

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 922587 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 922587

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07D209/12
C07D277/64
C12Q 1/58
G01N 33/52

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 04.06.1992

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 04.06.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 07.12.1992

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

06.06.1991 US 710955

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Bayer Corporation, One Mellon Center, 500 Grant Street, Pittsburgh, PA 15219-2502, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Corey, Paul F., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Proteiinivirheen merosyaniini-indikaattorit

Merocyaninindikatorer för proteinfel

Proteiinivirheen merosyaniini-indikaattorit

Tämän keksinnön kohteena on yleisesti proteiinin havaitseminen; ja erityisesti uusi luokka proteiini-virheen indikaattoreita.

Proteiinin havaitseminen on tärkeää taudin määrittäyksessä, lääketieteellisessä tutkimuksessa ja teollisuudessa. On olemassa monia menetelmiä proteiinin havaitsemiseksi näytteessä. Lukuunottamatta menetelmiä, joissa käytetään proteiinivirheen indikaattoreita, kaikki proteiinin havaitsemismenetelmät ovat monivaiheprosesseja, jotka usein vaativat hyvin monimutkaista laitteistoa ja useita tunteja prosessin loppuunviemiseksi.

Eräs tavallisesti käytetty menetelmä proteiinin määrittämiseksi näytteessä on Biuret menetelmä. Tämän menetelmän mukaisesti näyte tehdään ensin happamaksi saostamaan mikä tahansa proteiini näytteessä. Saostunut proteiini liuotetaan sitten uudestaan kohtalaisen emäksisessä väliaineessa ja käsitellään liuoksella, joka sisältää kupari-ioneja. Proteiinin peptidisidokset ja kupari-ioni reagoivat muodostaen värjäytyneen kelaatin. Käsitellyn liuoksen absorbanssi määritetään sitten käyttäen spektrofotometriä. Tästä tuloksesta arvioidaan proteiinin määrä näytteessä käyttäen kalibroituja spektrofotometrisiä absorbanssikäyriä. Tämä menetelmä kestää tavallisesti 1 - 3 tuntia.

Biuret menetelmän variaatio on Lowry menetelmä. Lowryn menetelmän mukaisesti, sen jälkeen kun saostunut proteiini on liuotettu uudestaan, lisätään fosfovolframi-molybdeenihappo reagenssia liuokseen emäksisissä olosuhteissa hapettamaan mitkä tahansa fenolihdisteet liuoksessa. Lähestulkoon kaikki proteiinit sisältävät hiukan fenolihdisteitä, esim. tyrosiini, tässä menetelmässä kyetään määrittämään proteiini näytteessä. Käsitellyn liuoksen absorbanssi määritetään sitten spektrofotometrisesti. Ka-

libroituja spektrofotometrisiä käyriä käyttäen mitattua absorbanssia käytetään sitten proteiinin määrän arvioimiseksi näytteessä. Kuitenkin monet puskurit ja muut yhdisteet, jotka sisältävät amiiniryhmiä, esim. tris-, glysiini- ja amidipuskurit, haittaavat koetta.

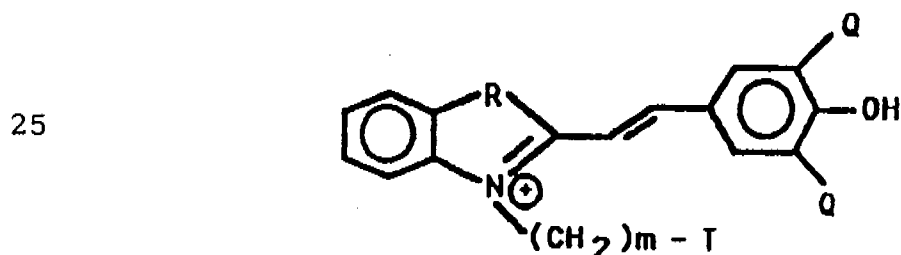
Toinen menetelmä, jota käytetään proteiinin läsnäolon määrittämiseksi näytteessä, on sameuden määrittäminen näytteen happamoinnin jälkeen. Menetelmän mukaisesti näytteen sameus määritetään käyttäen spektrofotometriä proteiinia saostavan aineen, tavallisesti hapettavan aineen, lisäämisen jälkeen näytteeseen. Näytteen laskettua sameutta verrataan spektrofotometrisiin standardikäyriin proteiinin läsnäolon määrittämiseksi näytteessä. Tavallisia saostusaineita, joita käytetään tässä menetelmässä, ovat sulfosalisyylihappo, trikloorietikkahappo ja parkkihappo.

Menetelmät, joissa käytetään proteiinivirheen indikaattoreita, ovat laajalti käytettyjä proteiinin läsnäolon määrittämiseksi näytteessä. Menetelmät, joissa käytetään proteiinivirheen indikaattoreita, ovat halpoja, nopeita, yksinkertaisia ja helppoja. Fenolisulfoninaftaleiiniyhdisteet, kuten bromifenoli sininen, bromikresoli vihreä ovat ehkä laajimmin käytettyjä proteiinivirheen indikaattoreita. Menetelmät, joissa käytetään proteiinivirheen indikaattoreita, käsittävät usein reagenssiliuskoja, jotka impregnoidaan proteiinivirheen indikaattorilla. Näiden menetelmien mukaisesti reagenssikoeliuska saatetaan kosketukseen pienen määrän kanssa näytettä. Mikäli proteiinia on läsnä näytteessä, koeliuska ilmoittaa tästä yksinkertaisesti muuttamalla väriä. Havaittu väri voi vaihdella riippuen proteiinin pitoisuudesta näytteessä. Tätä vaihtelevaa värinmuutosta käytetään proteiinin määrän määrittämiseksi näytteessä. Edeltävänkaltaiset reagenssiliuskat vaativat minimiharjoittelun oikeaoppiselle käytölle. Nämä reagenssikoeliuskat mahdollistavat tarkan, helpon ja nopean keinon proteiinin määrittämiseksi paikanpäällä. Täl-

laisia koepapereita käyttävät laajalti teknikat teollisuudessa, tutkimuksessa ja kliinisissä laboratorioissa.

Yksityiskohtaisemmin, proteiinivirheen indikaattorit ovat pH-indikaattoreita, jotka sisältävät ionisoituvan ryhmän, jolla on pKa-arvo, joka korvautuu proteiinin läsnäollessa. Fenolisulfoniftaleiinien tapauksessa ionisoitava ryhmä on fenolihydroksyyli. Protonin vapautuminen fenolin hydroksyylistä aiheuttaa havaittavan värinmuutoksen, joka kertoo proteiinin läsnä olosta testattavassa näytteessä. Proteiinivirheen indikaattoreita, joita tavallisesti pidetään hyödyllisinä proteiinin analyttisessä määrittämisessä näytteessä, on kuvattu US-patentissa nro 4 013 416.

Tämän keksinnön kohteena on proteiinivirheen merosyaniini-indikaattori. Proteiinivirheen merosyaniini-indikaattorit ovat proteiini-virheen indikaattoreiden uusi luokka. Ennen tätä keksintöä merosyaniiniväriaineet olivat tuntemattomia proteiini-virheen indikaattoreina. Proteiinivirheen merosyaniini-indikaattorit ovat hyödyllisiä proteiinin havaitsemiseksi. Proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoreita ovat:



30 Q on -Cl, -Br tai -I;

m on kokonaisluku 1 - 6;

R on S, Se, O tai $C(C_nH_{2n+1})_2$, jossa n on kokonaisluku 1 - 6; ja T on $-SO_3\theta$ tai -H. Yhdenmukaisesti keksinnön erään suoritusmuodon kanssa m on 3 tai 4; R on $C(CH_3)_2$; ja

35 T on $-SO_3\theta$.

Toisena ja tärkeänä tämän keksinnön kohteena on analyyttinen reagenssiliuska, joka sisältää proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoria proteiinin havaitsemiseksi nestemäisissä näytteissä.

5 Vielä yhtenä tämän keksinnön kohteena on menetelmä proteiinin havaitsemiseksi nestemäisessä näytteessä. Menetelmä käsittää analyyttisen reagenssiliuskan kostuttamisvaiheen nestemäisellä näytteellä. Koeliuska koostuu absorboivasta kantoaineesta, joka on impregnoitu vähintään yhdellä edellä kuvatulla proteiinivirheen merosyaniini-indikaattorilla. Koeliuskaa tarkkaillaan sitten minkä tahansa värimuutoksen havaitsemiseksi. Värimuutos osoittaa proteiinin läsnäolon nestemäisessä näytteessä.

15 Kuvio 1 on kaavamainen kuvaus proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoreiden synteisistä;

 kuvio 2 kuvaa käyrää, jossa tutkitaan albumiinin vaikutusta analyyttiseen koeliuskaan, joka on impregnoitu 0,3 mM SPDIB:lla (1-(~~w~~-sulfopropyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini) pH:ssa 2,5.

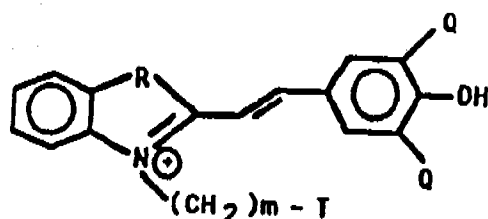
20 Tämän keksinnön kohteena on yhdisteiden uuden luokan keksiminen, jotka ovat hyödyllisiä proteiinivirheen indikaattoreina. Yhden tämän keksinnön kohteen mukaisesti on havaittu, että keksinnön merosyaniiniyhdisteet reagoivat proteiinin kanssa aiheuttaen havaittavan värimuutoksen merosyaniiniyhdisteessä. Toisen tämän keksinnön kohteen mukaisesti on havaittu, että analyttiset reagenssiliuskat proteiinin määrittämiseksi nesteissä, voidaan saada impregnoimalla absorboiva paperikoeliuska uusilla tämän keksinnön proteiinivirheen indikaattoreilla. Vielä yhden tämän keksinnön kohteen mukaisesti on havaittu, että tämän keksinnön uudet proteiinivirheen indikaattorit ovat hyödyllisiä vesipitoisissa nestekokeissa. Tämä on erityisen hyödyllistä, koska aikaisemman alan proteiinivirheen indikaattorit, kuten bromifenoli sininen, tarvitsevat orgaa-

5 nisia liuottimia, jotka voivat haitallisesti reagoida testattavan näytteen proteiinin kanssa. Keksinnön mukaisilla proteiinivirheen indikaattoreilla on myös pKa-arvot 3,5:n yläpuolella. Tämä on edullista, koska laajaa valikoimaa puskureita voidaan käyttää neste- tai mittatikkureagenssien konstruoinnissa.

10 Seuraavassa kuvatut uudet proteiinivirheen indikaattorit ovat oranssinvärisiä ja kosketuksessa näytteen kanssa, joka sisältää proteiinia, muuttuvat väriltään voimakkaan vaaleanpunaisiksi. Värin voimakkuus kuvaa proteiinin pitoisuutta näytteessä. Muodostunut vaaleanpunainen väri poikkeaa selvästi negatiivisen testin oranssista väristä. Keksinnön mukaisten proteiinivirheen indikaattoreiden havaitsevuusalue on edullisesti n. 15 - 500 mg/dl proteiinia näytteessä.

20 Viitaten havaittavaan värimuutokseen oranssista vaaleanpunaiseksi, tämän keksinnön mukaisesti valmistetut koeliuskat ovat diagnostinen apu proteiinin havaitsemiseksi biologisissa nesteissä, muodostaen selvästi erilaisen värin proteiinin läsnä ollessa, joka on selvästi erotettavissa negatiivisen kokeen oranssista väristä. Tämä poikkeaa muista koeliuskoista, jotka muuttuvat hieman yhdestä värisävyistä toiseen albumiinin läsnäollessa, esim. keltaisesta kellanvihreäksi. Negatiivisen testin tunnusomainen 25 oranssin väri ja positiivisen testin tunnusomainen vaaleanpunainen väri nähdään huomattavana erona verrattuna edeltäviin menetelmiin ja indikaattoreihin, joita on käytetty proteiinien havaitsemiseksi nestemäisissä näytteissä. Spesifisemmin, keksintö tarjoaa lääkäreille luotettavamman menetelmän proteiinin havaitsemiseksi näytteessä. 30 Muutos oranssista vaaleanpunaiseksi helpottaa tuloksien tulkintaa. Tämä johtaa pienempään määrään tulkintavirheitä ja tästä johtuen alhaisempiin kustannuksiin käyttäjälle.

35 Tämän keksinnön proteiinivirheen merosyaniini-indikaattori on yhdiste:



5

jossa: Q on -Cl, -Br tai -I; m on kokonaisluku 1 -
 10 6; R on S, O, Se tai $C(C_nH_{2n+1})_2$, jossa n on kokonaisluku
 1 - 6; ja

jossa T on $-SO_3\theta$ tai -H. Edullisemmin, Q on -Br tai
 -I; m on kokonaisluku 2 - 4; R on $C(CH_3)_2$; ja T on $-SO_3\theta$.

Edullisimmin, Q on -I; ja m on 3.

15 On ymmärrettävä, että tämä keksintö kuvaa mero-
 syaniiniluokan väriaineiden käyttöä proteiinivirheen in-
 dikaattoreina ensimmäistä kertaa ja, tämänmukaisesti, kä-
 sittää suuren määrän substituoituja johdannaisia. On il-
 meistä, että kaavan aromaattiset renkaat voivat sisältää
 20 monia substituenttiryhmiä poikkeamatta tämän keksinnön
 piiristä. Näiden substituenttiryhmien määrää rajoittaa
 ainoastaan alaan perehtyneen kyky valmistaa stabiileja
 yhdisteitä, joilla on tämän keksinnön proteiinivirheen
 indikaattoriominaisuuksia, ja tällaisiin ryhmiin kuuluvat
 25 substituoimaton ja substituoitu alkyyli, substituoimaton
 ja substituoitu aryyli, alkoksi, aryylioksi, halogeeni
 (esim. fluori, kloori, bromi), nitro ja substituoitu ami-
 no, kuten dialkyyliamino.

Tämän keksinnön yhteydessä "alkyyli" esittää subs-
 30 tituoimattomien hiilivetyjäännösten haarautumattomia ja
 haarautuneita muotoja, joilla on yleinen kaava $-C_nH_{2n+1}$,
 edullisesti "alempi alkyyli" alifaattisia, joissa n on 6
 tai vähemmän, kuten metyyliä, etyyliä, n-propyyliä, iso-
 propyyliä, n-butyliä, iso-butyliä, tert-butyliä, n-

heksyyliä ja vastaavia, kuten myös niiden substituoituja muotoja.

Edelleen, tämän keksinnön yhteydessä "aryyli" käsittää orgaaniset jäännökset, jotka on saatu aromaattisesta hiilivetyrenkaasta tai rengasjärjestelmästä poistamalla vetyatomi, ja käsittävät substituoimattomat hiilivetyrengasjäännökset, kuten fenyylin ja naftyylin, ja niiden substituoitua muotoja. Tätä keksintöä varten, aryylijäännöksiä ovat ne yhdisteet, joissa on yksi tai useampi sama tai erilainen funktionaalinen ryhmä tai substituentti, jonka alaan perehtynyt voi valita antamaan tämän keksinnön proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoriyhdisteitä.

Yksityiskohtaisemmin, missä "aryyli" ja "alkyyli" ovat substituoituja, tällaisen substituoinnin on tarkoitettu käsittävän sellaiset ryhmät tai substituentit, kuten mono- tai polysubstituoitua funktionaalisilla ryhmillä, jotka eivät olennaisesti poikkea näiden yhdisteiden hyödyllisistä ominaisuuksista. Tällaisia funktionaalisia ryhmiä ovat kemialliset ryhmät, jotka voidaan lisätä synteettisesti ja aikaansaavat tämän keksinnön stabiileja ja hyödyllisiä proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoriyhdisteitä. Esimerkkejä tällaisista funktionaalisista ryhmistä ovat, mutta eivät rajoitu näihin, halogeeni (esim. fluori, kloori, bromi), substituoitu amino, kuten dialkyyliamino, nitro, alkoksi, aryylioksi, alkyyli ja aryyli.

Keksinnön edustavia proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoreita ovat: 1-(ω -sulfopropyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dibromistyyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini; 1-($\omega\omega$ -sulfobutyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryyli)-bentsotiatsolium betaiini; 1-(ω -sulfoetyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini; 1-(ω -sulfopropyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini; 1-(ω -sulfobutyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini ja 1-(n-butyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-di-

jodistyräyli)-3,3-dimetyyli-indolinium jodidi. Yksityiskohtaiset kuvaukset edellä lueteltujen proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoreiden valmistamisesta on esitetty seuraavissa esimerkeissä.

5 Kuvio 1 kuvaa monien tämän keksinnön proteiinin merosyaniini-indikaattoriyhdisteiden valmistusta. Kemia on yksinkertaista ja käsittää tavallisesti aromaattisen hydroksialdehydin kytkemisen heterosyklisen kvaternaarisen suolan kanssa emäksisissä reaktio-olosuhteissa. Keksinnön
10 proteiinivirheen merosyaniini-indikaattorit ovat vesiliu-koisia. Tämä on etu, koska näitä indikaattoreita voidaan lisätä suoraan vesipitoisiin järjestelmiin proteiinin havaitsemiseksi, esim. virtsan, veren, veriseerumin, vesipitoisten geelien (elektroforeettisten geelien), vesipi-
15 toisiin liuoksiin. Yleiset menetelmät proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoreiden valmistamiseksi on esitetty kuviossa 1 ja niitä on käsitelty yksityiskohtaisemmin seuraavissa esimerkeissä.

Yhtenä tämän keksinnön kohteena on analyysikoelious-
20 ka proteiinin havaitsemiseksi nestemäisessä näytteessä tai geelissä, joka liuska sisältää absorboivaa kantoainetta, joka on impregnoitu jollakin edellä kuvatuista proteiini-
virheen merosyaniini-indikaattoriyhdisteistä. Koeliuskan absorboiva kantoaine on edullisesti suodatinpaperi. Muita
25 aineita, jotka ovat käyttökelpoisia absorboivana kantoaineena, ovat huopa, huokoiset keraamiset liuskat ja kudotut tai takkuiset lasikuidut, joita on kuvattu US-patentissa
nro 3 846 247. Hyväksyttävää on myös villan, kankaan, imevän materiaalin ja hienokiteisten aineiden käyttö, mitä on
30 kuvattu US-patentissa nro 3 552 928. Vaihtoehtoisesti absorboiva kantoaine voi olla ei-huokoinen, kuten erilaiset polymeeriset kalvot, lasi ja vastaavat. Kaikki tällaiset
absorboivat kantoaineet ovat soveltuvia tämän keksinnön käyttöä varten, kuten muutkin. Kuitenkin on havaittu, että
35 suodatinpaperi on erityisen sopiva.

Absorboiva liuska on edullisesti impregnoitu pusku-
 rilla. Mikä tahansa puskurijärjestelmä, jonka pH voidaan
 säätää alueelle n. 1,5 - 4,5, on hyödyllinen tämän keksin-
 nön käytössä. Edullisesti puskurijärjestelmän pH on
 5 säädetty alueelle 2,0 - 4,0 ja on edullisimmin n. 3,5.
 Menetelmän mukaisesti analyysikoeliuska saatetaan koske-
 tukseen nestemäisen näytteen tai geelinäytteen kanssa.
 Liuskaa tarkastellaan sitten värin muutoksen havaitsemi-
 seksi. Värimuutos kuvaa proteiinin läsnäoloa näytteessä.

10 Seuraavat esimerkit on esitetty kuvaamaan tämän
 keksinnön edullisia suoritusmuotoja ja käyttötarkoituksia
 eikä niiden tarkoituksena ole rajoittaa tätä keksintöä,
 ellei toisin ilmoiteta liitetyissä patenttivaatimuksissa.

Esimerkit

15 Esimerkki 1

1-(ω -sulfopropyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dibromi-
 styryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini

Liuos, jossa oli 3,5-dibromi-4-hydroksibentsaldehydiä (Lancaster Synthesis, Ltd., Windham, NH USA) (2,0 g,
 20 7,14 mmoolia), 1-(ω -sulfopropyyli)-2,3,3-trimetyyli-indo-
 linium betaiinia (Belg. 726 639; CA 73: P82538a) (2,0 g,
 7,11 mmoolia) ja piperidiiniä (0,4 ml) EtOH:ssa (30 ml),
 pidettiin inertin kaasun ilmakehässä. Liuosta palautus-
 jäähdytettiin 50 minuuttia ja jäähdytettiin jäähähteessä.
 25 Reaktioseos haihdutettiin kuiviin tyhjöissä ja otettiin
 talteen minimimäärään metanolia (MeOH). Tämän jälkeen liu-
 os kromatografoitiin silikageelillä (600 g) käyttäen
 MeOH/CHCl₃ (1 : 4 tilav./tilav.) eluenttina. Jakeet, jotka
 sisälsivät purppuranpunaista pääyhdistettä, yhdistettiin
 30 ja tehtiin happamaksi ylimäärällä HCl 2-propanolissa
 (iPrOH) aikaansaamaan värimuutos purppuranpunaista kul-
 lankeltaiseksi. Liuos haihdutettiin kuiviin tyhjöissä.
 Jäännös otettiin talteen kuumaan EtOH:hon (n. 25 ml) ja
 kiteytettiin jäähdyttäen. Erotetut kiinteät aineet kerät-
 35 tiin suodattamalla, pestiin jääkylmällä EtOH/heksaanilla

(3 : 1 tilav./tilav.) ja kuivattiin tyhjöissä antamaan analyttisesti puhdas yhdiste 1-(-sulfopropyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dibromistyyryli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini (0,96 g, 25 %) kullankeltaisina kiteinä. Yhdisteellä ei ollut selvää sulamispistettä, mutta tummeni lämpötiloissa yli 200 °C. Edellä kuvattu menetelmä yhdisteen valmistamiseksi on yleisesti kuvattu reaktiona A kuviossa 1. Spektroskooppiset tiedot yhdisteen tunnistamiseksi on esitetty seuraavassa taulukossa 1.

10

Taulukko 1

	IR (KBr) cm^{-1} 3438, 3055, 1606, 1577, 1519, 1475, 1406, 1372, 1305, 1277, 1212, 1173, 1124, 739
15	^1H NMR (DMSO- d_6) δ 8,58 (s, 2H), 8,29 (d, $J=16,0$ Hz, 1H), 7,97 (d, $J=7,7$ Hz, 1H), 7,84 (d tai d, $J_1=2,0$ Hz ja $J_2=6,6$ Hz, 1H), 7,67 (d, $J=16$ Hz, 1H), 7,54 - 7,64 (m, 2H), 4,81 (t, $J=7,6$ Hz, 2H), 3,77 (v. br. s, 1H), 2,63 (t, $J=6,6$ Hz, 2H), 2,10 - 2,22 (m, 2H) 1,76 (s, 6H)
20	^{13}C NMR (DMSO- d_6)ppm 181,6, 155,6, 153,3, 143,8, 140,9, 135,1, 129,2, 129,1, 128,7, 123,0, 115,2, 112,5, 111,6, 52,2, 47,3, 45,5, 25,6, 24,8,
25	Analyysi: Laskettu $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{Br}_2\text{NO}_4\text{S} \cdot \frac{1}{2}\text{EtOH}$:lle: C 46,65; H 4,27; N 2,47 Havaittu: C 46,48; H 4,50; N 2,33.

Esimerkki 2

30

1-(ω -sulfobutyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryli)bentsotiatsolium betaiini

Seos, jossa oli 3,5-dijodi-4-hydroksibentsaldehydiä (Lancaster Syntheses, Ltd., Windham, NH, USA) (3,74 g, 10 mmoolia), 3-(ω -sulfobutyyli)-2-metyylibentsotiatsolium betaiinia (Brit. 742, 112; CA 50: P11149c) (3,71 g, 13

35

mmoolia) ja piperidiiniä (0,8 ml) EtOH:ssa (30 ml), pidettiin inertin kaasun ilmakehässä. Liuosta palautusjäähdytettiin yksi tunti ja jäähdytettiin sitten ympäristön lämpötilaan. Reaktioseos tehtiin happamaksi riittävällä määrällä 1,93 M vetykloridihappoa i-PrOH:ssa aiheuttamaan värimuutos purppurasta keltaiseksi, samalla kun kiinteät aineet erottuivat liuoksesta. Kiinteät aineet kerättiin suodattamalla, pestiin EtOH:lla ja kuivattiin. Sitten kiinteät aineet liuotettiin lämpimään (55 °C) EtOH/MeOH/H₂O:hon (3:2:1 tilav./tilav./tilav.) (300 ml), joka sisälsi 2 M vesipitoista natriumhydroksidia (5,2 ml), suodatettiin piimaan läpi (Johns-Manville Corp., Denver, CO USA) ja saostettiin lisäämällä 3 M vesipitoista vetykloridihappoa (6 ml). Jäähdyttämisen jälkeen jäähauteessa kiinteät aineet kerättiin suodattamalla, pestiin EtOH:lla ja kuivattiin tyhjiössä. Sitten kiinteitä aineita kiehutettiin etikkahapossa (HOAc) (600 ml), suodatettiin ja kuivattiin tyhjiössä 115 °C:ssa antamaan analyttisesti puhdas yhdiste 1-(~~6~~-sulfobutyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryyli)bentsotiatsolium betaiini (5,10 g, 79 %) keltaisena jauheena. Edellä kuvattua menetelmää yhdisteen valmistamiseksi on yleisesti kuvattu reaktiona B kuviossa 1. Spektroskooppiset tulokset yhdisteen tunnistamiseksi on esitetty seuraavassa taulukossa 2.

25

Taulukko 2

IR (KBr) cm ⁻¹	3436, 1608, 1572, 1529, 1497, 1458, 1396, 1318, 1267, 1208, 1038
¹ H-NMR (DMSO-d ⁶)δ	8,55 (s, 1H), 8,30 - 8,50 (m, 3H), 7,92 - 8,16 (m, 3H), 7,73 - 7,88 (m, 2h), 4,95 (br, t, J=7,5 Hz, 2H), 2,53 (t, J=7,1 Hz, 2H), 1,98 (br, m, 2H), 1,81 (q, J=7,0 Hz, 2H)
¹³ C-NMR (DMSO-d ⁶)ppm	171,4, 159,1, 148,1, 146,1, 141,0, 140,6, 131,5, 129,2, 128,0, 123,9,

35

116,7, 112,2, 86,4, 50,0, 48,8, 27,2,
21,9

Analyysi laskettu $C_{19}H_{17}I_2NS_2O_4$:lle

C 35,58; H 2,67; N 2,18

5 Havaittu: C 35,52; H 2,75; N 2,06.

Esimerkki 3

1-(ω -sulfoetyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini

10 Seos, jossa oli 3,5-dijodi-4-hydroksi-bentsaldehydiä (3,73 g, 10 mmoolia), 1-(ω -sulfoetyyli)-2,3,3-trimetyyli-indolinium bromidia (US 2 503 776; CA 44: P5738i) (6,61 g; 19 mmoolia) ja piperidiiniä (2,0 ml) EtOH/MeOH:ssa (2 : 1 tilav./tilav.) (60 ml), pidettiin inertin
15 kaasun ilmakehässä. Liuosta palautusjäähdytettiin neljä tuntia, jäähdytettiin ympäristön lämpötilaan ja haihdutettiin kuiviin tyhjöissä jättämään ruskea jäännös. Ruskea jäännös otettiin talteen MeOH:hon (2 - 3 ml). Tätä liuosta käsiteltiin trietyyliamiinilla (NEt_3) (2 ml) ja kromatografoitiin silikageelillä käyttäen MeOH/ $CHCl_3$ (1:4 tilav./tilav.) eluenttina. Jakeet, jotka sisälsivät purppuranväristä tuotetta, yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin tyhjöissä. Tämä raaka tuote otettiin talteen EtOH:hon (10 ml),
20 tehtiin happamaksi riittävällä määrällä 1,93 M HCl iPrOH:ssa aiheuttamaan värimuutos purppurasta keltaiseksi. Tämä liuos haihdutettiin kuiviin. Jäännös otettiin talteen EtOH/heksaaniin (3:1 tilav./tilav.) ja jäähdytettiin uudestaan, kunnes liuos kiteytyi. Erotetut kiteiset aineet kerättiin suodattamalla. Kiinteät aineet pestiin jääkylmällä EtOH:lla ja sitten EtOH/heksaanilla. Jäljellejääneet
30 kiinteät aineet kuivattiin tyhjöissä antamaan yhdiste 1-(ω -sulfoetyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini (0,80 g; 12,8 %). Uudelleenkiteyttäminen EtOH/HOAc:sta antoi analyttisesti puhtaan
35 yhdisteen tummana punertavanruskeana jauheena. Edellä ku-

vattua menetelmää yhdisteen valmistamiseksi on yleisesti kuvattu reaktiona C kuvassa 1. Spektroskooppiset tulokset yhdisteen tunnistamiseksi on esitetty seuraavassa taulukossa 3.

5

Taulukko 3

IR (KBr) cm^{-1}	3444, 2992, 1608, 1574, 1530, 1469, 1399, 1371, 1327, 1296, 1282, 1230, 1212, 1178, 1141, 1086, 1033, 964
10 ^1H -NMR (DMSO- d^6) δ	8,58 (s, 2H), 8,18 (d, $J=16,3$ Hz, 1H), 7,69 - 7,88 (m, 4H), 7,51 - 7,62 (m, 2H), 4,82 (t, $J=5,7$ Hz, 2H), 3,04 (t, $J=6,1$ Hz, 2H), 1,73 (s, 6H;
^{13}C NMR (DMSO- d^6)ppm	182,4, 160,0, 149,1, 143,6, 141,4, 140,7, 130,5, 128,8, 122,8, 115,1, 112,9, 87,3, 52,0, 47,7, 43,7, 25,4
15	Analyysi laskettu $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{I}_2\text{NO}_4\text{S} \cdot \frac{1}{2}\text{EtOH}$:lle
	C 39,02; H 3,43; N 2,16
	Havaittu: C 39,25; H 3,47; N 2,25.

20

Esimerkki 4

1-(ω -sulfopropyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-di-jodistyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini (SPDIB) Seos, jossa oli 3,5-dijodi-4-hydroksi-bentsaldehydiä (3,73 g, 10 mmoolia), 1-(ω -sulfopropyyli)-2,3,3-trimetyyli-indolinium betaiinia (3,65 g, 13 mmoolia) ja piperidiiniä (0,8 ml) EtOH:ssa (n. 50 ml), pidettiin inertin kaasun ilmakehässä. Liuosta palautusjäähdytettiin 2,75 tuntia ja jäähdytettiin sitten jäähauteessa. Liuos tehtiin happamaksi 1,93 M HCl:llä i-PrOH:ssa (5,0 ml). Tumma ter-
vainen aine erottui ja se kerättiin suodattamalla ja trituroitiin kiehuvalle HOAc:llä. Yhdistetyt trituraatit haihdutettiin kuiviin tyhjöissä, otettiin talteen HOAc:hen (20 ml) ja annettiin kiteytyä. Erotetut kiinteät aineet
kerättiin suodattamalla, pestiin HOAc:llä ja kuivattiin

30

35

tyhjössä antamaan yhdiste 1-(ω -sulfopropyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini (4,37 g, 68 %) oranssinvärisenä jauheena. Yhdiste uudelleenkiteytettiin HOAc:stä antamaan analyyttisesti
 5 puhdas yhdiste. Edellä kuvattu menetelmä yhdisteen valmistamiseksi on yleisesti kuvattu reaktiossa D kuvassa 1. Spektroskooppiset tiedot yhdisteen tunnistamiseksi on esitetty seuraavassa taulukossa 4.

10 **Taulukko 4**

IR (KBr) cm^{-1} 1604, 1572, 1526, 1468, 1402, 1376, 1274, 1214, 1173, 766, 722

^1H NMR (DMSO-d_6) δ 8,71 (s, 2H), 8,21 (d, $J=15,5$ Hz, 1H),
 15 7,92 (d, $J=7,2$ Hz, 1H), 7,81 (d, $J=6,6$ Hz, 1H), 7,50 - 7,65 (m, 3H), 4,72 - 4,82 (v, br, m, 2H), 3,57 (v, br, s, 1H), 2,61 (t, $J=6,5$ Hz, 2H), 2,07 - 2,20 (v, br, m, 2H) 1,76 (s, 6H)

^{13}C NMR (DMSO-d_6)ppm 181,3, 160,6, 151,1, 143,7, 142,0,
 20 140,9, 130,0, 129,1, 122,9, 115,0, 110,7, 87,4, 52,0, 43,7, 45,4, 25,7 24,7

Analyysi laskettu $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{S} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$:lle

C 39,02; H 3,43; N 2,17

25 Havaittu: C 39,01; H 3,46; N 1,94.

Esimerkki 5

1-(ω -sulfobutyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-di-jodistyyryli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini

30 Seos, jossa oli 3,5-dijodi-4-hydroksibentsaldehydiä (1,87 g, 5 mmoolia), 1-(ω -sulfobutyyli)-2,3,3-trimetyyli-indolinium betaiinia (R. B. Mujumdar et al., Cytometry 10, 11 - 9 (1989)) (2,36 g, 8 mmoolia) ja piperidiiniä (0,4 ml) EtOH:ssa (35 ml), pidettiin inertin kaasun ilma-
 35 kehässä. Liuosta palautusjäähdytettiin 2,5 tuntia ja jääh-

dytettiin sitten ympäristön lämpötilaan. Reaktioseos tehtiin happamaksi ylimäärällä 1,93 M HCl i-PrOH:ssa ja haihdutettiin kuiviin tyhjössä jättämään jäännös. Jäännös otettiin talteen EtOH:hon (10 ml). Seistessään jääkaapissa

5 kiinteät aineet erottuivat seoksesta. Kiinteät aineet kerättiin suodattamalla, pestiin jääkylmällä EtOH/heksaanilla (3:1 tilav./tilav.) ja tyhjökuivattiin antamaan oranssinvärinen kiinteä aine (3,36 g). Raaka tuote otettiin talteen kiehuvaan EtOH:hon (n. 30 ml) ja saostettiin uudesta välittömästi. Lisättiin lisää kiehuva EtOH (n. 10 220 ml), mutta kiinteä aine ei liuennot uudelleen. Jäähdyttämisen jälkeen jäissä kiinteät aineet koottiin suodattamalla, pestiin EtOH:lla ja kuivattiin tyhjössä antamaan analyttisesti puhdas yhdiste 1-(ω -sulfobutyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini (1,54 g, 47 %) oranssinvärisenä jauheena. Edellä kuvattua menetelmää yhdisteen valmistamiseksi on yleisesti kuvattu reaktiona E kuviossa 1. Spektroskooppiset tulokset yhdisteen tunnistamiseksi on esitetty seuraavassa taulukossa 5.

20

Taulukko 5

IR (KBr) cm^{-1}	2977, 1605, 1572, 1525, 1469, 1401, 1372, 1308, 1271, 1214, 1182, 1120, 1034, 769, 714
^1H NMR (DMSO- d^6) δ	8,71 (s, 2H), 8,24 (d, $J=16,0$ Hz, 1H), 7,90 - 7,97 (m, 1H), 7,81 - 7,87 (m, 1H), 7,53 - 7,64 (m, 3H), 4,68 (t, $J=7,2$ Hz, 2H), 2,45 - 2,55 (m, 2H), 1,89 - 2,00 (m, 2H), 1,75 - 1,83 (m, 2H), 1,76 (s, 6H)
^{13}C NMR (DMSO- d^6) ppm	181,3, 160,5, 151,1, 143,7, 141,9, 140,8, 130,0, 129,0, 122,9, 115,2, 110,7, 87,3, 52,0, 50,3, 46,2 27,2, 25,8, 22,3

Analyyysi: laskettu $C_{22}H_{23}I_2NO_4S$:lle

C 40,57; H 3,56; N 2,15

Havaittu:

C 40,59; H 3,50; N 1,99.

5 **Esimerkki 6**

1-(n-butylyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyryyli)-
3,3-dimetyyli-indolinium jodidi

Seos, jossa oli 3,5-dijodi-4-hydroksibentsaldehydiä
(3,73 g, 10 mmoolia), 1-(n-butylyli)-2,3,3-trimetyyli-indo-
10 linium jodidia (D. P. Maisuradze et al., Soobschch. Akad.
Nauk Gruz. SSR 50, 77 - 82 (1968); CA 69: 106526r)
(4,46 g, 13 mmoolia) ja piperidiiniä (0,8 ml) EtOH:ssa (40
ml), pidettiin inertin kaasun ilmakehässä. Liuosta palau-
tusjäähdytettiin yksi tunti ja jäähdytettiin ympäristön
15 lämpötilaan. Liuos haihdutettiin kuiviin tyhjöissä jättä-
mään jäännös. Jäännös otettiin talteen EtOH:hon (10 ml) ja
käsiteltiin 1,93 M HCl:llä i-PrOH:ssa (3,0 ml). Liuos
haihdutettiin senjälkeen uudelleen kuiviin tyhjöissä jättä-
mään jäännös. Jäännös otettiin talteen EtOH:hon (4 ml).
20 Liuos jäähdytettiin ja muodostui välittömästi kiteitä.
Erottuneet kiteiset aineet koottiin suodattamalla, pestiin
jääkylmällä EtOH:lla ja kuivattiin tyhjöissä antamaan raaka
1-(n-butylyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyryyli)-3,3-
dimetyyli-indolinium jodidi (4,90 g, 80,7 %). Raaka yhdis-
25 te otettiin talteen kuumaan EtOH:hon (60 ml), suodatettiin
paperin läpi ja väkevöitiin tyhjöissä n. 30 ml:ksi. Liuok-
sen annettiin kiteytyä. Kiteiset kiinteät aineet erotet-
tiin, pestiin ja kuivattiin kuten edellä, antamaan ana-
lyyttisesti puhdas yhdiste 1-(n-butylyli)-2-(4'-hydroksi-
30 3',5'-dijodistyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium jodidi
(3,90 g, 56 %) vaalean oranssinvärisenä jauheena. Edellä
kuvattua menetelmää yhdisteen valmistamiseksi on yleisesti
kuvattu reaktiona F kuviossa 1. Spektroskooppiset tulokset
yhdisteen tunnistamiseksi on esitetty seuraavassa taulu-
35 kossa 6.

Taulukko 6

	IR (KBr) cm^{-1}	3361, 2979, 1605, 1574, 1530, 1463, 1402, 1372, 1320, 1250, 1213, 1198, 1136
5	^1H NMR (DMSO- d^6) δ	8,63 (s, 2H), 8,23 (d, $J=15,9$ Hz, 1H), 7,39 - 7,87 (m, 6H), 4,65 (t, $J=7,0$, 2H), 1,73 - 1,85 (m, 2H), 1,76 (s, 6H), 1,34 - 1,48 (M, 2H), 0,93 (t, $J=7,3$ Hz, 3H)
10	^{13}C NMR (DMSO- d^6)ppm	181,2, 160,7, 150,9, 143,7, 141,7, 140,7, 129,8, 129,0, 123,0, 115,0, 110,4, 87,7, 52,0, 46,1, 30,4, 25,8, 19,2, 13,7
	Analyysi: laskettu $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{I}_3\text{NO}\cdot\text{EtOH}$:lle	C 38,68; H 4,06; N 1,89
15	Havaittu:	C 38,55; H 3,96; N 1,91

Esimerkki 7

Koekäyttö ihmisen veriplasman albumiinille

Tämän keksinnön mukaisen proteiinivirheen merosya-
 20 niini-indikaattoriyhdisteiden hyödyllisyyttä nestemäisessä
 näytteessä proteiinitasojen määrittämiseksi nestemäisessä
 testinäytteessä on kuvattu seuraavassa taulukossa 7. Yh-
 disteiden liuos 200 mM - 250 mM Na^+ - tai K^+ -sitraattipus-
 kurissa pH:ssa ainakin 0,5 yksikköä alle yhdisteen pK_a ,
 25 valmistettiin ja sen absorbanssi mitattiin seuraavassa
 luetelluilla aallonpituuksilla. Liuosta käsiteltiin sitten
 riittävällä määrällä ihmisen veri plasma-albumiinia muodos-
 tamaan albumiinipitoisuus 100 mg/dl ja absorbanssi mitat-
 tiin jälleen. Ilmoitettu nousu absorbanssissa (Δ abs) on
 30 verrannollinen läsnäolevan albumiinin määrään nähden ja
 osoittaa väriaineen suhteellisen herkkyyden mitattavalle
 proteiinille.

Taulukko 7

	Yhdiste nro	Yhdiste pka.	Yhdisteen väheneyys (M)	Analyysi ph	Analyysi lambda (nm)	delta ABS
5	A	3,59	$1,0 \times 10^{-5}$	3,0	522	0,156
	B	4,35	$2,5 \times 10^{-5}$	3,5	506	0,027
	C	3,65	$1,5 \times 10^{-5}$	3,0	543	0,255
	D	3,65	$2,0 \times 10^{-5}$	3,0	541	0,402
	E	3,52	$1,8 \times 10^{-5}$	3,0	535	0,322

10 Yhdiste A on 1-(ω -sulfopropyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dibromistyyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini

Yhdiste B on 1-(ω -sulfobutyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryyli)bentsotiatsolium betaiini

15 Yhdiste C on 1-(ω -sulfoetyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini

Yhdiste D on 1-(ω -sulfopropyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini

Yhdiste E on 1-(ω -sulfobutyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini.

20 Esimerkki 8

Reagenssiliuskan valmistus

Eräs menetelmä tässä esitettyjen proteiinireagenssi analyysiliuskojen valmistamiseksi on esitetty seuraavassa. Kuvattu menetelmä on jatkuva menetelmä massaa muodostavien proteiinireagenssi testiliuskojen valmistusta varten.

25 Menetelmän mukaisesti ohut paperinen absorbenttiliuska kuivattiin edullisesti nopeudella neljä tuumaa/minuutti. Eräs edullinen paperi on E & D 237 (Ahlström Filtration, Inc., Mount Holley Springs, PA, U.S.A.). Paperi
30 kastettiin puskuroituun kylpyyn, pH 2,5, jossa oli proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoria SPDIB liuotettuna etanoliin. Erään edullisen suoritustavan mukaisesti kylpy sisälsi n. 0,03 - 0,08 mM SPDIB, 0,5 M kaliumsitraattipus-
kuria, pH 2,5 ja 20 % etanolia. Koeliuska kuljetettiin
35 sitten kuivaajan läpi, jonka ilmanpaine oli yksi tuuma ja lämpötila 60 °C, nopeudella neljä jalkaa/minuutti. Koeliuskat leikattiin sitten ja pakattiin.

Esimerkki 9

SPDIB:tä sisältävien reagenssiliuskojen herkkyys annokselle

5 Puskuroituun nestemäiseen näytteeseen (50 mM kaliumsitraattia, pH 2,5), jonka oli valkuaisainekokeessa osoitettu olevan vailla albumiinia, lisättiin erilaisia merkittäviä määriä Pentex^R ihmisen veriplasma-albumiinia (HSA) (Miles, Inc., Elkhart, Indiana). Käyttäen Clinitek 200^R laitteistoa (Miles, Inc., Elkhart, Indiana) protei-
10 nin mittaukset suoritettiin käyttäen analyysitestiliuskoja, jotka sisälsivät 0,3 mM SPDIB.

Erotuskyky ilmoitettiin kvantitatiivisesti delta K/S-arvoina eri albumiinipitoisuuksille, kuten on osoitettu kuviossa 2. K/S on laskettu kaavasta:

15

$$K/S = \frac{(I-R)^2}{2R}$$

20 jossa R on koelaitteiston reflektanssi, K on vakio ja S on kyseisen aineen valonsirontakerroin. Edeltävä yhtälö on yksinkertaistettu muoto hyvin tunnetusta Kubelka-Munk yhtälöstä (katso Gustav Kortum, "Reflectance Spectroscopy", sivut 106 - 11, Springer Verlag, New York
25 (1969). K/S määritettiin 25 sekunnissa.

Edellä kuvatut reagenssiliuskat analysoitiin niiden herkkyyden suhteen eri proteiinimääriille. Tulokset tästä tutkimuksesta on esitetty pääkohdittain kuvassa 2. Kuten kuvasta 2 nähdään, keksinnön mukainen liuska oli herkkä
30 laajalla alueella proteiinipitoisuuksia.

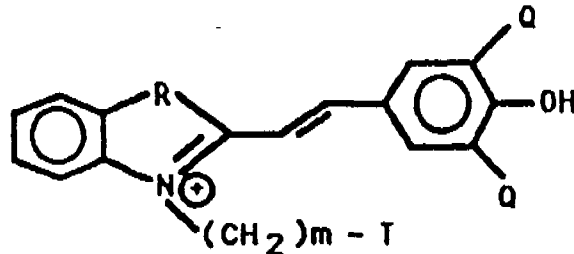
Lisäksi oli nähtävissä merkittävä erottelukyky proteiinipitoisuuksien välillä tämän keksinnön mukaisesti.

Vaikka keksintö on sopiva erilaisia modifiointeja ja vaihtoehtoisia muotoja varten, sen spesifisiä suoritus-
35 muotoja on kuvattu esimerkinomaisesti ja tässä kuvattu yksityiskohdittain. On kuitenkin ymmärrettävä, että eri-

tyisten kuvattujen muotojen ei ole tarkoitettu rajoittavan keksintöä, vaan päinvastoin, tarkoituksena on kattaa kaikki modifioinnit, ekvivalentit ja vaihtoehdot, jotka kuuluvat tämän keksinnön henkeen ja piiriin, kuten on määritetty liitetyissä patenttivaatimuksissa.

Patenttivaatimukset:

1. Proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoriyhdiste:



jossa:

m on kokonaisluku 1 - 6;

Q on -Br, -I tai Cl;

R on S, Se, O tai $C(C_{nH_{2n+1}})_2$,

jossa:

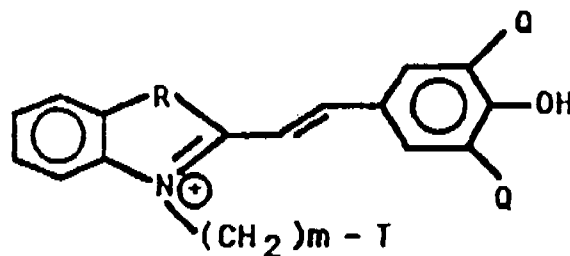
n on kokonaisluku 1 - 6; ja

T on $-SO_3^-$ tai -H.

2. Proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoriyhdiste, tunnettu siitä, että se on 1-(ω-sulfopropyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini.

3. Analyysikoeliuska proteiinin määrittämiseksi nestemäisessä näytteessä, tunnettu siitä, että se käsittää absorboivan kantoaineen impregnoituna proteiinivirheen merosyaniini-indikaattorilla.

4. Analyysikoeliuska proteiinin määrittämiseksi nestemäisessä näytteessä, tunnettu siitä, että se käsittää absorboivan kantoaineen impregnoituna proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoriyhdisteellä:



jossa:

m on kokonaisluku 1 - 6;

Q on -Br, -I tai Cl;

R on S, Se, O tai $C(C_nH_{2n+1})_2$,

5 jossa:

n on kokonaisluku 1 - 6; ja

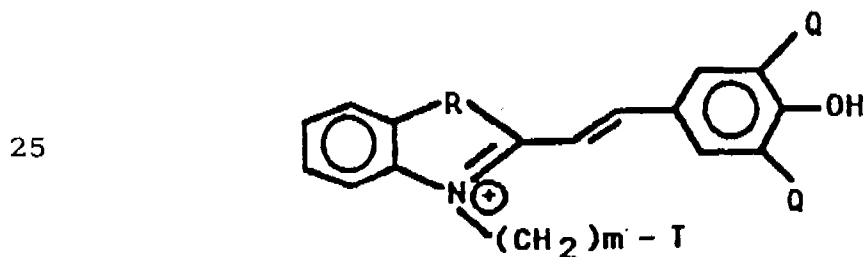
T on $-SO_3\theta$ tai -H.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen analyysikoelius-
ka, t u n n e t t u siitä, että m on kokonaisluku 3 tai
10 4; Q on -Br tai -I; R on $C(C_nH_{2n+1})_2$, jossa n on kokonais-
luku 1 - 3; ja T on $-SO_3\theta$.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen analyysikoelius-
ka, t u n n e t t u siitä, että m on kokonaisluku 3; ja R
on $C(CH_3)_2$.

15 7. Menetelmä proteiinin määrittämiseksi nestemäi-
sessä näytteessä, t u n n e t t u siitä, että menetelmä
käsittää vaiheet, joissa:

a) kostutetaan analyysikoeliuska nestemäisellä
näytteellä, joka koeliuska on absorboiva kantoaine, joka
20 on impregnoitu proteiinivirheen merosyaniini-indikaatto-
riyhdisteellä:



jossa:

m on kokonaisluku 1 - 6;

30 Q on -Br, -I tai -Cl;

R on S, Se, O tai $C(C_nH_{2n+1})_2$,

jossa:

n on kokonaisluku 1 - 6; ja

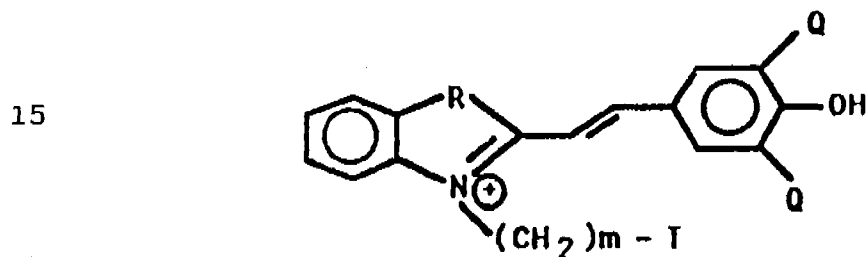
T on $-SO_3\theta$ tai -H; ja

b) havainnoidaan ja taltioidaan mitkä tahansa värin muutokset, joka värin muutos on osoitus proteiinin läsnäolosta näytteessä.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoriyhdiste on 1-(~~ω~~-sulfopropyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyryyli)-3,3-dimetyyli-indolinium betaiini.

9. Menetelmä proteiinin havaitsemiseksi näytteessä, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

a) lisätään näytteeseen proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoriyhdistettä:



jossa:

20 m on kokonaisluku 1 - 6;
 Q on -Br, -I tai -Cl;
 R on S, Se, O tai $\text{C}(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})_2$,

jossa:

 n on kokonaisluku 1 - 6; ja
 25 T on $-\text{SO}_3\theta$ tai -H; ja

b) havainnoidaan ja merkitään muistiin mikä tahansa värin muutos, joka värin muutos osoittaa proteiinin läsnäolon näytteessä.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiinivirheen merosyaniini-indikaattoriyhdiste on 1-(~~ω~~-sulfopropyyli)-2-(4'-hydroksi-3',5'-dijodistyryyli)-3,3-dimetyyli-indoliniumbetaiini.

30