtcP erhalten wurden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines aktivierten Metall-Porphyrin-Derivats mit der allgemeinen Formel (n):



worin M Palladium oder Platin ist,

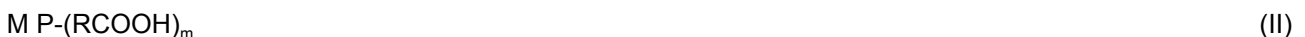
P ein Porphyrin-Anteil ist,

RCOOX eine aktivierte Carbonsäureester-Gruppe ist, die kovalent an den Porphyrin-Anteil gebunden ist,

R jeweils unabhängig bei jedem Vorkommen eine chemische Bindung oder eine Linkergruppe ist und

n von 1 bis 4 ist,

worin ein Metall-Porphyrin mit der allgemeinen Formel (II)



worin M, P und R wie oben definiert sind, und m die Anzahl der Carbonsäuregruppen ist, die kovalent an den Porphyrin-Anteil gebunden sind,

mit einem Carbodiimid, 1-Hydroxybenzothiazol und einem aktiven Ester-Kopplungsmittel, ausgewählt aus N-Hydroxysuccinimid, Thiophenylestern, Arylestern und Vinylestern, in einem organischen Lösungsmittel umgesetzt wird und das resultierende reaktive Metall-Porphyrin-Derivat (I) erhalten wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin R eine chemische Bindung, eine C₁-C₂₀ Alkylengruppe, die Heteroatome enthalten kann, eine Arylengruppe, eine Aralkylengruppe oder eine Alkarylengruppe ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin n von 2 bis 3 ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, worin das Carbodiimid Dicyclohexylcarbodiimid ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, worin das aktive Ester-Kopplungsmittel N-Hydroxysuccinimid ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, worin das Molverhältnis der zu aktivierenden Carbonsäuregruppen (n) zu Carbodiimid zu 1-Hydroxybenzothiazol zum aktiven Ester-Kopplungsmittel etwa 1 : 1 : 1 : 1 ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, worin das organische Lösungsmittel trockenes Dimethylformamid ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, worin das Metall-Porphyrin (II) Pd- oder Pt- 3,8,13,18-Tetramethyl-21 H,23H-porphin-2,7,12,17-tetrapropionsäure ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, worin das Metall-Porphyrin (II) Pd- oder Pt-meso-tetra(4-Carboxyphenyl)porphin ist.
10. Aktiviertes Metall-Porphyrin-Derivat mit der allgemeinen Formel (1):



worin M Palladium oder Platin ist,
P ein Porphyrin-Anteil ist,

RCOOX eine aktivierte Carbonsäureester-Gruppe ist, die kovalent an den Porphyrin-Anteil gebunden ist, wobei die aktivierte Carbonsäureester-Gruppe das Reaktionsprodukt einer Carbonsäuregruppe und eines aktiven Ester-Kopplungsmittels, ausgewählt aus N-Hydroxysuccinimid, Thiophenylestern, Arylestern und Vinylestern ist, R eine chemische Bindung oder eine Linkergruppe ist und n von 1 bis 4 ist.

11. Aktiviertes Metall-Porphyrin-Derivat nach Anspruch 10, worin n 2 oder 3 ist.
12. Verfahren zur Herstellung eines Metall-Porphyrin-Konjugats, worin das aktivierte Metall-Porphyrin nach Anspruch 10 oder 11 an ein Molekül gekoppelt ist, das mindestens eine primäre Aminogruppe besitzt, worin mindestens eine Bindung zwischen einer aktivierten Carbonsäureester-Gruppe und einer primären Aminogruppe gebildet wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, worin das Molekül, das mindestens eine primäre Aminogruppe besitzt, ein Biomolekül ist.
14. Verfahren nach Anspruch 13, worin das Biomolekül ausgewählt wird aus der Gruppe umfassend Biogene Amine, Hormone, Vitamine, Metaboliten, Nukleoside, Nukleotide, Oligonukleotide, Nukleinsäuren, Peptide, Polypeptide, Glycoproteine, Saccharide, Lipide, zelluläre und virale Bestandteile, Zellen und Viren.
15. Verfahren nach Anspruch 14, worin das Biomolekül ausgewählt wird aus der Gruppe umfassend Tyramin, Allylamin-modifizierte Nukleotide, Immunglobuline, Immunglobulinfragmente und Avidin.
16. Verfahren nach Anspruch 12, worin das Molekül, das mindestens eine primäre Aminogruppe besitzt, ein Polymer ist.
17. Metall-Porphyrin-Konjugat, worin ein Metall-Porphyrin-Derivat (1) über mindestens eine seiner aktivierten Carbonsäureester-Gruppen an ein Molekül gebunden ist, das mindestens eine primäre Aminogruppe besitzt.

18. Verwendung eines Konjugats nach Anspruch 17 oder erhältlich durch ein , Verfahren nach einem der Ansprüche 12–16 in einem Nachweisverfahren.
19. Verwendung nach Anspruch 18, worin das Verfahren einen Nachweis des Konjugats durch Phosphoreszenz umfasst.
20. Verwendung nach Anspruch 18 oder 19, worin der Nachweis eine zeitaufgelöste Messung umfasst.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 20, worin das Verfahren einen Immunoassay umfasst.
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 20, worin das Verfahren einen Nukleinsäure-Hybridisierungsassay umfasst.
23. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 22, worin das Verfahren eine in situ- und/oder in vitro-Messung in einer autofluoreszierenden Umgebung umfasst.
24. Verwendung nach Anspruch 23, worin das Verfahren eine immunochemische Messung in situ, eine immunozytochemische Messung in situ oder eine Hybridisierungsmessung in situ umfasst.
25. Verwendung nach Anspruch 24, worin der Nachweis mittels eines Mikroskops durchgeführt wird.
26. Verwendung nach Anspruch 23, worin der Nachweis mittels einer autofluoreszierenden Membran durchgeführt wird.
27. Verwendung nach Anspruch 23, worin das Verfahren eine FACS-Analyse ist.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, worin das Verfahren eine Sauerstoffmessung umfasst.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

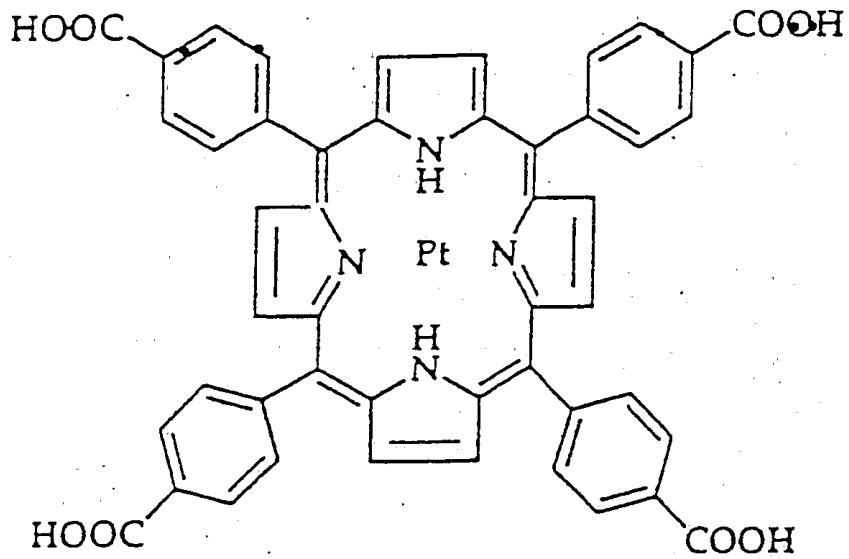
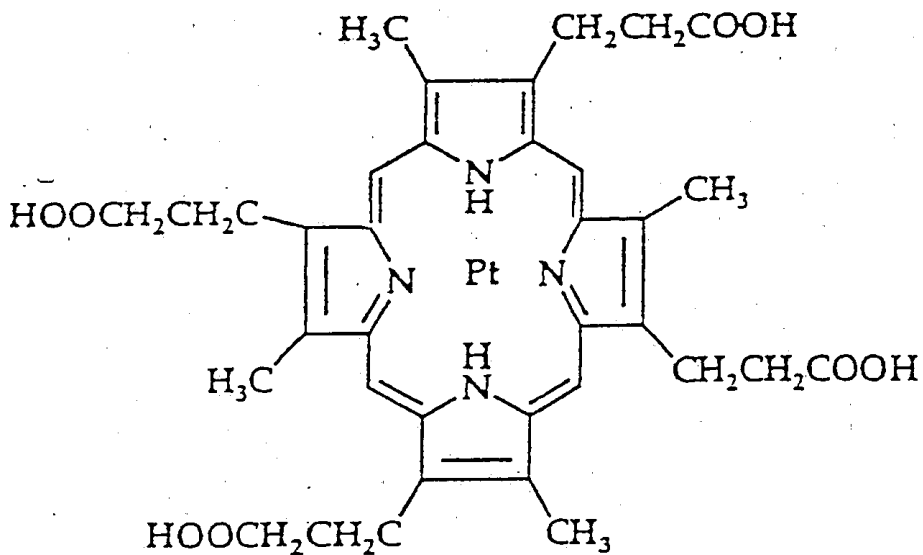


Fig. 2

Pt-*meso*-tetra(4-carboxyphenyl) Porphin

Anregung: 400 nm, 514 nm
Emission: 670 nm



Pt-

3,8,13,18-Tetramethyl-21H,23H-Porphin
2,7,12,17-Tetrapropionsäure

Fig. 1

Anregung: 380 nm, 496 nm, 530 nm
Emission: 650 nm

Fig. 3

