



(10) **DE 10 2011 001 368 A1** 2012.09.20

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2011 001 368.7**

(22) Anmeldetag: **17.03.2011**

(43) Offenlegungstag: **20.09.2012**

(51) Int Cl.: **G01N 21/64** (2006.01)

(71) Anmelder:

**Bundesanstalt für Materialforschung und -  
prüfung (BAM), 12205, Berlin, DE**

(74) Vertreter:

**Zimmermann & Partner, 80331, München, DE**

(72) Erfinder:

**Descalzo, Ana, Madrid, ES; Rurack, Knut, 12101,  
Berlin, DE; Weller, Michael, 15834, Rangsdorf, DE**

US	2008 / 0 114 151	A1
US	2010 / 0 068 748	A1
US	4 374 120	A
US	5 095 099	A
EP	0 203 047	A1
WO	96/ 00 901	A1
WO	00/ 01 663	A1
WO	00/ 48 990	A1
WO	2005/ 108 405	A2
WO	2009/ 003 700	A1

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

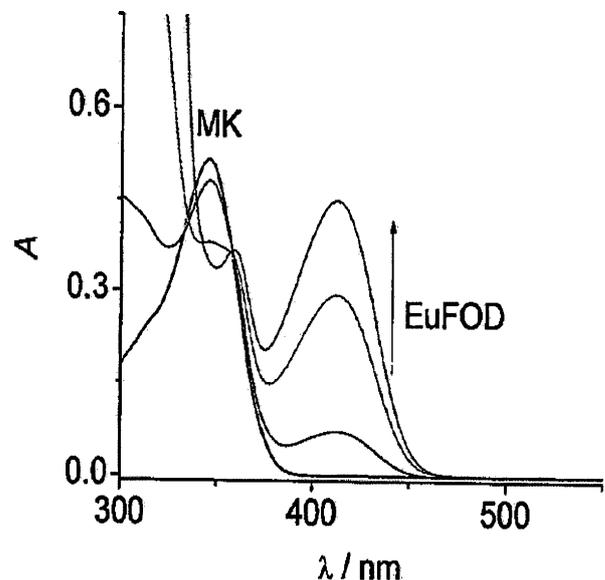
DE	11 2008 002 375	A5
GB	2 451 106	A
US	7 404 912	B2
US	2003 / 0 089 273	A1

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Lanthanoid-Chelate enthaltende Partikel, deren Herstellung sowie deren Verwendung in der Bioanalytik**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft neue polymere Partikel enthaltend Sensibilisatoren für Lanthanoid-Chelate, die Herstellung derartiger Polymerpartikel sowie die Verwendung der Polymerpartikel, welche die Lanthanoid-Chelate mit den Sensibilisatoren enthalten, in der Bioanalytik, bevorzugt in der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion bzw. Fluorometrie.



## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft neue polymere Partikel enthaltend Sensibilisatoren für Lanthanoid-Chelate, die Herstellung derartiger Polymerpartikel sowie die Verwendung der Polymerpartikel, welche die Lanthanoid-Chelate mit den Sensibilisatoren enthalten, in der Bioanalytik, bevorzugt in der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion bzw. Fluorometrie.

**[0002]** Aus dem Stand der Technik ist es bereits bekannt, Lanthanoid-Komplexe in der Fluoreszenzspektroskopie einzusetzen. Die US-PS 4,374,120 stellt Eu- und Tb-Chelate als Fluoreszenzmarker mit einer relativ langen Fluoreszenzabklingzeit von 50 bis 1000 Mikrosekunden vor; Liganden sind u. a. Aminopolycarbonsäuren. Es ist weiterhin bekannt, dass sich einige Lanthanoid-Chelatkomplexe für die zeitaufgelöste Fluorometrie besonders eignen, wobei Tb(III)-BPTA-NHS und Eu(III)-Östrogen im Stand der Technik bevorzugt genannt werden und ersteres in einem DNA-Hybridisierungs-Assay Verwendung findet (K. Matsumoto et al., RIKEN Review 35, May, 2001).

**[0003]** Lanthanoid-Chelate finden gemäß der WO-A-00/01663 auch Verwendung in HTRF (Homogeneous-Time-Resolved Fluorescence) Assays. Die Deutsche Offenlegungsschrift DE-A-42 22 255 beschreibt Markierungsreagenzien mit einer Lanthanoidionen-chelatisierenden Struktur zum Einsatz in der Gensondendiagnostik. Bevorzugt als Lanthanoidionen chelatisierende Strukturen sind gemäß dieser Offenlegungsschrift Pyridinderivate (siehe u. a. US-PS 5,032,677).

**[0004]** H. Takalo et al. beschreiben im J. Alloy. Compd., 1995, 225, 511–514 Tb(III)- und Eu(III)-Chelate und ihre Lumineszenzausbeute.

**[0005]** Daneben werden zur Bestimmung von Phosphorylierungsaktivitäten in der deutschen Offenlegungsschrift DE-A-698 13 850 Kryptate eingesetzt, die ein Seltenerdatom – wie Tb, Eu, Sm, Dy, Nd – enthalten und ferner einen Komplexbildner – wie Bispyridin. Diese Kryptate werden als fluoreszierende Donorverbindungen eingesetzt.

**[0006]** Weiterhin beschreiben I. Hemmilää, und S. Webb in Drug Discov. Today, 1997, 2, 373–381 Prinzipien der time-resolved fluorometry (zeitaufgelöste Fluorometrie) mit Lanthanoid-Chelaten zum Drogenscreening. In der deutschen Offenlegungsschrift DE-A-102 59 677 wird eine Sonde zum Nachweis von Nukleinsäuren vorgestellt, die in einer bevorzugten Ausführungsform Seltene-Erden-Farbstoffe als Fluorophore einsetzt.

**[0007]** Die zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion verkörpert eine sehr empfindliche Analysenmethode, bei der eine zur Fluoreszenz befähigte Probe zunächst mittels eines Lichtpulses angeregt wird und das auf dem Wege der Fluoreszenz emittierte Licht nach einer bestimmten Zeitverzögerung – typischerweise im Mikro- bis Millisekunden-Bereich – gemessen wird. Derartige Verfahren erlauben die effiziente Unterdrückung von gestreutem Anregungslicht und von Licht, das aus der Autofluoreszenz anderer Probenbestandteile herrührt. Verglichen mit den Methoden der konventionellen – statischen – Fluorometrie weist die zeitaufgelöste Fluorometrie den Vorteil auf, dass das Verhältnis von Signal zu Rauschen deutlich verbessert wird und somit auch schwächere Signale erfolgreich detektiert werden können.

**[0008]** Dabei hat sich bei der zeitaufgelösten Fluorometrie speziell die Verwendung von Farbstoffen mit langen Lumineszenzabklingzeiten als vorteilhaft erwiesen. Diese Lumineszenzabklingzeiten können durch phasenmodulierte bzw. Impuls-Lumineszenzmesstechniken bestimmt werden. Als vorteilhaft hat sich für diesen Zweck der Einsatz von Komplexen mit Lanthanid- bzw. Lanthanoidionen – bevorzugt von Terbium(III)-Ionen und von Europium(III)-Ionen – erwiesen.

**[0009]** Die Abklingzeiten von dreiwertig positiv geladenen Ionen der Lanthaniden (Ln(III)) sind relativ lang, weil die Emission auf den formal verbotenen f-f-Übergängen basiert, was auf der anderen Seite allerdings auch ein Grund dafür ist, dass die Absorptionskoeffizienten dieser Übergänge sehr klein sind. Aus diesem Grunde wurde im Stand der Technik der Einsatz von sog. Antennenliganden vorgeschlagen, die mit dem Lanthanid- bzw. Lanthanoid-Ion eine koordinative Bindung eingehen. Diese Antennenliganden übertragen die von ihnen empfangene Anregungsenergie auf das Lanthanid- bzw. Lanthanoidion – zum Beispiel bevorzugt auf Ln(III)-Ionen, wie z. B. das Eu(III)-Ion

**[0010]** Die meisten – beispielsweise im Hinblick auf den Einsatz des Europium(III)-Ions – vorgeschlagenen Antennenliganden ermöglichen die oben beschriebene Sensibilisierung lediglich im UV-Bereich mit Anregungswellenlängen < 400 nm. Demgegenüber erscheint jedoch eine entsprechenden Anregung mittels sichtbarem

Lichts wesentlich vorteilhafter, da die Proben bei der Bestrahlung mit UV-Licht schneller zerfallen und weil der Einsatz von Lichtquellen, die sichtbares Licht erzeugen, instrumentell erheblich einfacher und preisgünstiger zu verwirklichen ist.

**[0011]** Im Stand der Technik wurden daher bereits einige Alternativen, die die Verwendung von sichtbarem Licht mit einer Wellenlänge von  $> 400$  nm zum Gegenstand haben, vorgeschlagen, die jedoch gravierende Nachteile aufweisen.

**[0012]** So sind einige Komplexe mit derartigen Antennenliganden experimentell nur nach einer mehr oder weniger aufwendigen Derivatisierung zugänglich [A. Dadabhoy et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 2000, 2359–2360; A. Dadabhoy et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 2002, 348–357] oder die Komplexe erweisen sich als in Lösung instabil [R. van Deun et al., Chem. Commun., 2005, 590–592]. In anderen Fällen führen die Chelate zu einer sehr geringen Quantenausbeute und/oder sie erlauben lediglich einen ineffizienten Energietransfer. So ermöglichen zum Beispiel Eu(III)-Komplexe mit Schiff'schen Basen nur die Erzielung von niedrigen Quantenausbeuten, sobald das Absorptionsmaximum bei längeren Wellenlängen auftritt [R. D. Archer, H. Chen, Inorg. Chem., 1998, 37, 2089–2095]. Bei anderen Chelaten kann eine essentielle Lumineszenz bzw. Fluoreszenz nur bei deren Verwendung in organischen Lösungsmitteln beobachtet werden, was sie für eine Verwendung für Anwendungszecke in biologischen Systemen als unpraktikabel bzw. unattraktiv erscheinen lässt. So beschreiben Martinus et al. ein Europium-Chelat mit Michler's Keton [4,4'-Bis(N,N-dimethylamino)benzophenon] ("MK"), das ein Absorptionsmaximum bei 414 nm aufweist. Allerdings wird die Komplexbildung nur in nicht-koordinierenden Solvenzien ermöglicht, in denen keine Wassermoleküle, die mit dem Chelatbildner MK bei der Belegung der Koordinationsstellen in Konkurrenz treten können, vorhanden sind [M. H. V. Werts et al., Chem. Commun., 1999, 799–800].

**[0013]** Daneben berichten Steemers et al. über Europium- und Terbium-Komplexe, die eine Serie von Calix[4]arenen aufweisen und deren Anregungswellenlängen jenseits von wenigstens 350 nm liegen. Allerdings sind die beobachteten Quantenausbeuten relativ niedrig und der Energietransfer stellt sich als relativ ineffizient heraus. Zur Erklärung wird angenommen, dass ein signifikanter Teil dieser Komplexe von Sauerstoff abgefangen bzw. inaktiviert wird, was mit einer sog. Löschung (Quenching) einher geht, welche ihrerseits keinen Beitrag zur Lumineszenz leistet [F. J. Steemers et al., J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 9408–9414]. Des Weiteren berichten Werts et al. über Lanthanid-Komplexe mit Fluorexon {4',5'-bis-[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]-fluorescein} [M. H. V. Werts et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2000, 433–439], die mit sichtbarem Licht angeregt werden können. Aber auch diese Chelate weisen eine relative niedrige Quantenausbeute in einem Bereich von lediglich  $1,7 - 8,9 \cdot 10^{-4}$  auf.

**[0014]** Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, lumineszierende Partikel zur Verfügung zu stellen, die mit sichtbarem Licht angeregt werden können und die in empfindlichen Assays in der Bioanalytik unter Anwendung der zeitaufgelösten Detektion (Fluorometrie) eingesetzt werden können.

**[0015]** Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, die oben beschriebenen Partikel für Anregungswellenlängen von  $> 400$  nm verfügbar zu machen.

**[0016]** Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, lumineszierende Partikel zur Verfügung zu stellen, die ein gegenüber dem molekularen Luminophor verstärktes Signal erzeugen.

**[0017]** Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung dieser Partikel zur Verfügung zu stellen.

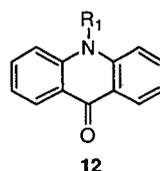
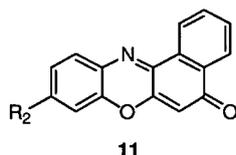
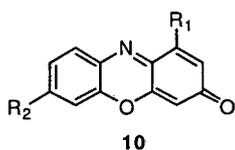
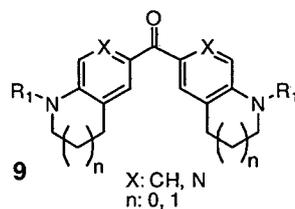
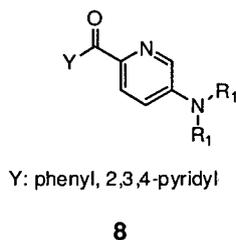
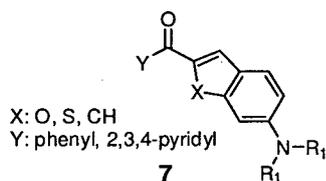
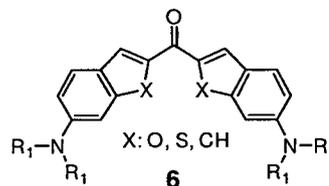
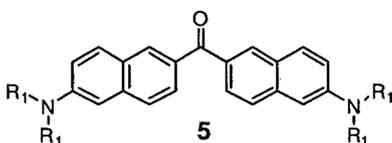
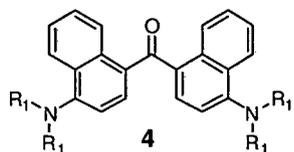
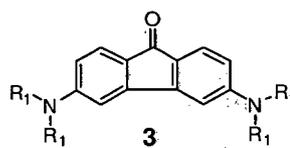
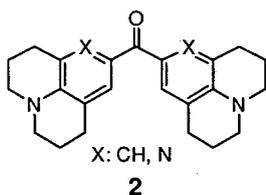
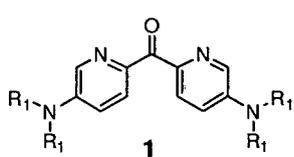
**[0018]** Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein modulares Verfahren für die Synthese der erfindungsgemäßen Partikel aufzufinden.

**[0019]** Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, Partikel verfügbar zu machen, die in einem Assay verwendet werden können, der auch in wässriger Lösung erfolgreich eingesetzt werden kann.

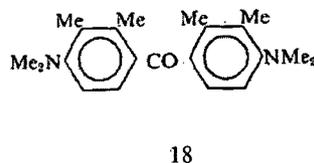
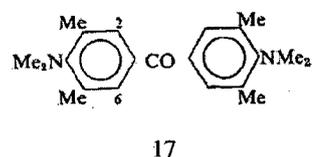
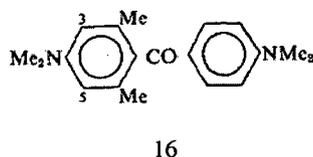
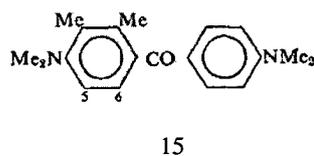
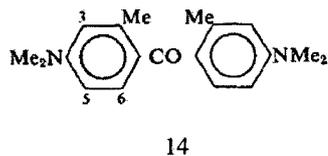
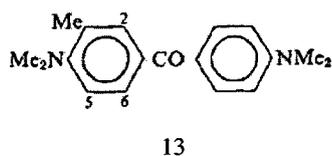
**[0020]** Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, einen Assay zu Verfügung zu stellen, bei dem die Affinität der Analyt-Rezeptor-Bindung hoch ist.

**[0021]** Diese Aufgaben werden zumindest teilweise durch Lanthanoidionen-haltige Partikel, die vorzugsweise Europium(III)-, Terbium(III)-, Samarium(III)-, Neodym(III)-, Dysprosium(III)-, Praseodymium(III)-, Holmium(III)-, Erbium(III)- oder Ytterbium(III)-Komplexe – besonders bevorzugt Ytterbium(III)- und Europium(III)-Komplexe

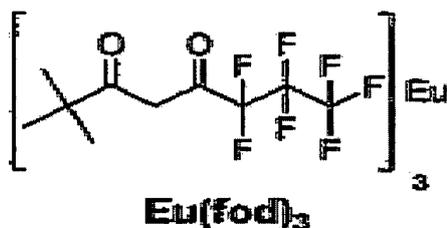
– als Bestandteil der Polymerpartikel enthalten können, gelöst, in denen ein oder mehrere Sensibilisator(en) bzw. Liganden der allgemeinen Formel 1 bis 12



in denen R<sup>1</sup> Wasserstoff oder Alkyl,  
R<sup>2</sup> Wasserstoff, -NHCOAlkyl, -NHCONR<sup>3</sup>, -NHCSNR<sup>3</sup>, NR<sup>4</sup>,  
R<sup>3</sup> Alkyl,  
R<sup>4</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff oder Alkyl,  
X wie jeweils angegeben N, S, O, CH, CH<sub>2</sub>, CH(Alkyl), C(Alkyl)<sub>2</sub>  
bedeuten können und/oder eine oder mehrere der Verbindungen 13–22







23

eingesetzt.

**[0029]** Daneben finden vorzugsweise Komplexe des Yb(III) mit den erfindungsgemäß vorgeschlagenen Liganden Verwendung, die – ebenso wie einige nah-infrarot (NIR) emittierende Ln(III) Komplexe – mittels sichtbaren Lichts angeregt werden können. Partikel, die derartige Komplexe beinhalten, ermöglichen eine Detektion im nahen Infrarot (NIR)-Bereich, was einen sehr großen Vorteil der vorliegenden Erfindung darstellt, da in diesem Bereich wegen fehlender Proteinfluoreszenz keine Untergrundsignale vorhanden sind – bzw. im Falle ihres Vorhandenseins – effizient unterdrückt werden können. Daneben erlaubt die große (pseudo) Stokesche Verschiebung von mehr als 500 nm eine einfache Abtrennung von störenden Streusignalen.

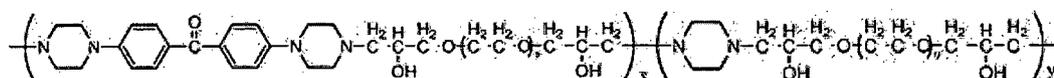
**[0030]** Besonders bevorzugt werden die oben erwähnten Aufgaben u. a. durch Polymerpartikel gelöst, die einen – oder mehrere – Europium(III) bzw. Eu(fod)<sub>3</sub>-Komplexe enthalten, in denen daneben Sensibilisatoren der allgemeinen Formel 1 bis 22 enthalten sind.

**[0031]** Vorzugsweise finden funktionalisierte Polymerpartikel Verwendung. Polymere Partikel, die funktionalisiert sind bzw. funktionalisiert werden können bzw. die bereits entsprechende Vorstufenfunktionen besitzen, sind aus dem Stand der Technik hinlänglich bekannt.

**[0032]** Die Fähigkeit, gezielt eine oder mehrere Spezies von Biomolekülen an die Oberfläche der funktionalisierten Polymerpartikel zu binden, wird in erheblichem Maße durch die Art des verwendeten Polymers sowie durch die an diesem Polymer befindlichen funktionellen Gruppen bestimmt. Die funktionalisierten Polymerpartikel weisen im Allgemeinen eine möglichst hohe Bindungskapazität gegenüber der zu analysierenden Biomolekül-Spezies auf, um den Einsatz der Polymerpartikel effektiv und kostengünstig gestalten zu können. Daneben sollte die Bindung möglichst selektiv erfolgen.

**[0033]** Für eine entsprechende Funktionalisierung eignet sich eine Vielzahl von hinreichend hydrophoben Polymeren, d. h. von Polymeren – beispielsweise Polyene (wie Polyethylene oder Polypropylene), die ähnlich hydrophob wie Polystyrol sind und die sich gut quervernetzen lassen. Diese Polymere sind aus dem Stand der Technik hinlänglich bekannt.

**[0034]** Daneben eignen sich auch Oligomere oder Polymere, die ein oder mehrere Partialstrukturen von Michlers Keton aufweisen – wie zum Beispiel Polymere des folgenden Typs 24:



24

**[0035]** Worin x und y beliebig gewählt werden können und die Verhältnisse von x:y beispielsweise in einem Bereich von 10 zu 1 bis 1 zu 10 liegen können [Y. Wen et al., Polym. Adv. Technol., Article first published online : 21 SEP 2009, DOI: 10.1002/pat.1552].

**[0036]** Die Herstellung entsprechender Partikel ist dem Fachmann aus dem Stand der Technik ebenfalls hinlänglich bekannt. Der Einbau hinreichend lipophiler Lanthanid- und/oder Lanthanoid-Chelate und Sensibilisatoren kann durch verschiedene kovalente und nicht-kovalente Techniken – beispielsweise durch Einquellen – erfolgen.

**[0037]** Fig. 1 zeigt die Absorptionsspektren des freien MK (Michlers Keton) vor und nach der Zugabe von zunehmenden Mengen an  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  in Toluol. Die wiedergegebenen experimentellen Daten belegen eine deutliche Verschiebung der Absorption des neu gebildeten Komplexes zu längeren Wellenlängen. Werden diese Komplexe in der langwelligen Absorptionsbande angeregt, bewirkt dies eine typische Emission – beispielsweise von  $\text{Eu}(\text{III})$  bei 615 nm.

**[0038]** Fig. 2 zeigt die Absorptionsspektren der freien Ketone 1 und 2 und der jeweils mit  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  in Toluol gebildeten Komplexe.

**[0039]** Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 1) gibt die Absorptionsmaxima und die Photolumineszenz Quantenausbeute (Photo Luminescence Quantum Yield (PLQY)  $\Phi_L$ ) für die von  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  mit MK sowie mit den erfindungsmäßigen Liganden 1 und 2 gebildeten Komplexen der Verbindungen 1 und 2 wieder.

Tabelle 1

Komplex	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\Phi_L$
$\text{Eu}(\text{fod})_3$ mit MK	412	0,25
$\text{Eu}(\text{fod})_3$ mit Ligand 1	431	0,09
$\text{Eu}(\text{fod})_3$ mit Ligand 2	439	0,001

**[0040]** Wenn Lanthanid- und/oder Lanthanoid-Chelate und Sensibilisatoren in den Polymerpartikeln co-immobilisiert werden, dann wird der Komplex innerhalb des Partikels gebildet. Dies ermöglicht Messungen in wässriger Lösung.

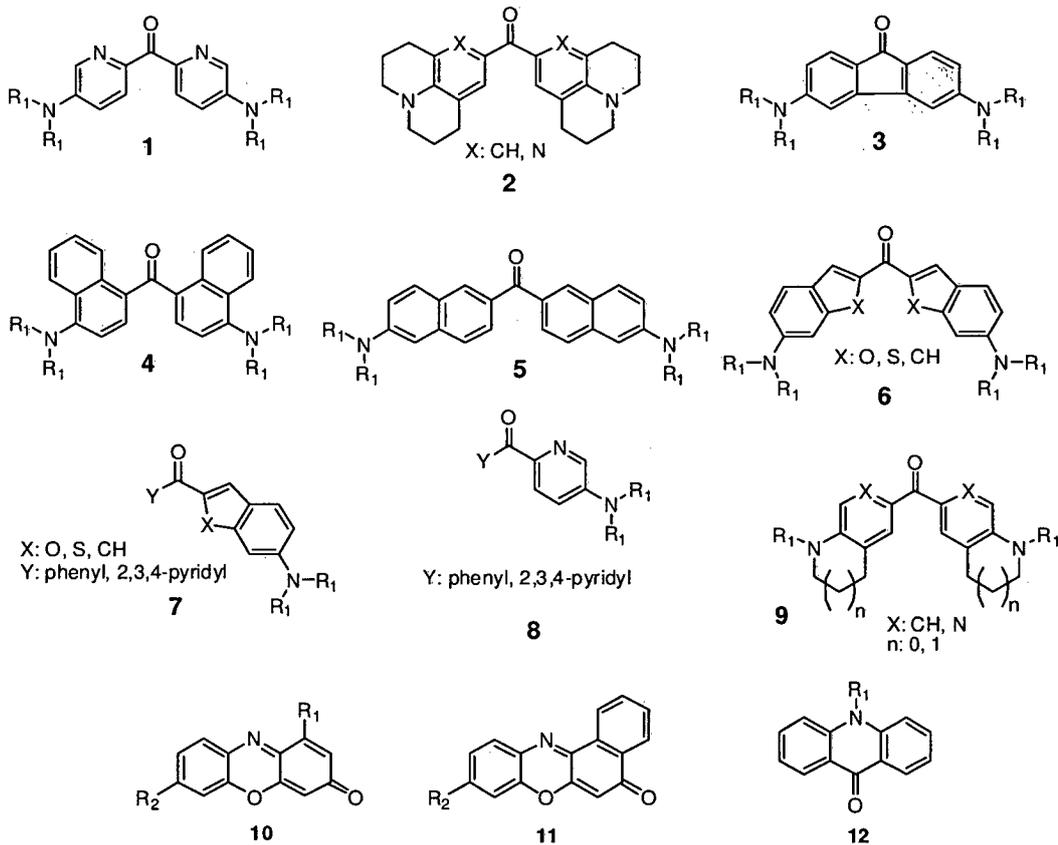
**[0041]** Fig. 3 zeigt das Fluoreszenzemissionsspektrum (rechtes Signal bei 615 nm) sowie das Fluoreszenzanregungsspektrum (linkes Signal bei 414 nm bzw. 430 nm) der lumineszierenden  $\text{Eu}(\text{fod})_3$ -MK sowie  $\text{Eu}(\text{fod})_3$ -1 Komplexe im Partikel eingeschlossen in wässriger Lösung.

**[0042]** Tabelle 2 zeigt die Lumineszenzabklingzeiten für die ausgewählten  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  Komplexe mit MK sowie mit den Liganden 1 und 2.

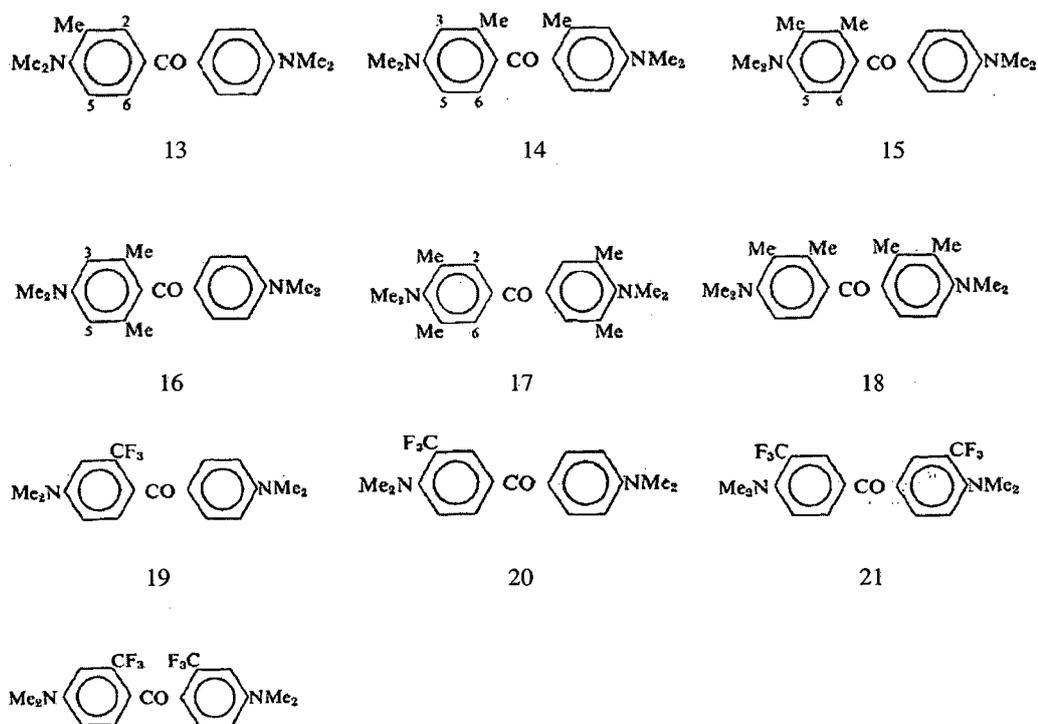
Tabelle 2

Komplex	$\tau/\mu\text{s}$
$\text{Eu}(\text{fod})_3$ mit MK	360
$\text{Eu}(\text{fod})_3$ mit Ligand 1	240
$\text{Eu}(\text{fod})_3$ mit Ligand 2	45

**[0043]** Somit betrifft die vorliegende Erfindung polymere Partikel, enthaltend ein oder mehrere Lanthanid- und/oder Lanthanoidionen und in denen ein oder mehrere Sensibilisator(en) bzw. Liganden der allgemeinen Formel 1 bis 12



in denen R<sup>1</sup> Wasserstoff oder Alkyl,  
R<sup>2</sup> Wasserstoff, -NHCOAlkyl, -NHCONR<sup>3</sup>, -NHCSNR<sup>3</sup>, NR<sup>4</sup>,  
R<sup>3</sup> Alkyl,  
R<sup>4</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff oder Alkyl,  
X wie jeweils angegeben N, S, O, CH, CH<sub>2</sub>, CH(Alkyl), C(Alkyl)<sub>2</sub>  
bedeuten können, und/oder eine oder mehrere der Verbindungen 13–22



– in denen Me für eine Methylgruppe und CO für eine Carbonylgruppe steht – enthalten sind.

**[0044]** Typischerweise betrifft die vorliegende Erfindung obige polymere Partikel enthaltend eines oder mehrere Ionen ausgewählt aus der Gruppe  $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Ho}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$  und  $\text{Yb}^{3+}$  – vorzugsweise eines oder mehrere Ionen ausgewählt aus der Gruppe  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$  und  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und besonders bevorzugt eines oder mehrere Ionen ausgewählt aus der Gruppe  $\text{Eu}^{3+}$ -,  $\text{Tb}^{3+}$ - und  $\text{Yb}^{3+}$ -Ionen – enthält.

**[0045]** Typischerweise betrifft die vorliegende Erfindung des Weiteren obige polymere Partikel enthaltend  $\text{Eu}(\text{fod})_3$ , Europium tris[3-(heptafluoropropylhydroxymethylen)-(+/-)-camphorat], Europium tris[3-(trifluoromethylhydroxymethylen)-(+/-)-camphorat], Europium(III) tris(d,d-dicampholymethanat), Europium(III) tris[3-(heptafluoropropylhydroxymethylen)-d-camphorat] oder Tris(1,1,1,5,5,6,6,7,7,7-decafluoro-2,4-heptandionato) Europium Dihydrat enthält.

**[0046]** Typischerweise betrifft die vorliegende Erfindung des Weiteren die vorgenannten Partikel, in denen der Substituent  $\text{R}^1$  in den allgemeinen Formeln 1 bis 22 Wasserstoff, Methyl, Ethyl, Propyl, 1-Methylethyl (iso-Propyl), Butyl und tert.-Butyl bedeuten kann.

**[0047]** Typischerweise betrifft die vorliegende Erfindung des Weiteren die vorgenannten polymeren Partikel in denen der Substituent  $\text{R}^2$  in den allgemeinen Formeln 1 bis 22 Wasserstoff,  $-\text{NHCOAlkyl}$ ,  $-\text{NHCONHR}^3$ ,  $-\text{NHCSNHR}^3$ ,  $\text{NR}^4_2$  und die Substituenten  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  Wasserstoff, Methyl, Ethyl, Propyl, 1-Methylethyl (iso-Propyl), Butyl oder tert.-Butyl und der Substituent Alkyl unabhängig voneinander Methyl, Ethyl, Propyl, 1-Methylethyl (iso-Propyl), Butyl oder tert.-Butyl bedeuten kann.

**[0048]** Typischerweise betrifft die vorliegende Erfindung des Weiteren die vorgenannten polymeren Partikel eines oder mehrere unpolare Monomere wie z. B. aus der Gruppe der Polyene – bevorzugt Polystyrol – aufweist.

**[0049]** Typischerweise betrifft die vorliegende Erfindung des Weiteren die vorgenannten polymeren Partikel, wobei das polymere Partikel ein Polymer mit funktionellen Gruppen aufweist.

**[0050]** Daneben betrifft die vorliegende Erfindung Verwendung vorbeschriebenen erfindungsgemäßen polymeren Partikels in einem bioanalytischen Verfahren.

**[0051]** Typischerweise betrifft die vorliegende Erfindung die vorgenannte Verwendung der erfindungsgemäßen polymeren Partikel in bioanalytischen Verfahren in denen das Verfahren ein fluorometrisches Verfahren, bevorzugt ein zeitaufgelöstes fluorometrisches Verfahren und besonders bevorzugt ein FRET-(Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bzw. Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) Verfahren ist.

**[0052]** Des Weiteren betrifft die vorliegende Erfindung einen Assay enthaltend wenigstens eines der polymeren zuvor beschriebenen Partikel.

**[0053]** Des Weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines polymeren Partikels, das folgende Schritte umfasst:

- i) Bereitstellen des polymeren Partikels,
- ii) Bereitstellen einer Lösung enthaltend mindestens ein Lanthanid- und/oder Lanthanoidion und eine Verbindung der Formel 1–22,
- iii) in Kontakt bringen der polymeren Partikel mit der mindestens ein Lanthanid- und/oder Lanthanoidion und eine Verbindung der Formel 1–22 enthaltenden Lösung.

**ZITATE ENHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Patentliteratur**

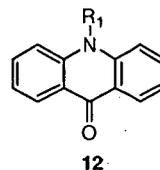
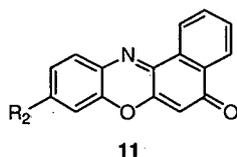
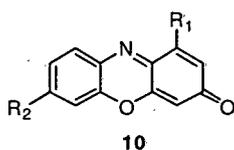
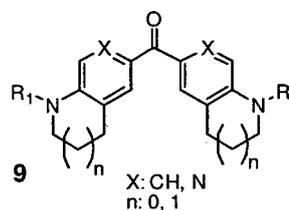
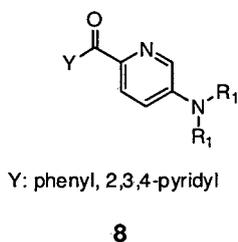
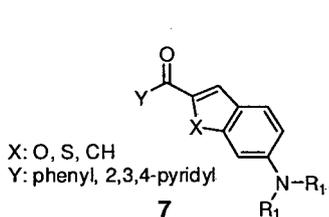
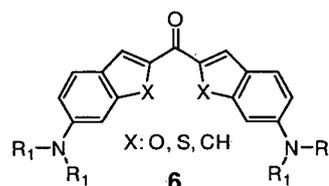
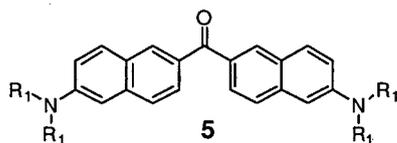
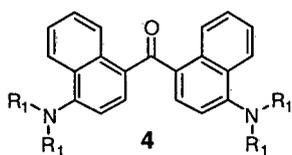
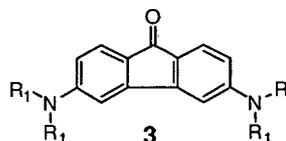
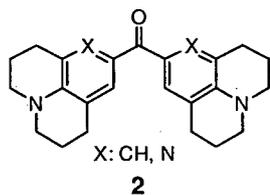
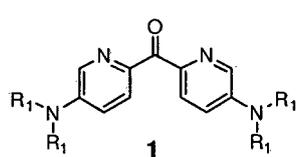
- US 4374120 [0002]
- WO 00/01663 [0003]
- DE 4222255 A [0003]
- US 5032677 [0003]
- DE 69813850 A [0005]
- DE 10259677 A [0006]

**Zitierte Nicht-Patentliteratur**

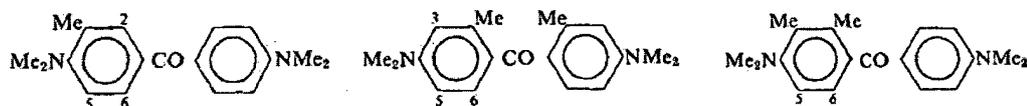
- K. Matsumoto et al., RIKEN Review 35, May, 2001 [0002]
- H. Takalo et al. beschreiben im J. Alloy. Compd., 1995, 225, 511–514 Tb(III)- und Eu(III)-Chelate [0004]
- I. Hemmilää, und S. Webb in Drug Discov. Today, 1997, 2, 373–381 [0006]
- A. Dadabhoy et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 2000, 2359–2360 [0012]
- A. Dadabhoy et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 2002, 348–357 [0012]
- R. van Deun et al., Chem. Commun., 2005, 590–592 [0012]
- R. D. Archer, H. Chen, Inorg. Chem., 1998, 37, 2089–2095 [0012]
- M. H. V. Werts et al., Chem. Commun., 1999, 799–800 [0012]
- Steemers et al. [0013]
- F. J. Steemers et al., J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 9408–9414 [0013]
- Werts et al. [0013]
- M. H. V. Werts et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2000, 433–439 [0013]
- K. D. Bartle, G. Hallas und J. D. Hepworth, Organic Magnetic Resonance Vol. 7, 1973, 154–159 [0022]
- Y. Wen et al., Polym. Adv. Technol., Article first published online : 21 SEP 2009, DOI: 10.1002/pat.1552 [0035]

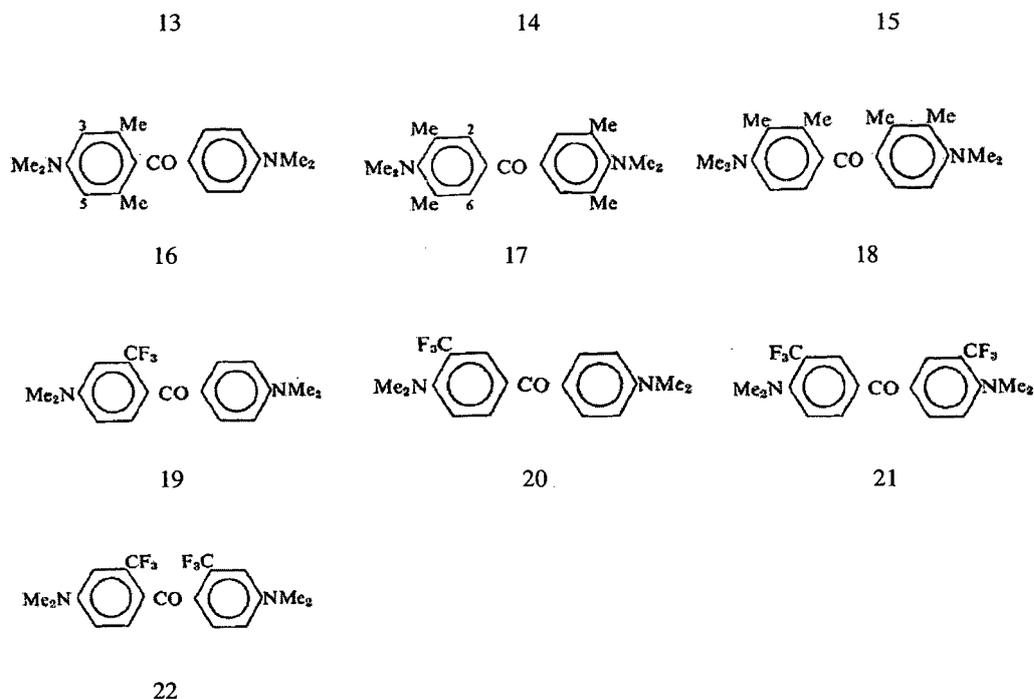
## Patentansprüche

1. Polymeres Partikel, enthaltend ein oder mehrere Lanthanid- und/oder Lanthanoidionen und in denen ein oder mehrere Sensibilisator(en) bzw. Liganden der allgemeinen Formel 1 bis 12



in denen R<sup>1</sup> Wasserstoff oder Alkyl,  
R<sup>2</sup> Wasserstoff, -NHCOAlkyl, -NHCONR<sup>3</sup>, -NHCSR<sup>3</sup>, NR<sup>4</sup>,  
R<sup>3</sup> Alkyl,  
R<sup>4</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff oder Alkyl,  
X wie jeweils angegeben N, S, O, CH, CH<sub>2</sub>, CH(Alkyl), C(Alkyl)<sub>2</sub>  
bedeuten können und/oder eine oder mehrere der Verbindungen 13–22





– in denen Me für eine Methylgruppe und CO für eine Carbonylgruppe steht – enthalten sind.

2. Polymere Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das polymere Partikel eines oder mehrere Ionen ausgewählt aus der Gruppe  $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Ho}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$  und  $\text{Yb}^{3+}$  – vorzugsweise eines oder mehrere Ionen ausgewählt aus der Gruppe  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$  und  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen und besonders bevorzugt eines oder mehrere Ionen ausgewählt aus der Gruppe  $\text{Eu}^{3+}$ -,  $\text{Tb}^{3+}$ - und  $\text{Yb}^{3+}$ -Ionen – enthält.

3. Polymeres Partikel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das polymere Partikel  $\text{Eu}(\text{fod})_3$ , Europium tris[3-(heptafluoropropylhydroxymethylen)-(+/-)-camphorat], Europium tris[3-(trifluoromethylhydroxymethylen)-(+/-)-camphorat], Europium(III) tris(d,d-dicampholylmethanat), Europium(III) tris[3-(heptafluoropropylhydroxymethylen)-d-camphorat] oder Tris(1,1,1,5,5,6,6,7,7,7-decafluoro-2,4-heptandionato) Europium Dihydrat enthält.

4. Polymeres Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Substituent  $\text{R}^1$  in den allgemeinen Formeln 1 bis 12 Wasserstoff, Methyl, Ethyl, Propyl, 1-Methylethyl (iso-Propyl), Butyl und tert.-Butyl bedeuten kann.

5. Polymeres Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Substituent  $\text{R}^2$  in den allgemeinen Formeln 1 bis 12 Wasserstoff,  $-\text{NHCOAlkyl}$ ,  $-\text{NHCONHR}^3$ ,  $-\text{NHCSNHR}^3$ ,  $\text{NR}^4_2$  und die Substituenten  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  Wasserstoff, Methyl, Ethyl, Propyl, 1-Methylethyl (iso-Propyl), Butyl oder tert.-Butyl und der Substituent Alkyl unabhängig voneinander Methyl, Ethyl, Propyl, 1-Methylethyl (iso-Propyl), Butyl oder tert.-Butyl bedeuten können.

6. Polymeres Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das polymere Partikel eines oder mehrere Monomere ausgewählt aus der Gruppe unpolaren Polymere vorzugsweise der Polyene und besonders bevorzugt der Polystyrole ist.

7. Polymeres Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das polymere Partikel ein funktionelles Polymer aufweist.

8. Verwendung des polymeren Partikels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 in einem bioanalytischen Verfahren vorzugsweise in einem fluorometrischen Verfahren, besonders bevorzugt in einem zeitaufgelöstes fluorometrisches Verfahren und ganz besonders bevorzugt in einem FRET-(Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bzw. in einem Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) Verfahren.

9. Assay enthaltend wenigstens ein polymeres Partikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.

10. Verfahren zur Herstellung wenigstens eines polymeren Partikels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, umfassend folgende Verfahrensschritte:

i) Bereitstellen des polymeren Partikels,

ii) Bereitstellen einer Lösung enthaltend mindestens ein Lanthanid- und/oder Lanthanoidion und eine Verbindung der Formel 1–22,

iii) in Kontakt bringen der polymeren Partikel mit der mindestens ein Lanthanid- und/oder Lanthanoidion und eine Verbindung der Formel 1–22 enthaltenden Lösung.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

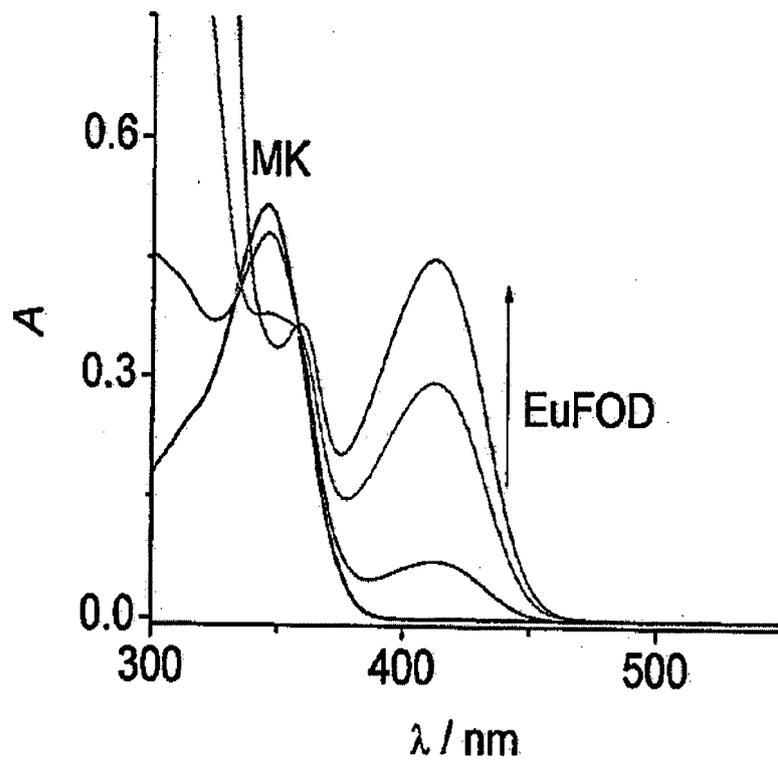


Fig. 1

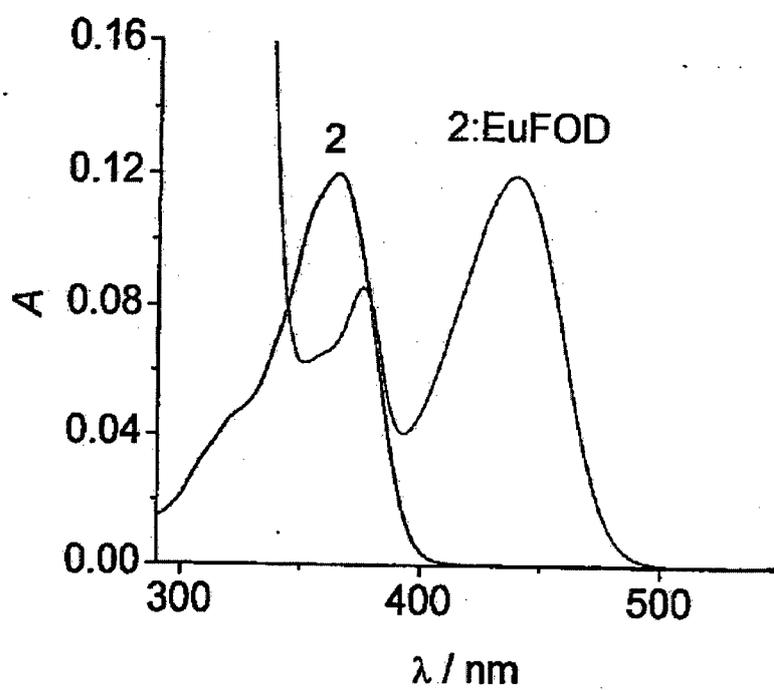
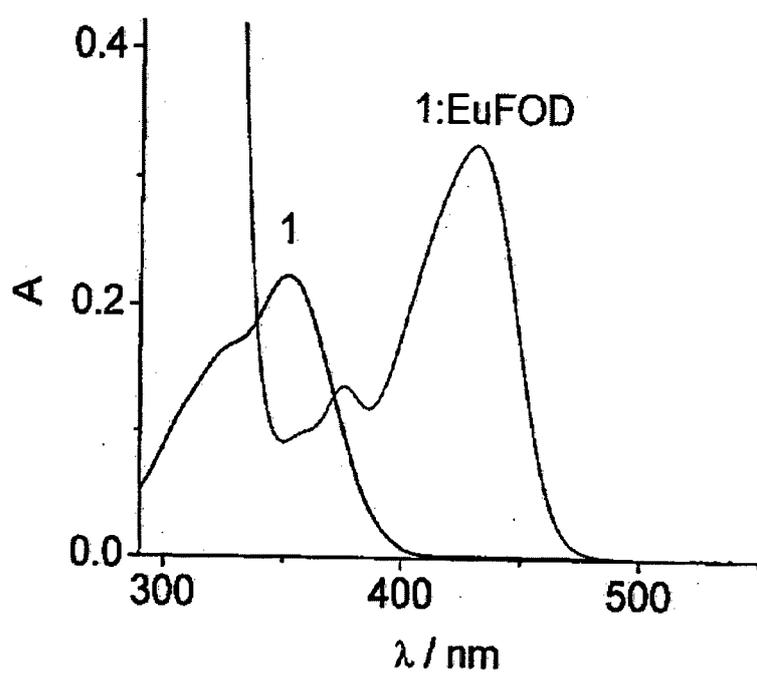


Fig. 2

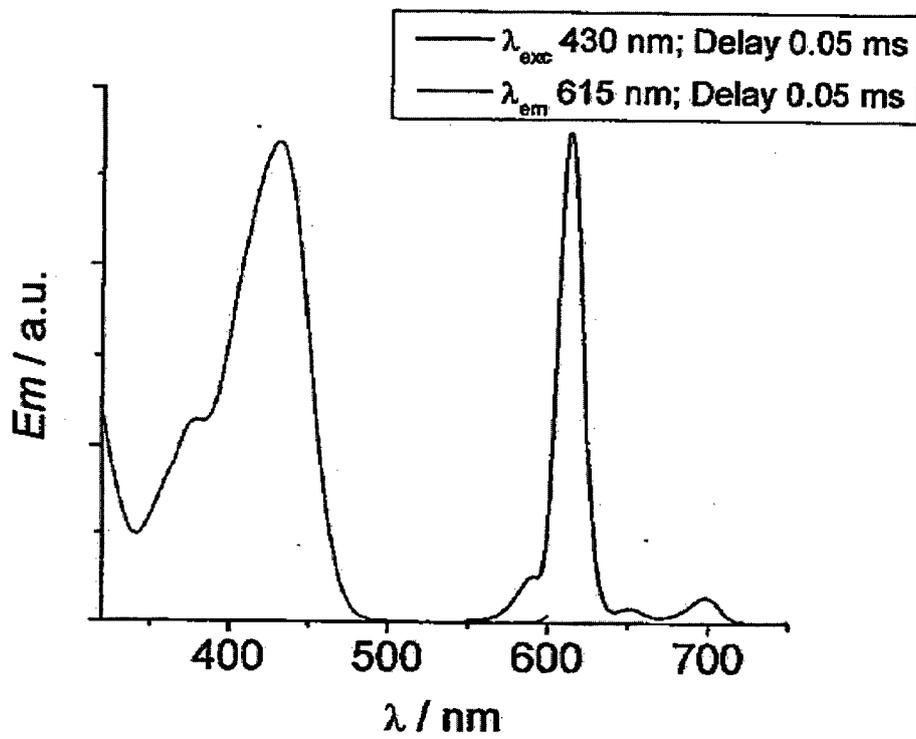
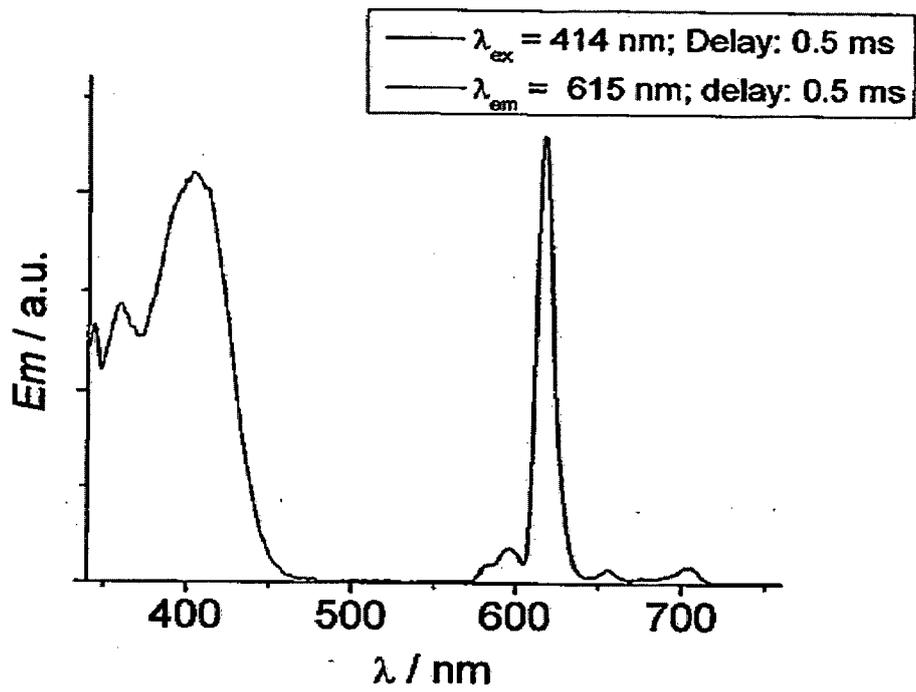


Fig. 3