



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 20 809 T2 2004.04.01

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 019 722 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 20 809.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/01429

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 904 060.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/028447

(86) PCT-Anmeldetag: 30.01.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 07.08.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 19.07.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 09.04.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 01.04.2004

(51) Int Cl.⁷: G01N 33/533

C09B 69/10

(30) Unionspriorität:

595092 01.02.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL

(73) Patentinhaber:

Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill., US

(72) Erfinder:

BIENIARZ, Christopher, Highland Park, US; HUFF, B., Jeffrey, Park Ridge, US; CORNWELL, J., Michael, Skokie, US; TATA VENKATA, R., Seshagiri, Chicago, US

(74) Vertreter:
Schieber und Kollegen, 80469 München

(54) Bezeichnung: DURCH GRUPPEN ERWEITERTE FLUOROPHORE POLYMERE, DIE EINE HYDROPHOBEN UND KONFORMATIV EINGESCHRANKTE MIKROUMGEBUNG SCHAFFEN

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 eingereicht, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft fluoreszierende Farbstoffe, die in verschiedenen Assays nützlich sind, und ausdrücklicher betrifft sie polymere Farbstoffe, worin die Fluoreszenz gesteigert wird, indem mindestens teilweise fluorophore Anteile beherbergt werden mit Anteilen, die eine hydrophobe und konformationseinschränkende Mikroumgebung bereitstellen.

2. Erörterung des Stands der Technik

[0002] Eine Vielzahl von Assayverfahren wird bei quantitativen und qualitativen Analysen von chemischen und biochemischen Mischungen eingesetzt. Ein Assayverfahren, das als "Fluoreszenz" bezeichnet wird, ist in vielen biochemischen Studien nützlich. Dieses Assayverfahren nutzt eine fluoreszierende Chemikalie, um bestimmte Moleküle zu markieren, um diese Moleküle von nicht markierten, aber ähnlichen Molekülen zu unterscheiden. Eine Chemikalie wird als fluoreszierend angesehen, wenn sie Licht bei einer gegebenen Wellenlänge (der "Anregungswellenlänge") absorbiert und Licht bei einer größeren Wellenlänge (der "Emissionswellenlänge") emittiert. Die fluoreszierenden Chemikalien, die in diesem Assaytyp verwendet werden, werden häufig als fluoreszierende Farbstoffe bezeichnet.

[0003] Es gibt zahlreiche optische Verfahren zur Detektion fluoreszierender Farbstoffe, die in Fluoreszenzassays eingesetzt werden. Ein solches Verfahren ist die Durchflusszytometrie. Die Durchflusszytometrie wird in Fluoreszenzassays eingesetzt, um einzelne Moleküle oder Zellen zu identifizieren, und um diese Moleküle oder Zellen von einer Mischung zu trennen oder zu unterscheiden. In einem typischen Durchflusszytometrieverfahren wird ein fluoreszierender Farbstoff an einen Antikörper gebunden. Der Antikörper ist spezifisch für ein Antigen von einem bestimmten Molekül oder ein Zelloberflächenmolekül von einer bestimmten Zelle, das nachgewiesen werden soll. Das Verknüpfen des Antikörpers und des fluoreszierenden Farbstoffs wird als "Konjugation" bezeichnet, und der verknüpfte Antikörper-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex wird als ein "Konjugat" bezeichnet.

[0004] Nachdem ein geeigneter Antikörper und ein geeigneter Farbstoff verknüpft worden sind, um ein Konjugat zu bilden, wird das Konjugat zu einer Mischung hinzugegeben, von der vermutet wird, dass sie das gesuchte Antigen oder Zelloberflächenmolekül enthält, das detektiert werden soll. Wenn das Konjugat zu der Mischung hinzugegeben ist und geeignete Bedingungen eingehalten werden, bindet der Antikörper des Konjugats an das Antigen oder Zelloberflächenmolekül. Die ganze Mischung, in welcher das Antigen oder Zelloberflächenmolekül enthalten ist und zu welcher das Konjugat hinzugegeben wurde, wird dann einem Laserstrahl der Anregungswellenlänge für den speziellen fluoreszierenden Farbstoff ausgesetzt. Der Laserstrahl dieser Wellenlänge verursacht, dass die Moleküle oder Zellen, die das gebundene Antikörper-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat enthalten, fluoreszieren. Das Durchflusszytometer kann die Menge, an Laserlicht detektieren und messen, die durch das gebundene Molekül oder die gebundene Zelle gestreut wird, und durch diese Messung können quantitative, qualitative und andere Bestimmungen bezüglich des detektierten Antigens oder Zelloberflächenmoleküls vorgenommen werden.

[0005] Es ist typischerweise notwendig gewesen, für eine bessere Detektion Schritte zu unternehmen, um die Intensität der fluoreszierenden Farbstoffe zu erhöhen. Mehrere Mittel sind eingesetzt worden, um die Intensität zu erhöhen. Jedoch gibt es bedeutsame Einschränkungen, die die Wirksamkeit solcher Mittel reduzieren.

[0006] Ein Mittel zur Erhöhung der Intensität von fluoreszierenden Farbstoffen bei einer gegebenen Wellenlänge ist der Mechanismus der Fluoreszenzenergieübertragung gewesen, wodurch eine Übertragung von Energie von einem angeregten Zustand von einem Donatormolekül zu einem Akzeptormolekül vorgenommen wird. Die Übertragung wird normalerweise erreicht, indem ein Fluorophor in die richtige Lage dicht an ein anderes Fluorophor gebracht wird. Wie er hier verwendet wird, bedeutet der Ausdruck "Fluorophor" einen Träger von Fluoreszenz.

[0007] Das erste der dicht positionierten Fluorophore kann durch Licht einer gegebenen Wellenlänge angeregt werden. Dann überträgt das angeregte Fluorophor, statt das Licht einer größeren Wellenlänge zu emittieren, Energie an das zweite Fluorophor. Diese übertragene Energie regt das zweite Fluorophor an, welches dann Licht einer noch größeren Wellenlänge emittiert, als durch das erste Fluorophor emittiert worden wäre. Ein Beispiel für eine solche Energieübertragungsanordnung umfasst Phycobiliprotein-Cyaninfarbstoff-Konjugate. Wenn diese Konjugate einem Laserlicht von etwa 488 nm ausgesetzt werden, wird das Phycobiliprotein angeregt. Das Phycobiliprotein wird dann, ohne selbst auszustrahlen, Energie an das Cyaninfluorophor mit der Anregungswellenlänge des Cyanin übertragen, welche mit der Emissionswellenlänge des Phycobiliproteins übereinstimmt, etwa 580 nm. Folglich wird das Cyaninfluorophor dadurch angeregt und emittiert anschließend

Licht seiner Emissionswellenlänge von etwa 680 nm. Dieses Typ Energieübertragungssystem wird häufig als ein "Tandemenergieübertragungssystem" bezeichnet.

[0008] Energieübertragung ist aus mehreren Gründen kein sehr einfaches Mittel zur Erhöhung der Fluoreszenz. Zwei grundlegende Anforderungen bei der Energieübertragung sind ein geeignetes relatives räumliches Abstandsverhältnis der Donator- und Akzeptormoleküle und ein geeignetes relatives Winkelverhältnis der Absorptions- und Emissionsdipole der zwei Moleküle. Diese grundlegenden Verhältnisse zu erhalten und beizubehalten ist unter vielen Umständen extrem schwierig, wenn nicht gar unmöglich. Zusätzlich gibt es viele andere Anforderungen, einschließlich Überlappung des Emissionsspektrums des Donators mit dem Absorptionspektrum des Akzeptors, Stabilität der Fluorophore, Änderung der Fluoreszenzmerkmale nach Konjugation, Quantenausbeute der Übertragung, unspezifische Bindung der Fluorophore an andere Verbindungen, und andere. Das Beseitigen der Notwendigkeit, diesen Anforderungen gerecht zu werden, wäre eine Verbesserung auf dem Gebiet.

[0009] Ein anderes Mittel zur Erhöhung der Fluoreszenzintensität von fluoreszierenden Farbstoffen ist, eine Vielzahl von Fluorophoren an ein Polymer anzulagern und das Polymer an einen Antikörper anzulagern. In dieser Anordnung kann jedes der Fluorophore, die an das Polymer angelagert sind, durch ein Laserlicht angeregt werden und Licht bei seiner Emissionswellenlänge emittieren. Jedoch ist die Verwendung von Polymeren für diesen Zweck im Allgemeinen nicht wirksam gewesen. Das Hauptproblem, das bei Polymeren angetroffen wird, ist, dass wenn eine Vielzahl von Fluorophoren zufällig an einem einzelnen Polymer angeordnet ist, daraus Signallösung zwischen den Fluorophoren resultiert. Weiter ist, selbst wenn das Polymer/Antikörper-Konjugat wegen der Vielzahl von Fluorophoren eine größere sich anhäufende Menge von Licht emittiert, nur die Emissionswellenlänge das, was auf die einzelnen Fluorophore anwendbar ist. Fluorophore nach dem Stand der Technik haben einen begrenzten Bereich von Wellenlängenveränderung zwischen Anregungswellenlänge und Emissionswellenlänge gehabt. Es wäre wünschenswert, sowohl ein Polymer bereitzustellen, an welches eine Vielzahl von Fluorophoren ohne Lösung angelagert werden könnte, als auch einen fluoreszierenden Farbstoff, der Licht einer Wellenlänge emittiert, die viel größer ist als die Anregungswellenlänge. Eine solche Polymeranordnung und ein solcher Wellenlängenbereich würden eine genauere Detektion ermöglichen.

[0010] Noch ein anderes Mittel zur Erhöhung der Intensität von fluoreszierenden Farbstoffen umfasst die Verwendung von Cyclodextrinen. Cyclodextine sind gut bekannte wasserlösliche zyklische Oligosaccharide mit einem hydrophoben mittigen Hohlraum und einem hydrophilen Randbereich. Allgemein ist die Form eines Cyclodextrin-Moleküls im Wesentlichen zylindrisch, wobei ein Ende der Zylinders eine größere Öffnung aufweist als das andere. Die kleinere Öffnung ist als der erste Rand bekannt und die größere Öffnung ist als der zweite Rand bekannt. Ein Hohlraum, in welchen kleine Moleküle durch den größeren zweiten Rand eintreten können, ist zwischen den zwei Öffnungen des Cyclodextrin-Moleküls vorhanden, und in wässrigen Systemen stellt dieser Hohlraum eines Cyclodextrin-Moleküls eine hydrophobe Mikroumgebung bereit zur Komplexbildung von hydrophoben Molekülen mit niedrigem Molekulargewicht. Das Cyclodextrin-Molekül agiert als ein Wirt für das hydrophobe Molekül mit niedrigem Molekulargewicht, d. h. den Gast.

[0011] Wie in WO-A-95 02700 offenbart, sind Anstrengungen, polymere Cyclodextine zu erzeugen, unternommen worden in einem Versuch, die Fluoreszenz zu erhöhen, die mit Fluorophoren verbunden ist. Theoretisch können die Komplexbildungseigenschaften eines einzelnen Cyclodextrin-Moleküls vergrößert werden, indem sich mehrere Cyclodextrin-Moleküle in nächster Nähe zueinander befinden, aus dem Grund, dass mehrere Cyclodextrin-Moleküle in nächster Nähe zueinander die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass ein Gastmolekül in den Hohlraum eines Cyclodextrins eindringen wird. Falls ein polymeres Cyclodextrin erzeugt würde, wäre es theoretisch in der Lage, eine Vielzahl von Gastmolekülen zu beherbergen. Wenn die Gastmoleküle signalerzeugende Gruppen wären, gäbe es weiter mehrere Fluorophore in nächster Nähe zueinander, und die Fluoreszenz, die mit dem Polymer verbunden wäre, wäre größer als die eines einzelnen Fluorophors. Daher wäre theoretisch, falls ein Konjugat hergestellt würde mit einem polymeren Cyclodextrin, das eine Vielzahl von Fluorophoren enthält, die Fluoreszenz des Polymers größer als die eines Konjugats, das ein einziges Fluorophor umfasst.

[0012] Mehrere polymere Cyclodextine sind hergestellt worden, um die oben beschriebene Theorie zu validieren. Jedoch leiden diese Polymere an Problemen, die ihre Wirksamkeit ernsthaft begrenzen. Die polymeren Cyclodextine werden synthetisch hergestellt unter Verwendung von Cyclodextrin-Monomeren, die modifiziert worden sind, um mehrere reaktive Gruppen an dem ersten und zweiten Rand des Cyclodextrin-Moleküls zu enthalten, wodurch es diesen Monomeren ermöglicht wird, über ihre ersten und zweiten Ränder zu reagieren und über ihre vielfachen reaktiven Gruppen vielfach zu reagieren. Wenn ein Cyclodextrin-Molekül durch seinen zweiten Rand gebunden wird, ist die größere Öffnung des hydrophoben Hohlraums behindert. Als ein Ergebnis ist es schwierig für ein Gastmolekül, in den Hohlraum des Cyclodextrin-Moleküls zu gelangen, und die Nützlichkeit von Cyclodextrin als einem Wirt ist beeinträchtigt. Weiter führen Polymere, die von Cyclodextrin-Monomeren mit vielfachen reaktiven Gruppen abgeleitet sind, zu einem hohen Grad von Quervernetzung. Wenn Quervernetzung auftritt, werden nicht nur die Cyclodextrin-Moleküle durch die zweiten Ränder gebunden, was

die zuvor genannten Probleme verursacht, sondern es bildet sich eine Matrix von Cyclodextrinen. Folglich ist die Zahl der polymerisierten Cyclodextrin-Monomere begrenzt, und viele der polymerisierten Cyclodextrin-Monomere werden innerhalb der Matrix begraben. Obwohl viele Cyclodextrin-Moleküle in nächster Nähe sind, haben sehr wenige von ihnen zugängliche zweite Öffnungen und es können sich sehr wenige Gast/Wirt-Komplexe bilden.

[0013] WO 95/02700 offenbart ein Konjugat, das ein spezifisches Bindungsglied umfasst, welches kovalent an mindestens ein hochfluoreszierendes Polymer gebunden ist, das ein Gerüst-Polymer umfasst, an welches fluoreszierende Verbindungen direkt gebunden sind. Alternativ können an dem Gerüst-Polymer Cyclodextrin-Moleküle kovalent gebunden sein, und die fluoreszierenden Verbindungen können innerhalb der hydrophoben Mikroumgebungen der Cyclodextrin-Moleküle beherbergt sein, wodurch die signalerzeugenden Gruppen indirekt mit dem Polymer verbunden sind. Wenn die fluoreszierenden Verbindungen direkt an das Gerüst-Polymer gebunden sind, können Cyclodextrin-Moleküle zu dem Polymer indirekt hinzugefügt werden, indem sie mit den gebundenen signalerzeugenden Gruppen verbunden werden, oder Cyclodextrin kann zu dem fluoreszierenden Polymer hinzugegeben werden, indem Cyclodextrin daran kovalent gebunden wird.

[0014] Ein anderes Mittel zur Erhöhung der Intensität von fluoreszierenden Farbstoffen ist die vornüftige Auswahl eines geeigneten Farbstoffs unter den vielen fluoreszierenden Farbstoffen, aus welchen gewählt werden kann. Es ist gängige Praxis gewesen, natürlich vorkommende Substanzen als fluoreszierende Farbstoffe für Fluoreszenzprüfungen einzusetzen. Die gebräuchlicheren natürlich vorkommenden Farbstoffe umfassen Phycobiliproteine wie Phycoerythrin und andere. Wie zuvor im Zusammenhang mit der Besprechung der Energieübertragung erwähnt, werden Phycobiliproteine in einigen Tandemenergieübertragungssystemen immer noch verwendet. Jedoch präsentieren Phycobiliproteine bestimmte Probleme in ihrer Verwendung. Ein besonderes Problem bei Phycobiliproteinen ist ihre Instabilität. Aussetzung gegenüber Licht und andere Umwelteffekte können Photobleichung verursachen, wodurch Fluoreszenzassays nachteilig beeinträchtigt werden.

[0015] In den letzten Jahren sind viele synthetische fluoreszierende Farbstoffe hergestellt und für Fluoreszenzassays verwendet worden. Eine gut bekannte Klasse von fluoreszierenden Farbstoffen sind die Cyaninfarbstoffe. Diese Farbstoffe sind Polymethinfarbstoffe, die den -N-(-C=C-C)_n=N-Anteil enthalten.

[0016] Cyanin-Fluoreszenzfarbstoffe weisen ebenfalls Probleme auf, wenn sie in biologischen Fluoreszenzprüfverfahren wie in der Durchfluszytometrie eingesetzt werden. Zum Beispiel sind viele dieser Farbstoffe teuer in der Anwendung und schwer herzustellen. Weiter haben viele der Cyaninfarbstoffe kein ausreichend großes Intervall, d. h. Stokessche Verschiebung, zwischen ihrer Anregungswellenlänge und ihrer Emissionswellenlänge, um für Fluoreszenzdetektionsverfahren wirksam zu sein ohne Nutzung von Energieübertragung unter Einschluss eines anderen Fluorophors. Jene Farbstoffe, die ein genügend großes Intervall zwischen Anregungswellenlänge und Emissionswellenlänge besitzen, sind oftmals umweltempfindlich.

[0017] Chemical Abstracts, 1969, 71(8): 97, Abstract 71892u, offenbart polymere Farbstoffe, die ein nukleophiles Kohlenstoffgerüst umfassen, woran eine Ethinylpyridingruppe kovalent gebunden ist, an welche elektrophile signalerzeugende Gruppen, zusammengesetzt aus einem aromatischen Anteil von der Formel p-Me₂NC₆H₄, p-Et₂NC₆H₄ oder p-Et₂NC₆H₄CH:CH, durch eine Ethenylenverknüpfung gekoppelt sind. WO-A-8605505 offenbart polymere Farbstoffe, die ein nukleophiles Kohlenstoffgerüst umfassen, welches -CH₂-CH₂-N (Phenyl) -CH₂-CH₂-X- ist, wobei X zum Beispiel -OCOO- sein kann, an welches ein heterozyklischer Anteil, der ein Stickstoffatom enthält, durch eine Ethenylenverknüpfung gekoppelt ist.

[0018] Eine andere Klasse von fluoreszierenden Farbstoffen, die zur Verwendung in biologischen Prüfverfahren in Betracht gezogen worden ist, schließt die Aminostyrylpyridinium-Farbstoffe ein. Wegen ihrer Umweltempfindlichkeit sind diese Farbstoffe als ungeeignet für Fluoreszenzmarkierungsanwendungen wie Durchfluszytometrie betrachtet worden. Die Umweltempfindlichkeit von Aminostyrylpyridinium-Farbstoffen ist gut untersucht und beschrieben von Anthony C. Stevens et al., "Synthesis of Protein-Reactive (Aminostyryl)pyridinium Dyes", Bioconjugate Chem., 1993, 4, 19–24.

[0019] Es wäre wünschenswert, einen fluoreszierenden Farbstoff zu entwickeln, wodurch die Notwendigkeit zur Energieübertragung beseitigt wird, und Probleme, die mit Umweltempfindlichkeit verbunden sind, überwunden werden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

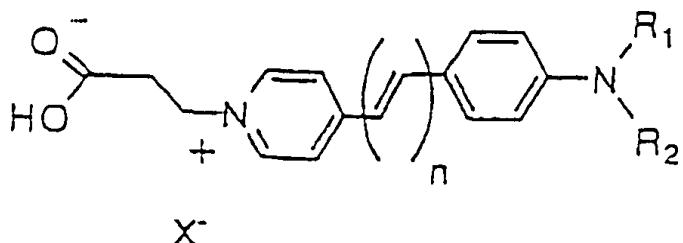
[0020] Unter einem Gesichtspunkt schließt diese Erfindung einen polymeren Farbstoff ein, der eine polymere Einheit umfasst, an die eine Vielzahl von signalerzeugenden Gruppen gebunden ist. Der polymere Farbstoff ist vorzugsweise ein hochfluoreszierendes Polymer, in welchem die Zahl der signalerzeugenden Gruppen, die an die polymere Einheit angelagert ist, optimiert ist, um den größten Signalpegel zu erhalten. Der polymere Farbstoff kann synthetisch abgeleitet werden. Der polymere Farbstoff enthält weiter Wirtsanteile, die entweder kovalent an die polymere Einheit gebunden sind oder sich in nächster Nähe zu der polymeren Einheit befinden.

[0021] Die signalerzeugenden Gruppen sind abgeleitet von Farbstoffen, die mindestens einen Anilinanteil besitzen, der an den heterozyklischen Anteil, der mindestens ein Stickstoffatom in dem Heterozyklus enthält,

durch eine ethylenische ungesättigte Verbindungsgruppe gekoppelt ist. Wenn die polymere Einheit nukleophil ist, müssen die signalerzeugenden Gruppen elektrophil sein. Wenn die polymere Einheit elektrophil ist, müssen die signalerzeugenden Gruppen nukleophil sein. Wenn die polymere Einheit nukleophil ist, kann sie Wiederholungseinheiten enthalten gewählt aus der Gruppe bestehend aus Acrylamidhydrazido, Hydrazid und Lysin. Wenn die polymere Einheit elektrophil ist, kann sie Wiederholungseinheiten enthalten gewählt aus der Gruppe bestehend aus Acryl-, Glutamin-, Asparagin- und Styrolsulfonsäuregruppe. Wenn die signalerzeugenden Gruppen elektrophil sind, können sie Carbonsäuregruppen enthalten. Wenn die signalerzeugenden Gruppen nukleophil sind, können sie Amingruppen oder Hydrazidgruppen oder Amingruppen sowie Hydrazidgruppen enthalten.

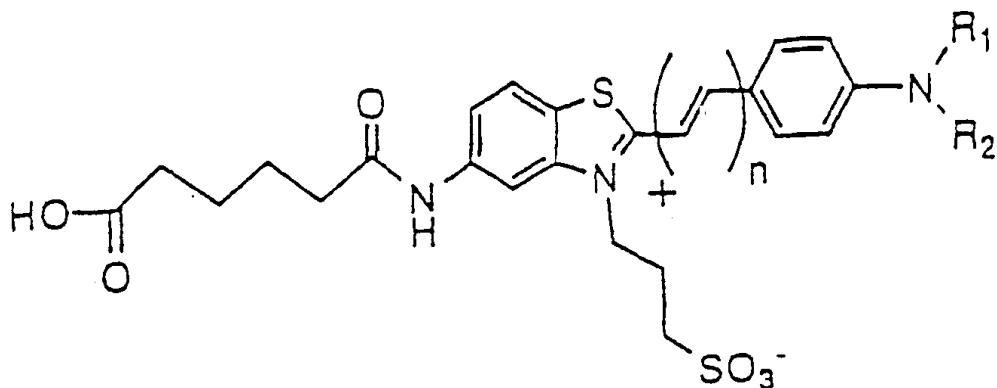
[0022] Der Wirtsanteil kann an die polymere Einheit kovalent gebunden sein, aber er braucht nicht kovalent an die polymere Einheit gebunden zu sein. Der Wirtsanteil kann an eine andere Einheit als die polymere Einheit angelagert sein, an welche die synthetischen signalerzeugenden Gruppen angelagert sind. Der Wirtsanteil ist ein hydrophober und konformationseinschränkender Anteil, gewählt aus der Gruppe bestehend aus Anteilen von Cyclodextrinen, Carceranden, Calixiranen, molekularen Spalten, Cucurbiterilien und Cyclophanen. Der Wirtsanteil ist vorzugsweise ein Cyclodextrin, besser ein Derivat von β -Cyclodextrinaldehyd. Die signalerzeugenden Gruppen sind empfindlich für Proteine, Nukleinsäuren, Makromoleküle und Lipide in einer normalen Umgebung, aber im Wesentlichen unempfindlich für diese Materialien in dieser hydrophoben und konformati-onseinschränkenden Mikroumgebung.

[0023] Der signalerzeugende Anteil des polymeren Farbstoffs ist vorzugsweise ein Pyridiniumanilinderivat. Das Pyridiniumanilinderivat kann ein Pyridiniumanilinderivat umfassen mit der Formel:



worin R₁ eine Alkylgruppe darstellt, und R₂ eine Alkylgruppe darstellt, und n eine ganze Zahl von 1 bis einschließlich 3 darstellt, und X⁻ ein negativ geladenes Gegenion darstellt.

[0024] In einer anderen Ausführungsform ist der signalerzeugende Anteil des polymeren Farbstoffs ein Benzothiazoliumanilinderivat mit der Formel:



worin R₁ eine Alkylgruppe darstellt, und R₂ eine Alkylgruppe darstellt, und n eine ganze Zahl von 1 bis einschließlich 3 darstellt.

[0025] Unter einem anderen Gesichtspunkt schließt die Erfindung ein Konjugat ein, das ein Glied eines Bindungspaars, wie einen Antikörper, und mindestens einen polymeren Farbstoff dieser Erfindung umfasst, der mit dem vorher genannten Glied eines Bindungspaars konjugiert ist. Die hydrophoben und konformationseinschränkenden Anteile, die mit dem polymeren Farbstoff in Verbindung stehen, sind entweder kovalent oder nicht kovalent an diesen mindestens einen polymeren Farbstoff gebunden.

[0026] Die Erfindung kann in einer Vielzahl von Anwendungen eingesetzt werden einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Multiplexing-Assays, einschließlich Multiplexing durch Multicolor-Fluoreszenzmunoassay, Durchflusszytometrie, Immunphänotypisierungsassays, bildgebende Anwendungen, immunologisches Anfärben, Fluoreszenzmikroskopie, immunchromatographisches Anfärben, Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays (FPIA), Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), Fluoreszenzdetection von Analyten, und andere. Die Erfindung ist besonders wirksam für Durchflusszytometrieanwendungen. Jedoch ist sie nicht auf diese Anwendungen beschränkt, und sie ist tatsächlich geeignet für viele Anwendungen, in welchen Fluoreszenzprüfung

oder -detektion verwickelt ist und welche Problemen unterworfen sind wie jenen, die zuvor mit Bezug auf den Stand der Technik besprochen wurden.

[0027] Ein Verfahren zur Immunphänotypisierung von Zellen gemäß der Erfindung umfasst die Schritte (a) Bereitstellen einer Testprobe, (b) Isolieren von Zellen aus der Testprobe, (c) Durchführen einer Lyse an der Testprobe, (d) Hinzufügen des Konjugats der Erfindung zu der Testprobe und (e) Messen der Fluoreszenz der Testprobe.

[0028] Diese Erfindung verringert die Probleme, die typischerweise mit Phycobiliprotein-Instabilität und Bio-Konjugierbarkeit angetroffen werden zusammen mit den Problemen, die mit der Verwendung von Tandem-systemen in Energieübertragungsverfahren in Verbindung stehen. Zusätzlich sind viele der signalerzeugenden Gruppen, die zur Verwendung in dieser Erfindung nützlich sind, synthetisch. Synthetische signalerzeugende Gruppen sind typischerweise stabiler als natürlich vorkommende Fluorophore.

[0029] Die vorliegende Erfindung verringert die Umweltempfindlichkeit dieser und anderer Farbstoffe, indem diese Farbstoffe mit einer geeigneten und erwünschten Mikroumgebung bereitgestellt werden. Dadurch, dass die Farbstoffe in einer solchen Mikroumgebung fixiert werden, wird die Wirksamkeit der fluoreszierenden Eigenschaften dieser Farbstoffe durch Makroumgebungen, Konjugation oder andere Faktoren nicht signifikant beeinträchtigt.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0030] **Fig.** 1 vergleicht die Fluoreszenzintensität von Farbstoff 1, polymerem Farbstoff 11B und polymerem Farbstoff 11D bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 614 nm.

[0031] **Fig.** 2 vergleicht die Fluoreszenzemission von polymerem Farbstoff 11B und polymerem Farbstoff 11D.

[0032] **Fig.** 3 zeigt die Antwort auf das Fluoreszenzsignal von polymerem Farbstoff 11D als eine Funktion der Konzentration des Polymers. **Fig.** 3 vergleicht außerdem die Fluoreszenz von polymerem Farbstoff 11B mit polymerem Farbstoff 11D bei einer Emissionswellenlänge von 580 nm.

[0033] **Fig.** 4 zeigt die Antwort auf das Fluoreszenzsignal von polymerem Farbstoff 12B frei von Cyclodextrin und in Anwesenheit von Cyclodextrin, das nicht kovalent an die polymere Einheit gebunden ist.

[0034] **Fig.** 5 vergleicht das Fluoresenzspektrum von polymerem Farbstoff 17B mit Cyclodextrin-Modifikation, ohne Cyclodextrin-Modifikation, und mit dem Zusatz vom Cyclodextrin, das nicht kovalent an die polymere Einheit gebunden ist, bei gleicher Cyclodextrinkonzentration von 0,25 mg/ml.

[0035] **Fig.** 6 zeigt die Fluoreszenzantwort von polymerem Farbstoff 17D als eine Funktion der Konzentration von polymerem Farbstoff 17D. **Fig.** 6 zeigt außerdem die Fluoreszenzantwort von polymerem Farbstoff 17B als eine Funktion der Konzentration von polymerem Farbstoff 17B und die Fluoreszenzantwort von polymerem Farbstoff 17B in einem 0,25-mg/ml-Cyclodextrin-Vorratsverdünnungsmittel als eine Funktion der Konzentration von polymerem Farbstoff 17B.

[0036] **Fig.** 7 vergleicht die Fluoreszenz von gereinigtem polymeren Farbstoff 13B mit gereinigtem Cyclodextrinamin-modifiziertem polymeren Farbstoff 13D bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm.

[0037] **Fig.** 8 vergleicht die Fluoreszenz des natürlichen Phycobiliproteins Phycoerythrin und von polymerem Farbstoff 14D auf einer Mol-zu-Mol-Basis bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm.

[0038] **Fig.** 9A und **Fig.** 9B vergleichen die Stabilität von polymerem Farbstoff 14D nach 16 Stunden Aussetzung gegenüber Umgebungsraumlicht mit der Stabilität von Phycoerythrin nach 16 Stunden Aussetzung gegenüber dem gleichen Umgebungsraumlicht.

[0039] **Fig.** 10A und **Fig.** 10B zeigen die Nützlichkeit eines Konjugates, das polymeren Farbstoff 11D und IgG-Antikörper umfasst, in einem Durchfluszytometrie-Assay. Beide Assays wurden unter Verwendung von einem Mikrogramm Konjugat und 10 mM Dextransulfat in dem Verdünnungsmittel durchgeführt.

[0040] **Fig.** 11A und **Fig.** 11B zeigen die Nützlichkeit eines Konjugates, das polymeren Farbstoff 11D und IgG-Antikörper umfasst, in einem Durchfluszytometrie-Assay. Beide Assays wurden unter Verwendung von einem Mikrogramm Konjugat und 10 mM Dextransulfat in dem Verdünnungsmittel durchgeführt.

[0041] **Fig.** 12A und **Fig.** 12B zeigen die Nützlichkeit eines Konjugates, das polymeren Farbstoff 11D und IgG-Antikörper umfasst, in einem Durchfluszytometrie-Assay. Beide Assays wurden unter Verwendung von einem Mikrogramm Konjugat und 10 mM Dextransulfat in dem Verdünnungsmittel durchgeführt.

[0042] **Fig.** 13A und **Fig.** 13B vergleichen die Leistung von kommerziell erhältlichen Anti-CD8-Phycoerythrin-Cyanin-Tandemkonjugaten, die Anti-CD8-Antikörper und Phycoerythrin-Cyaninfarbstoff (Dako) umfassen, mit einem Konjugat, das Anti-CD8-Antikörper und polymeren Farbstoff 12D umfasst, zum Anfärben von Lymphozyten bei der Durchfluszytometrie.

[0043] **Fig.** 14 zeigt alpha (α)-, beta (β)- und gamma (γ)-Cyclodextreine und das System zur Nummerierung der Glukoseeinheiten darin.

AUSFÜHLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0044] Die folgenden Definitionen sind auf diese Offenbarung anwendbar:

[0045] Der Ausdruck "Analyt", wie er hier verwendet wird, bezeichnet eine Verbindung oder Zusammensetzung, die nachgewiesen werden soll. Ein Analyt hat mindestens ein Epitop oder eine Bindungsstelle. Ein Analyt kann jede Substanz sein, für welche es ein natürlich vorkommendes Bindungsglied gibt, oder für welches ein Bindungsglied hergestellt werden kann. Analyte umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Toxine, organische Verbindungen, Proteine, Peptide, Mikroorganismen, Zellen, die in humanem und tierischem Blut enthalten sind, Zelloberflächenantigene, Nukleinsäuren, Hormone, Steroide, Vitamine, Drogen (einschließlich solcher, die für therapeutische Zwecke verabreicht werden, als auch solcher, die illegal genommen werden), Viruspartikel, und Metabolite von oder Antikörper zu den vorhergehenden Substanzen. Repräsentative Beispiele für Analyte umfassen Ferritin; Creatinin-Kinase MIB (CK-MB); Digoxin; Phenytoin; Phenobarbitol; Carbamazepin; Vancomycin; Gentamycin; Theophyllin; Valproinsäure; Chinidin; Luteinisierungshormon (LH); Follikel-stimulierendes Hormon (FSH); Estradiol, Progesteron; IgE-Antikörper; Vitamin-B2-Mikroglobulin; glykosyliertes Hämoglobin (Gly. HB); Cortisol; Digitoxin; N-Acetylprocainamid (NAPA); Procainamid; Antikörper gegen Rubella wie Rubella-IgG und Rubella-IgM; Antikörper gegen Toxoplasmose, wie Toxoplasmose-IgG (Toxo-IgG) und Toxoplasmose-IgM (Toxo-IgM), Testosteron; Salicylate; Acetaminophen; Hepatitis-B-Virus-Oberflächen-Antigen (HBsAg)-Antikörper gegen Hepatitis-B-Core-Antigen wie Anti-Hepatitis-B-Core-Antigen-IgG und -IgM (Anti-HBc); humarer Immundefizienzvirus 1 (HIV) und 2 (HTLV); Hepatitis-B-e-Antigen (HBeAg); Antikörper gegen Hepatitis-B-e-Antigen (Anti-HBe); Thyroid-stimulierendes Hormon (TSH); Thyroxin (T4); freies Triiodthyronin (freies T3); karzinoembryonales Antigen (CEA); und Alpha-Fetoprotein (AFP); und Arzneistoffe für den Missbrauch und kontrollierte Substanzen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Amphetamin; Methamphetamine; Barbiturate wie Amobarbital, Secobarbital, Pentobarbital, Phenobarbital und Barbital; Benzodiazepine wie Librium und Valium; Cannabinoide wie Haschisch und Marihuana; Kokain; Fentanyl; LSD; Methapualon; Opiate wie Heroin, Morphin, Codein, Hydromorphon, Hydrocodon; Methadon, Oxycodon, Oxymorphone und Opium; Phencyclidin und Propoxyphen. Der Ausdruck "Analyt" schließt alle antigenen Substanzen, Haptene, Antikörper, Makromoleküle und Kombinationen davon ein.

[0046] Der Ausdruck "Cyclodextrin", wie er hier verwendet wird, bezeichnet zusammen α-, β oder γ-Cyclodextrin, sofern nicht irgendwie sonst angegeben ist, dass es sich um ein spezielles dieser Cyclodextreine handelt.

[0047] Der Ausdruck "optimiertes hoch-fluoreszierendes Polymer", wie er hier verwendet wird, bezeichnet eine polymere Einheit, an der eine Vielzahl von signalerzeugenden Gruppen immobilisiert sind. Die immobilisierten signalerzeugenden Gruppen sind an die polymere Einheit angelagert auf eine solche Art und Weise, dass das Signal maximiert wird, das von den signalerzeugenden Gruppen erzeugt wird, und der Löscheffekt minimiert wird, der damit in Verbindung steht, dass eine Vielzahl von signalerzeugenden Gruppen zu eng zueinander angeordnet ist.

[0048] Der Ausdruck "Primärreagenz", wie er hier verwendet wird, bezeichnet ein Reagenz, das einen Analyten spezifisch bindet. Das Primärreagenz wird als eine Brücke verwendet zwischen dem Analyten, an welchen es gebunden ist, und einem Konjugat, welches das Primärreagenz bindet.

[0049] Der Ausdruck "signalerzeugende Gruppe", wie er hier verwendet wird, bezeichnet einen fluoreszierenden Anteil (manchmal als ein Fluorophor bezeichnet), der in der Lage ist, Energie zu absorbieren und Licht zu emittieren oder zu fluoreszieren. Repräsentative Beispiele für Elternfarbstoffe, die signalerzeugende Gruppen bereitstellen, umfassen Aminostyrylpiridinium-Farbstoffe, Benzothiazolanalindien, Benzothiazolpyridiniumtrien, Fluorescein, Kaskadenblau, Texas RedTM, p-Phthalocyanine, Cyaninfarbstoffe, Thiazole, Dansyl, Naphthalen, p-Toluidinylnaphthalensulfonsäure, Coumarin, und Phycoerythrin, Allophycocyanin. Verfahren zum Ableiten signalerzeugenderer Gruppen von den Elternfarbstoffen sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt.

[0050] Der Ausdruck "spezifisches Bindungsglied", wie er hier verwendet wird, bedeutet ein Glied eines spezifischen Bindungspaares. Ein Bindungspaar umfasst zwei verschiedene und unterschiedliche Moleküle, wobei eines der Moleküle an das andere Molekül durch chemische oder physikalische Mittel spezifisch bindet. Zusätzlich zu Antigen- und Antikörperspezifischen Bindungspaaren umfassen andere spezifische Bindungspaare, sind aber nicht beschränkt auf, Avidin und Biotin, Kohlenhydrate und Lectine, komplementäre Nucleotidsequenzen, komplementäre Peptidsequenzen, Effektor- und Rezeptormoleküle, und Enzym-Cofaktor oder Substrat und ein Enzym, ein Enzyminhibitor und ein Enzym, Polymersäuren und Basen, Farbstoffe und Proteinbindemittel, Peptide und spezifische Proteinbindemittel (z. B. Ribonuclease, S-Peptid und Ribonuclease-S-Protein) und dergleichen. Weiterhin können Bindungspaire Glieder umfassen, die Analoga des ursprünglichen Bindungsgliedes sind, zum Beispiel ein Analyt-Analog, oder ein Bindungsglied, das durch rekombinante Verfahren oder Molekülgestaltung hergestellt wird. Wenn das Bindungsglied ein Immunreaktant ist, kann es zum Beispiel ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, ein rekombinantes Protein oder rekombinanter Antikörper, ein chimärischer Antikörper, oder eine Mischung(en) oder Fragment(e) der vorhergehenden sein.

[0051] Der Ausdruck "Testprobe", wie er hier verwendet wird, bezeichnet ein Material, von dem vermutet wird,

das es den Analyten enthält. Die Testprobe kann direkt wie von der Quelle erhalten oder im Anschluss an eine Vorbehandlung zum Modifizieren des Charakters der Probe verwendet werden. Die Testprobe kann von jeder biologischen Quelle erhalten werden, wie physiologische Flüssigkeit, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Blut, Speichel, Augenlinsenflüssigkeit, Cerebrospinalflüssigkeit, Schweiß, Harn, Milch, Aszitesflüssigkeit, Schleim, Synovialflüssigkeit, Peritonealflüssigkeit, Fruchtwasser und dergleichen, und Fermentationsnährlösungen, Zellkulturen und chemische Reaktionsgemische, und dergleichen. Die Testprobe kann vorbehandelt werden vor der Verwendung, wie durch Herstellen von Plasma aus Blut, Verdünnen viskoser Flüssigkeiten und dergleichen. Verfahren zur Behandlung können Filtration, Destillation, Konzentration, Inaktivierung von störenden Komponenten und die Zugabe von Reagenzien sein. Zusätzlich zu biologischen oder physiologischen Flüssigkeiten können andere Typen von Flüssigproben verwendet werden. Repräsentative Beispiele für solche flüssigen Proben umfassen Wasser, Nahrungsprodukte und dergleichen, für die Durchführung von Umwelt- oder Nahrungsproduktionstests. Zusätzlich kann ein festes Material, von dem vermutet wird, dass es den Analyten enthält, als Testprobe verwendet werden. Unter einigen Umständen kann es vorteilhaft sein, eine feste Probe zu behandeln, um ein flüssiges Medium oder Extrakt des Analyten zu bilden.

[0052] Unter einem Gesichtspunkt stellt die vorliegende Erfindung einen polymeren Farbstoff bereit, der folgendes umfasst:

- (1) eine polymere Einheit;
- (2) eine Vielzahl von signalerzeugenden Gruppen, die an diese polymere Einheit angelagert sind, wobei diese signalerzeugenden Gruppen abgeleitet sind von einem Farbstoff, der mindestens einen Anilinanteil besitzt, der an einen heterozyklischen Anteil gekoppelt ist, der mindestens ein Stickstoffatom in dem Heterozyklus enthält, durch eine ethylenisch ungesättigte Verbindungsgruppe, wobei mit dem polymeren Farbstoff Wirtsanteile verbunden sind, wobei diese Wirtsanteile hydrophobe und konformationseinschränkende Anteile sind gewählt aus der Gruppe bestehend aus Anteilen von Cyclodextrinen, Carceranden; Calixiranen, molekularen Spalten, Cucurbiterilien und Cyclophanen. Vorzugsweise umfasst der polymeren Farbstoff eine Vielzahl von Wirtsanteilen für diese signalerzeugenden Gruppen. Diese Wirtsanteile sind entweder kovalent an die polymere Einheit gebunden oder in nächster Nähe zu der polymeren Einheit. Wie hier verwendet bedeutet "nächste Nähe" typischerweise durchschnittlich 100 Ångström oder weniger, vorzugsweise durchschnittlich 10 bis 20 Ångström.

Polymere Einheit

[0053] Die signalerzeugenden Gruppen sind an die polymere Einheit angelagert. Die polymere Einheit erleichtert Biokonjugation und Löslichkeit des polymeren Farbstoffs. Zusätzlich ermöglicht die polymere Einheit die Bindung einer Vielzahl von signalerzeugenden Gruppen an eine einzelne Zelle oder ein einzelnes Molekül.

[0054] In der bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die polymere Einheit ein wasserlösliches Polymer mit funktionellen Gruppen, die die Anlagerung von signalerzeugenden Gruppen durch kovalente Bindungen ermöglichen. Vorzugsweise umfasst die polymere Einheit funktionelle Amingruppen wie zum Beispiel: $-C(O)-NH-NH_2$, $-NH_2$, $-NHR$, worin R ein Glied dargestellt gewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkyngruppe mit 1 bis einschließlich 3 Kohlenstoffatomen, Isopropyl, $-(CH_2)_2CO_2-$, $-(CH_2)_2SO_3-$, $-(CH_2)_2NH_3^+$, $-(CH_2)_2NH_2^+$ $(CH_2)_2SO_3-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$ und $-(CHOH)_4CH_2OH$. Die polymere Einheit kann außerdem Kombinationen der oben aufgeführten funktionellen Amingruppen haben. Die polymere Einheit umfasst elektrophile funktionelle Gruppen wie Carboxylgruppen, Sulfonylchloridgruppen und aktivierte Estergruppen. Vorzugsweise hat die polymere Einheit ein Gewichtsmittel des Molekulargewichts oder ein Zahlenmittel des Molekulargewichts von etwa 5.000 bis etwa 500.000, besser von etwa 100.000 bis etwa 250.000, und am besten von etwa 150.000 bis etwa 200.000.

[0055] Wenn signalerzeugende Gruppen an die polymere Einheit durch kovalente Bindungen anzulagern sind, wird bevorzugt, als Vorläufer für signalerzeugende Gruppen Elternfarbstoffe zu verwenden, die eine reaktive Gruppe besitzen, die zur Bildung von kovalenten Bindungen mit den funktionellen Amingruppen der polymeren Einheit geeignet ist. Elternfarbstoffe, die zu einer derartigen Reaktion in der Lage sind, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, jene, die Succinimidyl-aktive Estergruppen, Säurehalogenidgruppen, Sulfonylhalogenidgruppen, Aldehydgruppen, Iodacetylgruppen oder Maleimidgruppen besitzen. Beispiele für jene Elternfarbstoffe, die die zuvor genannten funktionellen Gruppen besitzen können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Hämicyaninfarbstoffe, z. B. Pyridiniumanilinifarbstoffe, Chinoliniumanilinifarbstoffe, Acridiniumanilinifarbstoffe, Benzothiazoliumanilinifarbstoffe, Benzoazoliumanilinifarbstoffe, Benzimidazoliumanilinifarbstoffe, Naphthathiazoliumanilinifarbstoffe, Naphthindoliumanilinifarbstoffe, Naphthoxazoliumanilinifarbstoffe, Naphthimidazoliumanilinifarbstoffe und Indoliumanilinifarbstoffe.

[0056] Wie zuvor beschrieben wird Signallösung verursacht, wenn eine Vielzahl von signalerzeugenden Gruppen an eine einzelne polymere Einheit in nächster Nähe zueinander zufällig kovalent gebunden sind. Lösen kann im Wesentlichen verringert werden, indem die Zahl der signalerzeugenden Gruppen, die an die polymere Einheit kovalent gebunden sind, optimiert wird. Durch Optimierung der Zahl der signalerzeugenden Gruppen, die an die polymere Einheit kovalent gebunden sind, ist das Konjugat der vorliegenden Erfindung in

der Lage, ein Signal zu emittieren, das durch eine Detektionsvorrichtung wie ein Durchflusszytometer besser detektiert werden kann.

Signalerzeugende Gruppe

[0057] Die signalerzeugende Gruppe emittiert Licht mit einer ausreichend langen Wellenlänge bezüglich der Wellenlänge des Anregungslichtes, wodurch ohne die Notwendigkeit eines Energieübertragungsmechanismus und der damit verwandten Probleme ausgekommen wird. Wie hier verwendet bedeutet "ausreichend lang" typischerweise mindestens 50 Nanometer, besser mindestens 100 Nanometer und am besten mindestens 200 Nanometer. Eine Vielzahl von signalerzeugenden Gruppen kann an die polymere Einheit angelagert werden. Selbst wenn die signalerzeugende Gruppe selbst umweltempfindlich sein kann und folglich instabil, und aus diesem Grund begrenzte oder problematische Biokonjugatbildungsfähigkeit haben kann, wird durch eine Vergrößerung durch Wirtsanteile die signalerzeugende Gruppe in einer geeigneten Mikroumgebung fixiert, wodurch die Wirksamkeit der signalerzeugenden Gruppe bewahrt wird.

[0058] Ein große Vielzahl von signalerzeugenden Gruppen kann für die Erfindung verwendet werden. Signalerzeugende Gruppen, die hohe Stokessche Verschiebung zeigen, sind besonders nützlich. Wie hier verwendet reicht eine hohe Stokessche Verschiebung von etwa 50 bis etwa 200 Nanometer.

[0059] Die signalerzeugenden Gruppen werden abgeleitet von Elternfarbstoffen mit mindestens einem Anilinanteil, der an einen heterozyklischen Anteil, der mindestens ein Stickstoffatom in dem Heterozyklus enthält, durch eine ethylenisch ungesättigte Verbindungsgruppe gekoppelt ist.

[0060] Wenn die polymere Einheit nukleophil ist, müssen die signalerzeugenden Gruppen elektrophil sein. Wenn die polymere Einheit elektrophil ist, müssen die signalerzeugenden Gruppen nukleophil sein. Wenn die polymere Einheit nukleophil ist, kann sie zum Beispiel Wiederholungseinheiten enthalten gewählt aus den Gruppen bestehend aus Acrylamidhydrazido, Hydrazid und Lysin. Wenn die polymere Einheit elektrophil ist, kann sie zum Beispiel Wiederholungsgruppen enthalten gewählt aus der Gruppe bestehend aus Acryl-, Glutamin-, Asparagin- und Styrolsulfonsäuregruppe. Wenn die signalerzeugenden Gruppen elektrophil sind, können sie Carbonsäuregruppen enthalten. Wenn die signalerzeugenden Gruppen nukleophil sind, können sie Amingruppen oder Hydrazidgruppen oder Amingruppen sowie Hydrazidgruppen enthalten.

[0061] Repräsentative Klassen für signalerzeugende Gruppen, die für diese Erfindung geeignet sind, umfassen Hämicyaninfarbstoffe, z. B. Pyridiniumanilinifarbstoffe, Chinoliniumanilinifarbstoffe, Acridiniumanilinifarbstoffe, Benzothiazoliumanilinifarbstoffe, Benzoxazoliumanilinifarbstoffe, Benzimidizoliumanilinifarbstoffe, Naphthothiazoliumanilinifarbstoffe, Naphthindoliumanilinifarbstoffe, Naphthoxazoliumanilinifarbstoffe, Naphthimidizoliumanilinifarbstoffe und Indoliumanilinifarbstoffe.

[0062] Allgemein können Elternfarbstoffe für signalerzeugende Gruppen, die für diese Erfindung geeignet sind, dargestellt werden durch die Formel:

[0063]

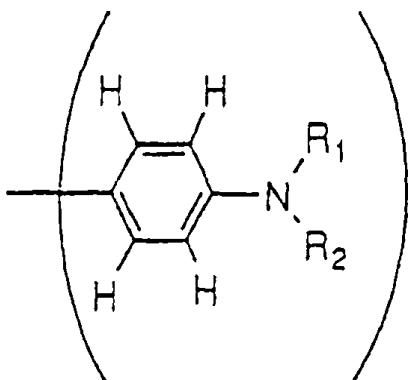
A--L--B

worin A eine heterozyklische Gruppe darstellt:

L eine Verknüpfungsgruppe darstellt; und

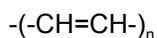
B eine Anilingruppe darstellt.

[0064] Es ist bevorzugt, dass die Gruppe A ein bis drei Ringe enthält. Falls mehr als ein Ring in der heterozyklischen Gruppe eingeschlossen ist, wird vorgezogen, dass sie kondensiert sind. Atome, die in dem heterozyklischen Ring sein können, und zwar andere als die Kohlenstoffatome, sind vorzugsweise Stickstoff-, Sauerstoff- und Schwefelatome. Mindestens ein Stickstoffatom ist in dem heterozyklischen Ring vorhanden. Die Ringatome können andere Substituenten als Wasserstoff enthalten. Jedoch dürfen diese Substituenten die Wechselwirkung zwischen den signalerzeugenden Gruppen und dem Wirtsanteil nicht nachteilig beeinträchtigen. Es ist bevorzugt, dass die Gruppe B die folgende Formel hat:



worin R^1 eine Alkylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt; und R^2 eine Alkylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt.

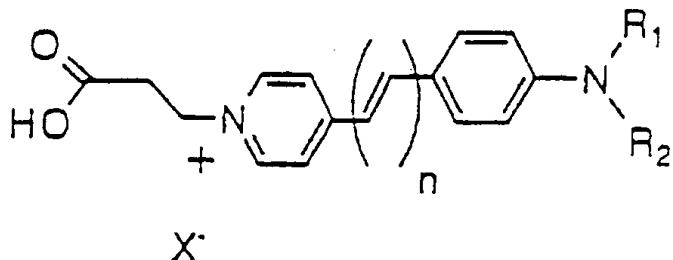
[0065] Die Ringatome von B können andere Substituenten als Wasserstoff enthalten. Jedoch dürfen diese Substituenten die Wechselwirkung zwischen den signalerzeugenden Gruppen und dem Wirtsanteil nicht nachteilig beeinträchtigen. Es wird vorgezogen, dass L die folgende Formel hat:



worin n 1, 2 oder 3 darstellt.

[0066] Auch wenn viele signalerzeugende Gruppen für die Erfindung eingesetzt werden können, umfasst eine bevorzugte signalerzeugende Gruppe synthetische Rminostyrylpyridinium-, Aminostyrylbenzothiazolium-, Chinolinium- und Acridiniumfarbstoffe. Diese Farbstoffe und deren Synthese sind dem Durchschnittsfachmann bekannt. Siehe zum Beispiel Anthony C. Stevens et al., "Synthesis of Protein-Reactive (Aminostyryl)pyridinium Dyes", Bioconjugate Chem., 1993, 4, 19–24.

[0067] Der bevorzugte Pyridiniumanilinfarbstoff ist ein monomeres Aminostyrylfluorogen mit der Formel:

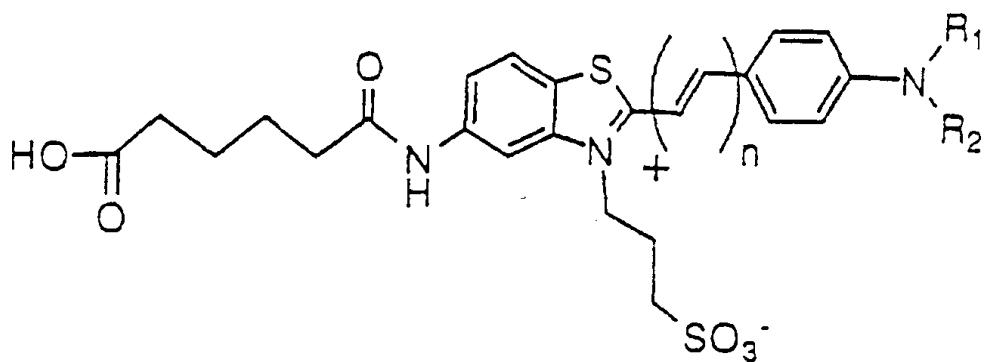


worin R_1 eine Alkylgruppe darstellt, und R_2 eine Alkylgruppe darstellt, und n eine ganze Zahl von 1 bis einschließlich 3 darstellt, und X^- ein negativ geladenes Gegenion darstellt.

[0068] Die Anregungswellenlänge von diesem Farbstoff ist etwa 488 nm und die Emissionswellenlänge ist etwa 580 nm, wenn $n = 1$ ist die Anregungswellenlänge von diesem Farbstoff ist etwa 488 nm und die Emissionswellenlänge ist etwa 680 nm, wenn $n = 2$ ist; und die Anregungswellenlänge von diesem Farbstoff ist etwa 544 nm und die Emissionswellenlänge ist etwa 790 nm, wenn $n = 3$ ist. Dieser besondere Farbstoff, oder ein Amin- oder Carbonsäurederivat davon, kann als der Vorläufer von der signalerzeugenden Gruppe des polymeren Farbstoffs der Erfindung dienen. Außerordentliche Fluoreszenzergebnisse können in Durchflusszytometrieanwendungen erhalten werden, wenn die signalerzeugende Gruppe von diesem Farbstoff abgeleitet ist.

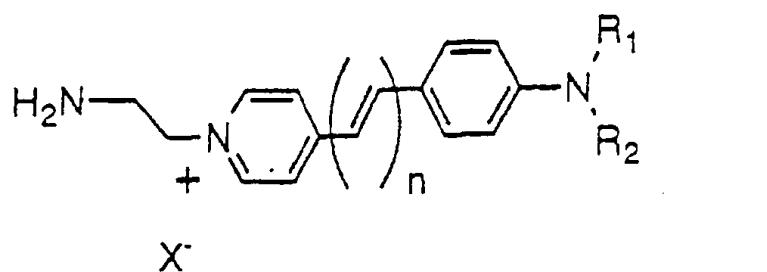
[0069] Wie zuvor beschrieben worden ist, sind die Aminostyrylpyridiniumfarbstoffe für viele der Fluoreszenzassays wie Durchflusszytometrie und andere Fluoreszenzverfahren nicht als geeignet angesehen worden, in erster Linie, da diese Farbstoffe umweltempfindlich sind und die Emissionsintensität in wässrigen Lösungen sehr schwach ist.

[0070] Ein anderer Farbstoff, für den herausgefunden wurde, dass er außergewöhnliche Fluoreszenzeigenschaften besitzt, wenn er als signalerzeugende Gruppe dient, ist Benzothiazoliumanilinfarbstoff mit der folgenden Struktur:

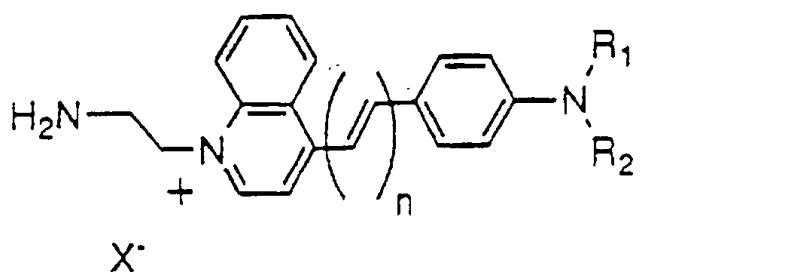


worin R₁ eine Alkylgruppe darstellt, und R₂ eine Alkylgruppe darstellt, und n eine ganze Zahl von 1 bis einschließlich 3 darstellt.

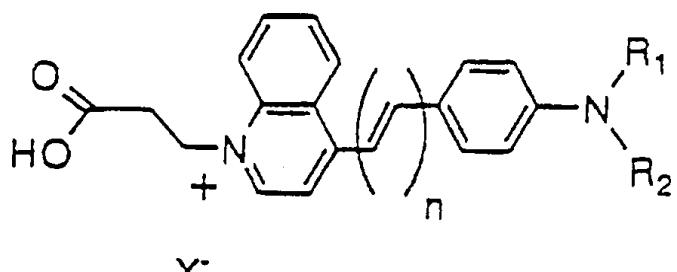
[0071] Die Anregungswellenlänge von diesem Farbstoff ist etwa 488 nm und die Emissionswellenlänge von diesem Farbstoff ist etwa 580 nm, wenn er als Fluorophor in einem Polymer eingesetzt wird, das durch kovalente Anlagerung von β -Cyclodextrinaldehyd vergrößert wurde, wenn n = 1 ist. Die Anregungswellenlänge von diesem Farbstoff ist etwa 488 nm und die Emissionswellenlänge von diesem Farbstoff ist etwa 680 nm, wenn er als Fluorophor in einem Polymer eingesetzt wird, das durch kovalente Anlagerung von β -Cyclodextrinaldehyd vergrößert wurde, wenn n = 2 ist. Die Anregungswellenlänge von diesem Farbstoff ist etwa 488 nm und die Emissionswellenlänge von diesem Farbstoff ist etwa 750 nm, wenn er als Fluorophor in einem Polymer eingesetzt wird, das durch kovalente Anlagerung von β -Cyclodextrinaldehyd vergrößert wurde, wenn n = 3 ist. Bestimmte Analoga von diesem Anilinfarbstoff werden ebenfalls außergewöhnliche Fluoreszenzergebnisse ergeben. Diese Analoga umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, die folgenden Farbstoffe, worin n eine ganze Zahl von 1 bis einschließlich 3 darstellt und X⁻ ein negativ geladenes Gegenion darstellt.



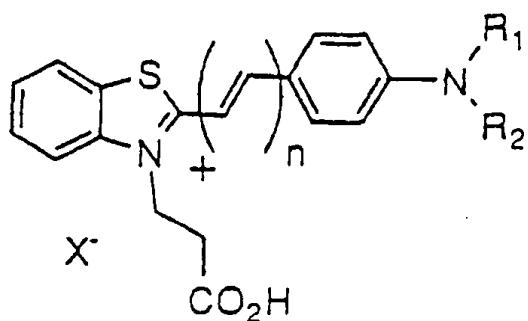
Aminopyridinium manolinium



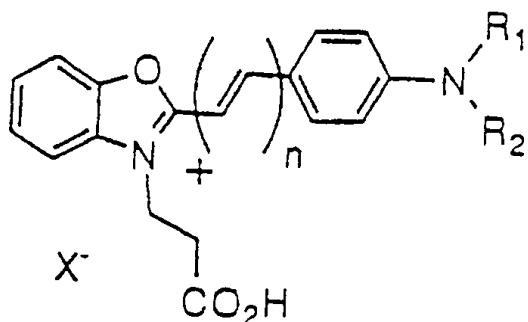
Aminoquinolinium manolinium



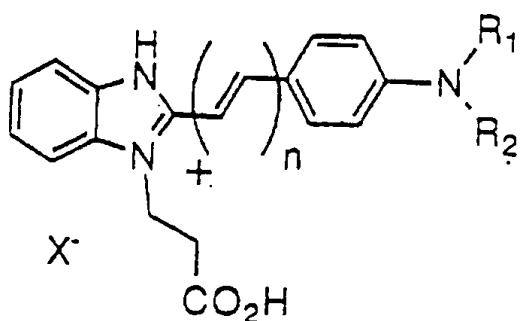
Carboxyquinolinium manolinium



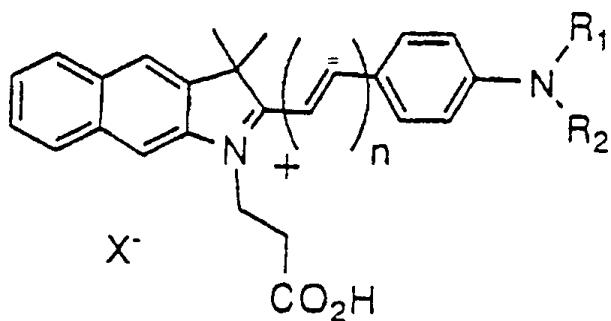
Carboxybenzothiazoliumanilin



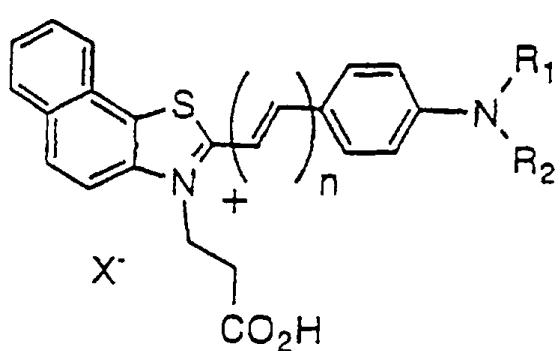
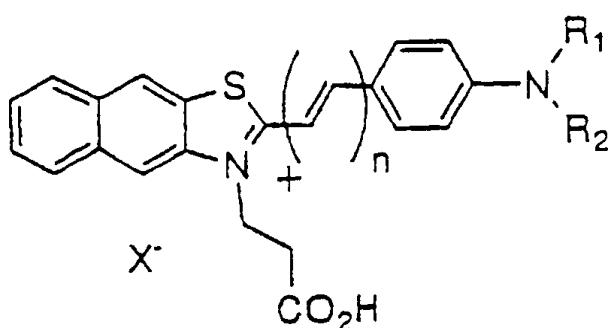
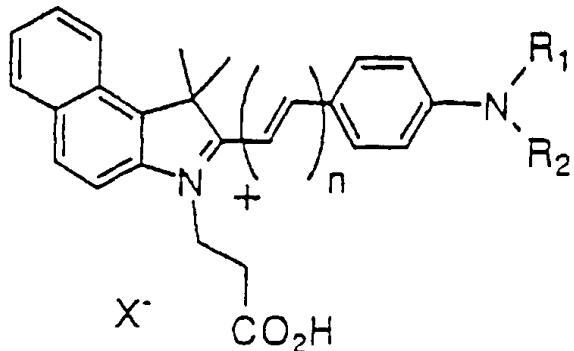
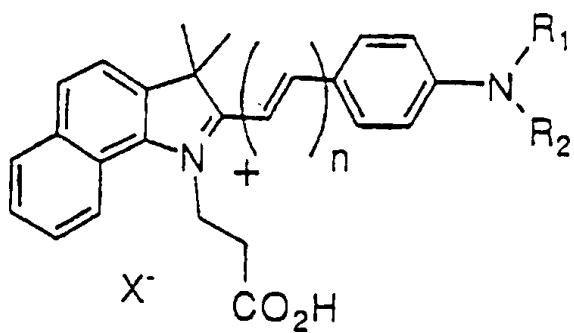
Carboxybenzoxazoliumanilin

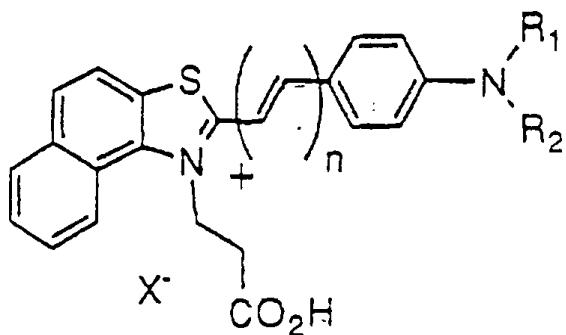


Carboxybenzimidazoliumanilin

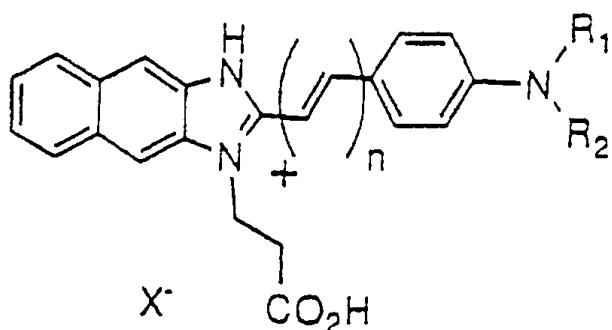


Carboxynaphthindoliumanilin

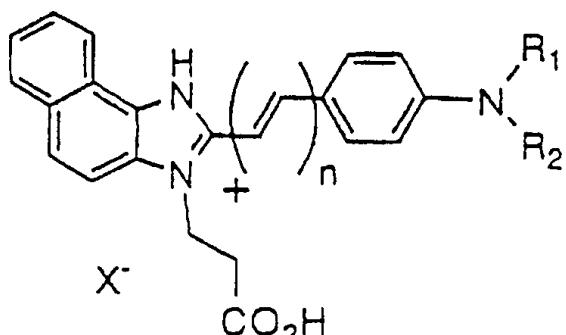




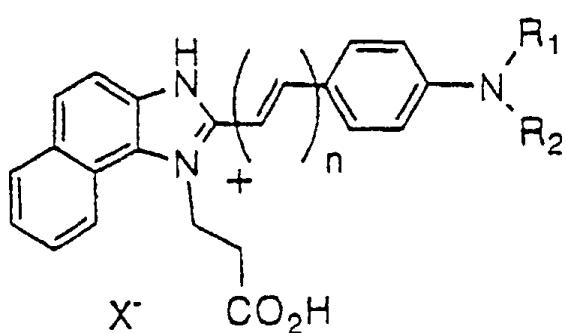
Carboxynaphthothiazoliumanilin



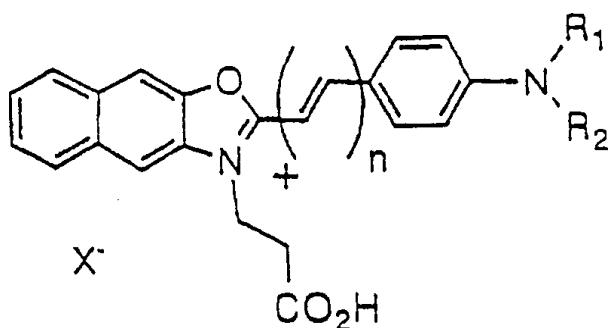
Carboxynaphthimidizoliumanilin



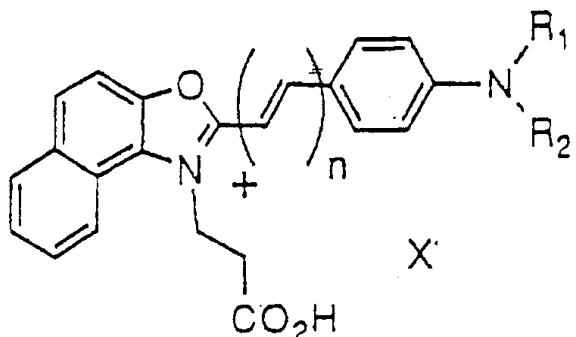
Carboxynaphthimidizoliumanilin



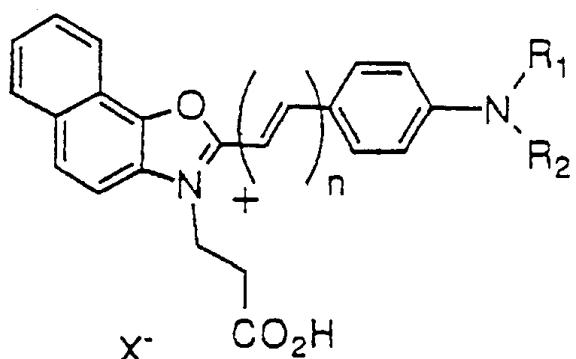
Carboxynaphthimidizoliumanilin



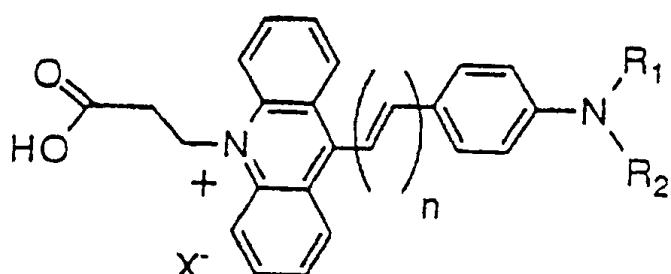
Carboxynaphthoxazoliumanilin



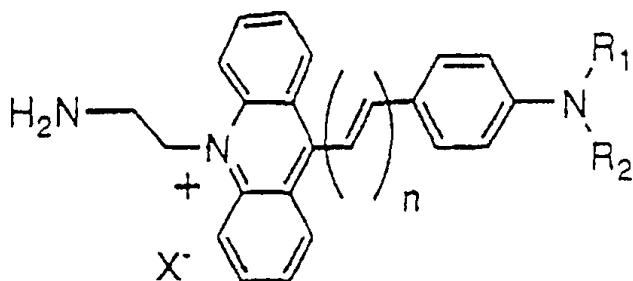
Carboxynaphthoxazoliumanilin



Carboxynaphthoxazoliumanilin



Carboxyacridiniumanilin



Aminoacridiumanilin

[0072] Die Elternfarbstoffe können substituiert sein oder unsubstituiert, d. h. der heterozyklische Abschnitt des Elternfarbstoffs kann andere Substituenten als Wasserstoff enthalten. Weiterhin kann der Anilinabschnitt des Farbstoffs andere Substituenten als Wasserstoff enthalten. Die besondere Natur dieser wahlweisen Substituenten ist nicht kritisch. Jedoch dürfen diese Substituenten die Wechselwirkung der signalerzeugenden Gruppen mit dem Wirtsanteil nicht nachteilig beeinträchtigen. Substituenten, die entweder für den heterozyklischen Abschnitt des Farbstoffs oder den Anilinabschnitt des Farbstoffs geeignet sind, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Alkyl, Alkenyl, Amino, Methoxy, Chlor, Fluor, Brom, Hydroxy und Nitro.

[0073] Der Prozess zur Bindung der signalerzeugenden Gruppen an die polymere Einheit wird als Beladen des Polymers bezeichnet. Jedoch wird geringes Beladen der polymeren Einheit mit signalerzeugenden Gruppen nicht zu einem polymeren Farbstoff führen, der die maximal erreichbare Menge an Fluoreszenz emittiert. Wenn die polymere Einheit überladen wird, kann Löschen resultieren; wenn die polymere Einheit zu wenig beladen wird, werden signalerzeugende Gruppen, die hinzugefügt worden sein könnten, ohne dass sie Löschen erfahren, ausgelassen, was zu einem niedrigeren Pegel als dem maximalen Fluoreszenzpegel führt. Folglich wird bevorzugt, dass die Zahl der signalerzeugenden Gruppen, die an die polymere Einheit angelagert ist, optimiert ist, damit ein Polymer gebildet wird, das in der Lage ist, den größten Pegel an Fluoreszenz zu emittieren.

[0074] Das Optimieren der Zahl der signalerzeugenden Gruppen an einer polymeren Einheit kann erreicht werden, indem eine Reihe von Beladungsvorgängen ausgeführt wird und dann bestimmt wird, welcher Pegel der Beladung den polymeren Farbstoff ergibt, der den größten Signalpegel emittiert. Im Allgemeinen kann diese Prozedur ausgeführt werden, indem ein Feld von Versuchsbeladungen erzeugt wird, das verschiedene Konzentrationen von signalerzeugenden Gruppen mit einer konstanten Menge polymerer Einheit kombiniert. Die beladenen polymeren Einheiten können dann von allen nicht umgesetzten Materialien getrennt werden durch eine Vielzahl von Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, wie Ausfällung, isoelektrische Fokussierung oder, vorzugsweise, Ausschlusschromatographie. Die getrennten Polymere können dann auf ihre Fähigkeit geprüft werden, ein Signal zu erzeugen, um zu bestimmen, welche Beladungskonzentration den polymeren Farbstoff ergibt, der den größten Signalpegel emittiert. Typischerweise ist der polymere Farbstoff, der den größten Signalpegel zeigt, optimal beladen worden, und die Konzentration, bei welcher er beladen wurde, kann für optimale Beladungsmengen der polymeren Einheit für Maßstabsvergrößerungszwecke verwendet werden. Wie hier verwendet bedeutet "optimale Beladung" die Anlagerung einer maximalen Zahl von signalerzeugenden Gruppen an die polymere Einheit, ohne dass Löschen oder nachteilig beeinträchtigte Biokonjugationsfähigkeit hervorgebracht werden.

[0075] Das bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der optimalen Zahl von signalerzeugenden Gruppen zur Anlagerung an eine einzelne polymere Einheit umfasst die folgenden Schritte:

- (1) Berechnen des Molekulargewichts der ausgewählten polymere Einheit;
- (2) Bestimmen der Gesamtmenge reaktiver Gruppen, z. B. funktionelle Amingruppen, die auf der polymeren Einheit vorhanden sind;
- (3) Erzeugen eines Felds bestehend aus einer Reihe von Vorratslösungen, von der jede eine andere Konzentration signalerzeugender Gruppen enthält;
- (4) Laden von signalerzeugenden Gruppen auf die polymeren Einheiten durch Reaktion mit reaktiven Gruppen, z. B. funktionellen Amingruppen;
- (5) Reinigen (Trennen) des beladenen Polymers von nicht umgesetzten Materialien;
- (6) Analysieren von polymeren Farbstoffen auf ihre Fähigkeit, Signale zu emittieren; und
- (7) Maßstabsvergrößerung.

[0076] Die Vorratslösungen umfassen verschiedene Konzentrationen der Farbstoffe mit signalerzeugenden Gruppen, gelöst in einem geeigneten Lösungsmittel wie zum Beispiel Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylsulfoxid (DMSO). Das molare Beladungsverhältnis von signalerzeugenden Gruppen zu reaktiven Gruppen der polymeren Einheit, typischerweise funktionelle Amingruppen, in dem Feld kann folgendermaßen variiert werden: 5%, 10%, 15%, 20%, 40%, 75%, 100%, 140% und 200%. Die Feldkonzentrationen werden vorzugsweise gewählt, dass sie genügend große molare Beladungsverhältnisse umfassen, so dass Löschen auftreten wird,

oder Farbstoff maximal geladen wird, wodurch der Punkt klar beschrieben wird, an welchem die polymere Einheit optimal beladen ist. Nachdem das Feld eingerichtet worden ist, wird jedes Feldglied zu einzelnen und äquimolaren Lösungen der polymeren Einheit hinzugegeben.

[0077] Jede Lösung von beladenem Polymer kann dann getrennt werden von nicht umgesetzter polymerer Einheit und/oder Farbstoffen mit signalerzeugenden Gruppen durch Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Wie zuvor erwähnt können die Polymere, nachdem sie getrennt sind, auf ihre Fähigkeiten analysiert werden, ein Signal zu emittieren, und eine maßstabsvergrößerte Menge von Polymer kann dann unter Verwendung der so erhaltenen Daten hergestellt werden.

[0078] Zusätzliche Optimierungsfelder können ausgeführt werden, um die optimale Beladungskonzentration genauer zu bestimmen. Es sollte natürlich verstanden werden, dass die Art und Weise, durch welche ein Polymer optimiert wird, nicht beschränkt sein soll auf die hierin beschriebenen Verfahren, und dass andere Verfahren ebenso eingesetzt werden können.

[0079] Der polymere Farbstoff kann an ein spezifisches Bindungsglied angelagert werden durch eine Vielzahl von Techniken, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Es wird vorgezogen, den polymeren Farbstoff an dem oder nahe bei dem Fc-Abschnitt eines Antikörpers durch eine kovalente Bindung anzulagern, wodurch ein Konjugat gebildet wird. Während es nicht erwünscht ist, durch irgendeine Theorie gebunden zu sein, werden Vermutungen angestellt, dass das Anlagern des Polymers an einen Antikörper auf diese Art und Weise den Fc-Abschnitt des Antikörpers sterisch behindert, wodurch er daran gehindert wird, zum Beispiel Fc-Rezeptoren zu binden, die auf der Oberfläche bestimmter Zellpopulationen vorhanden sind. Zusätzlich lässt die ortspezifische Anlagerung die bindungsfähigen Regionen der Antikörper unbehindert und in der Lage, ihr beabsichtigtes Ziel zu binden. Es sollte natürlich verstanden werden, dass die Art und Weise, durch welche ein spezifisches Bindungsglied an einen polymeren Farbstoff angelagert wird, nicht beschränkt sein soll auf die hierin beschriebenen Verfahren, und dass andere Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, ebenso eingesetzt werden können.

[0080] Ein polymerer Farbstoff kann an einen Antikörper angelagert werden, um ein Konjugat zu bilden, indem die Fc-Region des Antikörpers oxidiert wird und dann der oxidierte Antikörper mit einem polymeren Farbstoff von dem hierin beschriebenen Typ umgesetzt wird. Der Antikörper wird vorzugsweise oxidiert bei einer Konzentration von etwa 1,0 mg/ml bis etwa 20,0 mg/ml, besser von etwa 1,0 mg/ml bis etwa 10,0 mg/ml, und am besten von etwa 2,0 mg/ml bis etwa 5,0 mg/ml. Falls der Antikörper in Konzentrationen außerhalb dieser Bereiche erhalten wird, kann er eingeengt werden durch Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, oder mit einem geeigneten Puffer verdünnt werden. Der Antikörper wird vorzugsweise oxidiert in einem Puffer mit einem pH von etwa 6,5 bis etwa 8,0, besser von etwa 7,0 bis etwa 8,0, und am besten von etwa 7,5 bis etwa 8,0. Die Oxidation der Fc-Region des Antikörpers kann ausgeführt werden mit einem Oxidationsmittel, das dem Durchschnittsfachmann bekannt ist. Solche Oxidationsmittel umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Natriumperiodat, Brom und dergleichen. Lösungen, die die Oxidationsmittel enthalten, haben typischerweise eine Oxidationsmittelkonzentration von etwa 100 mM bis etwa 250 mM, vorzugsweise etwa 175 mM bis etwa 200 mM. Die Oxidation des Antikörpers kann bei einer Temperatur von etwa 2°C bis etwa 30°C stattfinden. Vorzugsweise findet die Oxidation bei einer Temperatur von etwa 2°C bis etwa 8°C etwa 15 Minuten bis etwa 5 Stunden, vorzugsweise etwa 1 Stunden bis etwa 2 Stunden lang statt. Nachdem der Antikörper oxidiert worden ist, kann er gereinigt werden durch Verfahren, die auf dem Gebiet bekannt sind, und in einen geeigneten Puffer gebracht werden, welcher vorzugsweise einen pH im Bereich von etwa 3 bis etwa 6, besser im Bereich von etwa 4 bis etwa 5 hat. Der oxidierte Antikörper kann dann an den polymeren Farbstoff gekoppelt werden. Es sollte natürlich verstanden werden, dass die Art und Weise, durch welche ein Antikörper oxidiert wird, nicht beschränkt sein soll auf die hierin beschriebenen Verfahren, und dass andere Verfahren, die auf dem Gebiet bekannt sind, ebenso eingesetzt werden können.

[0081] Wenn ein oxiderter Antikörper mit einem polymeren Farbstoff umgesetzt wird, kann sich die Konzentration des polymeren Farbstoffs bewegen von etwa 1,0 mg/ml bis etwa 20,0 mg/ml, vorzugsweise von etwa 2,0 mg/ml bis etwa 5,0 mg/ml, in einem geeigneten Puffer. Puffer, die für diese Reaktion geeignet sind, haben vorzugsweise einen pH im Bereich von etwa 4,0 bis etwa 7,0, besser im Bereich von etwa 4,0 bis etwa 5,0. Geeignete Puffer für die Reaktion umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Triethanolamin, Phosphat. Die Menge an polymerem Farbstoff, die zu dem oxidierten Antikörper hinzugegeben wird, kann sich bewegen von etwa 1,0 bis etwa 20 Äquivalenten polymerer Farbstoff zu einem Äquivalent Antikörper, beruhend auf dem Molekulargewicht des Antikörpers und dem geschätzten Molekulargewicht der polymeren Farbstoffs. Die Reaktion zwischen dem oxidierten Antikörper und dem polymeren Farbstoff kann bei einer Temperatur von etwa 2°C bis etwa 30°C, vorzugsweise von etwa 2°C bis etwa 8°C in einem lichtdichten Behälter stattfinden. Die Reaktion kann etwa 2 bis etwa 48 Stunden lang, vorzugsweise etwa 12 bis etwa 15 Stunden lang laufen gelassen werden. Nach Vollständigkeit der Reaktion kann das Konjugat von den nicht umgesetzten Komponenten des Reaktionsgemisches getrennt werden durch Trennverfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind.

[0082] In Fällen, wo polymere Farbstoffe mit primären oder sekundären funktionellen Amingruppen an ein spezifisches Bindungsglied durch eine kovalente Bindung angelagert werden, wird ein zusätzlicher Schritt be-

vorzogt. Als ein Ergebnis der Anfangsreaktion zwischen dem Antikörper und dem polymeren Farbstoff wird eine Schiffsche Base gebildet, und Reduktion der Schiffschen Base kann erreicht werden durch Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, wie die Verwendung eines geeigneten Reduktionsmittels wie NaCNBH₃, bei einer Konzentration im Bereich von etwa 0,25 mg/ml bis etwa 2,0 mg/ml. Das reduzierte Konjugat kann dann von überschüssigen Reaktanten getrennt werden durch Trennverfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Es sollte natürlich verstanden werden, dass die Art und Weise, durch welche eine Schiffsche Base reduziert wird, nicht beschränkt sein soll ist auf die hierin beschriebenen Verfahren, und dass andere Verfahren ebenso eingesetzt werden können.

[0083] Es wird vorgezogen, dass die signalerzeugenden Gruppen, die kovalent an die polymere Einheit gebunden werden, innerhalb eines hydrophoben Hohlraums von einem Molekül beherbergt werden, das kovalent an die polymere Einheit gebunden ist. In dieser bevorzugten Ausführungsform brauchen die signalerzeugenden Gruppen nicht irgendeine reaktive Gruppe zu besitzen. Jedoch wird, wie vom Durchschnittsfachmann verstanden werden wird, die signalerzeugende Gruppe eine Gruppe sein, die in der Lage ist, durch den besonderen beherbergenden Anteil, der verwendet wird, beherbergt zu werden.

Beherbergender Anteil

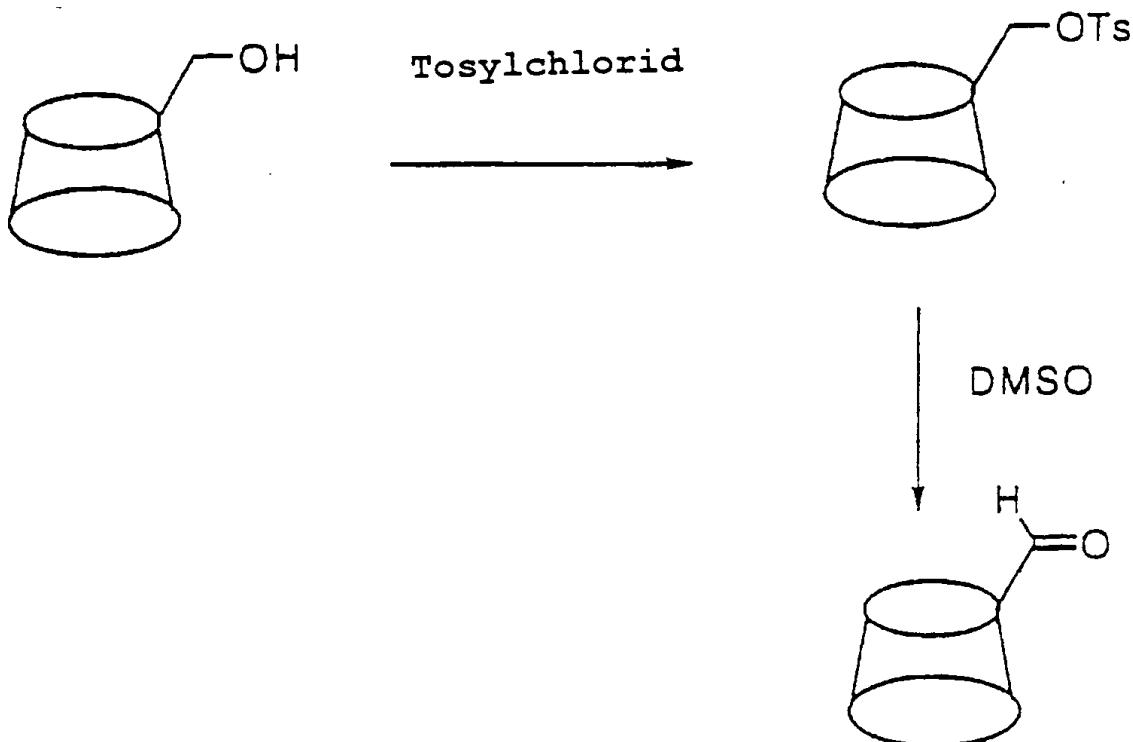
[0084] Der beherbergende Anteil muss eine hydrophobe und konformationseinschränkende Mikroumgebung bereitstellen. Die Hydrophobie ermöglicht dem beherbergenden Anteil, kompatibel mit den signalerzeugenden Gruppen zu sein. Von der Konformationseinschränkung wird angenommen, dass sie die Fluoreszenz der signalerzeugenden Gruppen verbessert. Wirtsanteile, die in der Erfindung verwendet werden, sind durch kleine Moleküle gekennzeichnet, welche gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Anteilen von Cyclodextrinen, z. B. α-Cyclodextrinen, β-Cyclodextrinen, γ-Cyclodextrinen; Carceranden, Calixiranen, molekularen Spalten, Cucurbiterilien und Cyclophanen. Carceranden sind beschrieben in J.-M. Lehn, Struct. Bonding (Berlin) 16 (1973) 1; J.-M. Lehn, Acc. Chem. Res. 11 (1948) 49; P. G. Potvin, J.-M. Lehn in R. M. Izatt, J. J. Christensen (Eds.): Synthesis of Macrocycles: The Design of Selective Complexing Agents (Progress in Macrocycle Chemistry, Vol. 3), Wiley, New York, 1987, S. 167; D. J. Cram, Angew. Chem. 98 (1986) 1041; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 25 (1986) 1039; B. Dietrich, J. Chem. Ed. 62 (1985) 954; und D. J. Cram, K. N. Trueblood, Top. Curr. Chem. 98 (1981) 43. Calixirane sind beschrieben in B. Xu und T. Swager, "Host-Guest Mesomorphism: Cooperative Stabilization of a Bowlic Columnar Phase", J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 5011–5012. Molekulare Spalten sind beschrieben in J. Rebek, Jr., Acc. Chem. Res. 17 (1984) 258 und Science 235 (1987) 1478. Cucurbiterilien sind beschrieben in Mock, W. L., Shih, N. Y., J. Org. Chem., 1983, 48 (20), 3618–3619. Cyclophane sind beschrieben in F. Diederich, M. R. Heester, M. A. Uyeki, Angew. Chem. 1988, 100, 1775; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1988, 27, 1705.

[0085] Eine Erhöhung des Signals, das durch die signalerzeugenden Gruppen der polymeren Farbstoffe erzeugt wird, die hierin beschrieben werden, wird bevorzugt erreicht durch Anlagern von Cyclodextrin, vorzugsweise β-Cyclodextrinaldehyd, über kovalente Bindung an die polymere Einheit, vorzugsweise an das Gerüst eines optimierten hoch-fluoreszierenden Polymers. Alternativ braucht das Cyclodextrin nicht kovalent an die polymere Einheit gebunden zu werden, sondern muss nur in nächster Nähe zu der polymeren Einheit sein.

[0086] Die Steigerung eines optimierten hoch-fluoreszierenden Polymers mit β-Cyclodextrinaldehyd über eine kovalente Bindung wird unten beschrieben werden. Die Steigerung eines optimierten hoch-fluoreszierenden Polymers mit einem der alternativen Wirtsanteile ist im Wesentlichen ähnlich zu der Steigerung, die mit einem Cyclodextrin erreichbar ist. Eine Anlagerung von Cyclodextrinaldehyd an die polymere Einheit des polymeren Farbstoffs durch kovalente Bindung wird vorgezogen, da dafür herausgefunden worden ist, dass dadurch die größte Erhöhung der Fluoreszenz bereitgestellt wird. Das Cyclodextrinmolekül kann an die polymere Einheit über den ersten Rand des Cyclodextrinmoleküls angelagert werden, indem eine einzelne reaktive Gruppe auf dem ersten Rand des Cyclodextrinmoleküls selektiv eingelagert wird. Folglich wird der zweite Rand unbehindert sein und der hydrophobe Hohlraum wird für Gastmoleküle zugänglich sein. Die Anlagerung des ersten Rands eines Cyclodextrinmoleküls an eine polymere Einheit mit funktionellen Amingruppen kann erreicht werden, indem eine einzelne Aldehydgruppe auf dem ersten Rand des Cyclodextrinmoleküls umgewandelt wird und diese Gruppe dann mit einer Amingruppe umgesetzt wird, die auf der polymeren Einheit vorhanden ist, wodurch das Cyclodextrinmolekül an die polymere Einheit über eine einzige kovalente Bindung angelagert wird. Wie zuvor erwähnt, kann die Erzeugung einer einzelnen Aldehydgruppe auf dem ersten Rand eines Cyclodextrinmoleküls erreicht werden durch Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Zum Beispiel kann ein Aldehyd auf dem ersten Rand von Cyclodextrin erzeugt werden unter Verwendung des Dess-Martin-Periodinan-Reagenzes, D. B. Dess et al., J. Org. Chem., 48, 4155–415 (1983). Diese Reaktion kann ausgeführt werden in einem heterogenen System, das stöchiometrische Mengen von Dess-Martin-Reagenz und Cyclodextrin gelöst in Tetrahydrofuran (THF) enthält. Obwohl 6-Cyclodextrinmonoaldehyd produziert wird, ist Dess-Martin-Reagenz potenziell explosiv und ist nicht mehr ohne weiteres von kommerziellen Quellen erhältlich. Andere Wege zu dem Monoaldehyd umfassen drei bis vier Schritte, bei denen toxische und poten-

ziell explosive Azid-Intermediate hergestellt werden.

[0087] Alternativ ist ein Verfahren zur Herstellung von 6-Cyclodextrinmonoaldehyden entdeckt worden, das nicht die Herstellung von gefährlichen Intermediaten einschließt. Das Verfahren kann mit Materialien ausgeführt werden, die ohne weiteres kommerziell erhältlich sind. Allgemein umfasst das Verfahren zwei Schritte und kann ausgeführt werden, wie unten in Schema 1 gezeigt ist.



Schema 1

[0088] Der erste Schritt des Verfahrens umfasst die Umwandlung eines Cyclodextrins in sein Monotosylatderivat. Das Tosylatderivat wird dann oxidiert, um das Cyclodextrinmonoaldehyd zu ergeben.

[0089] Es gibt mehrere Verfahren zur Umwandlung des Cyclodextrins in sein Monotosylatderivat. Siehe L. D. Melton et al., Carbohydrate Research, 18, 1971, 29–37 oder R. C. Petter et al., J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 3360–3368. Nachdem das Monotosylat gebildet worden ist, kann es von dem Reaktionsgemisch getrennt werden durch Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, vorzugsweise Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC). Das feste Monotosylat kann dann gewonnen werden durch Entfernung des Lösungsmittels aus der Lösung, die gelöstes Cyclodextrinmonotosylat enthält, durch Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Das feste Cyclodextrinmonoaldehyd kann dann in dem zweiten Schritt des Verfahrens verwendet werden.

[0090] Der Oxidationsschritt des Verfahrens kann durch eine Vielzahl von Verfahren ausgeführt werden. Typischerweise umfasst der Oxidationsschritt eine Dimethylsulfoxid(DMSO)-vermittelte Reaktion, die durch die Zugabe einer Base katalysiert werden kann. Es wurde herausgefunden, dass das Erhitzen des Monotosylatderivats auf eine Temperatur von etwa 75°C bis etwa 85°C in DMSO zu einer langsamen Umwandlung (etwa 1–3 Tage) des Tosylatderivats zu dem Monoaldehyd führt.

[0091] Die Zugabe von Base zu der DMSO-vermittelten Reaktion kann verwendet werden, um die Geschwindigkeit der Umwandlung von dem Monotosylat zu dem Monoaldehyd zu erhöhen. Zum Beispiel kann eine Spurenmenge von Natriumhydroxid (NaOH) verwendet werden, um die Reaktion zu beschleunigen. Bevorzugte Basen zur Verwendung in diesem Schritt des Verfahrens, umfassen behinderte Aminbasen wie Diisopropylamin, N-Methylmorpholin, Triethylamin, Trimethylamin und dergleichen. Diisopropylethylamin (auch bekannt als Hunig-Base) ist eine besonders bevorzugte behinderte Aminbase. Die Umwandlung des Monotosylats in das Monoaldehyd wird vorzugsweise erreicht, wenn das Monotosylat bei einer Konzentration von etwa 0,5 Gew-% bis etwa 20 Gew-% in Lösung vorhanden ist, noch besser von etwa 1 Gew-% bis etwa 15 Gew-%, und am besten von etwa 2 Gew-% bis etwa 10 Gew-%. Die Menge von behinderter Aminbase, die für die Umwandlung geeignet ist, bewegt sich von etwa 0,1 bis etwa 1,0 Moläquivalenten des Monotosylates in Lösung, vorzugsweise etwa 0,3 bis etwa 0,7 Moläquivalenten des Monotosylates in Lösung. Das so gebildete Cyclodextrinmonoaldehyd kann von allem nicht umgesetzten Material getrennt werden durch Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, und mit einem funktionellen Aminpolymer umgesetzt werden. Alternativ kann

das Endreaktionsgemisch direkt mit einem funktionellen Aminpolymer umgesetzt werden.

[0092] Das Cyclodextrinmonoaldehyd, das hierin bereitgestellt wird, kann leicht an Verbindungen, die funktionelle Amin- oder Hydrazidgruppen besitzen, angelagert werden durch Standardverfahren der kovalenten Chemie, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Beispiele für solche funktionellen Amingruppen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf: -C(O)-NH-NH₂, -NH₂, -NHR, worin R ein Glied darstellt gewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkyl mit 1 bis einschließlich 3 Kohlenstoffatomen, Isopropyl, -(CH₂)₂CO₂- , -(CH₂)₂SO₃- , -(CH₂)₂NH⁺, -(CH₂)₂NH₂^{+(CH₂)₂SO₃-}, -(CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂OH und -(CHOH)₄CH₂OH. Beispiele für Verbindungen, die diese funktionellen Amingruppen enthalten, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, funktionelle Aminpolymere wie Polyacrylamidhydrazid und funktionelle feste Aminphasen wie aminierte Mikropartikel.

[0093] In Fällen, wo primäre und sekundäre funktionelle Aminverbindungen mit Cyclodextrinmonoaldehyd umgesetzt werden, um kovalente Bindungen zu bilden, ist ein zusätzlicher Schritt bevorzugt. Nachdem die Anfangsreaktion zwischen der Verbindung und dem Monoaldehyd stattgefunden hat, hat sich eine Schiffsche Base gebildet, und die Reduktion der Schiffschen Base kann erreicht werden auf eine Art und Weise, die zuvor beschrieben wurde.

[0094] Das Cyclodextrinmonoaldehyd kann an funktionelle Aminpolymereinheiten angelagert werden, die keine signalerzeugenden Gruppen enthalten, oder an funktionelle Aminpolymerfarbstoffe, welche signalerzeugende Gruppen enthalten. Falls das Cyclodextrinmonoaldehyd zu einer funktionellen Aminpolymereinheit hinzugegeben wird, die keine signalerzeugenden Gruppen enthält, kann die polymere Einheit nachfolgend fluoreszierend gemacht werden durch Zugabe von signalerzeugenden Fluorophoren zu der polymeren Einheit. Ein Weg, auf welchem die polymere Einheit fluoreszierend gemacht werden kann, ist durch Anlagerung der signalerzeugenden Gruppen an die funktionelle Aminpolymereinheit durch kovalente Bindung. Die Fluoreszenz von Konjugaten, die die polymeren Farbstoffe dieser Erfindung enthalten, kann gesteigert werden, indem Cyclodextrin an dem Konjugat durch eine nicht-kovalente Bindung angelagert wird. Wenn Cyclodextrin auf diese Art und Weise verwendet wird, braucht keine Modifikation an dem Cyclodextrinmolekül oder an dem Konjugat vorgenommen zu werden. Wenn es auch nicht erwünscht ist, an irgendeine Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, dass das Cyclodextrin mit den signalerzeugenden Gruppen in Verbindung steht, die an dem polymeren Farbstoff vorhanden sind, indem es die kovalent gebundenen signalerzeugenden Gruppen innerhalb des hydrophoben Zentrums des Cyclodextrinmoleküls beherbergt. Wenn Cyclodextrin verwendet wird, um die Fluoreszenz eines polymeren Farbstoffs zu erhöhen, wird es vorzugsweise in Konzentrationen im Bereich von etwa 5 mM bis etwa 200 mM, vorzugsweise von etwa 10 mM bis etwa 20 mM verwendet.

[0095] Wie zuvor erwähnt hat das Konjugat von dieser Erfindung eine Vielzahl von Verwendungen. Das bevorzugte Verfahren zur Verwendung des Konjugats von dieser Erfindung liegt in einer Durchflusszytometrieanwendung, die ein fluoreszierendes Konjugat oder vielfache fluoreszierende Konjugate einsetzt, um Zellen zu detektieren, die in einer Testprobe enthalten sind. Ein Beispiel eines Durchflusszytometers ist der Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierapparat (FACS II), gefertigt von Becton, Dickinson & Co, Franklin Lakes, N.J. Im Allgemeinen enthält ein bildgebendes System eine Anregungsquelle und eine Detektionsvorrichtung. Die Anregungsquelle regt die signalerzeugende Gruppe an, die mit dem Konjugat in Verbindung steht, und die Detektionsvorrichtung detektiert das Signal, das von der angeregten signalerzeugenden Gruppe emittiert wird.

[0096] In einer typischen Analyse mit einem bildgebenden System wird eine Testprobe mit einem fluoreszierenden Konjugat inkubiert, welches bestimmte Zellen spezifisch bindet, die in der Testprobe vorhanden sein können. Die Inkubation findet für eine Zeitspanne und bei einer Temperatur statt, die für die Bindung des Konjugats an spezielle Zellpopulationen förderlich sind, die in der Probe enthalten sind. Die mit dem Konjugat gebundenen Zellen werden gewöhnlich als angefärbt bezeichnet, und das Anfärbverfahren kann vielfach, nacheinander oder gleichzeitig, mit vielfachen Konjugaten ausgeführt werden, welche Signale verschiedener Wellenlängen emittieren. Nachdem das Anfärbverfahren abgeschlossen ist, kann die Probe unter Verwendung eines Durchflusszytometers analysiert werden.

[0097] In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform der Durchflusszytometrie mit dem polymeren Farbstoff der vorliegenden Erfindung wird eine Testprobe mit einer Lösung eines Primärreagenzes inkubiert, welches spezifisch bestimmte Zellen bindet, die in der Testprobe vorhanden sein können, um Primärkomplexe zu bilden. Das ungebundene Reagenz, sofern vorhanden, kann aus der Probe gewaschen werden, und ein fluoreszierendes Konjugat, das für das gebundene Primärreagenz spezifisch ist, wird dann mit den Primärkomplexen inkubiert. Das ungebundene Konjugat, sofern vorhanden, kann dann von den Primärkomplexen entfernt werden, und die Fluoreszenz, die mit den Zellen in Verbindung steht, kann dann wie oben bestimmt werden. Es versteht sich, dass das Anfärbverfahren vielfach wiederholt werden kann mit Primärreagenzien, die für unterschiedliche Zellmarker spezifisch sind, und Konjugaten, welche bei der gleichen oder bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren. Es versteht sich natürlich auch, dass das Anfärbverfahren auf eine sequenzielle Art und Weise oder chargenartig erreicht werden kann, wobei alle der notwendigen Komponenten zum Zellanfärben zu der Probe hinzugegeben werden, bevor die Fluoreszenz, die mit den Zellen in Verbindung steht, bestimmt wird.

[0098] In einer alternativen Ausführungsform können das Konjugat und das Verfahren der vorliegenden Er-

findung angepasst werden zur Verwendung in herkömmlichen Festphasenimmunoassays, wie zum Beispiel einen Sandwich-Immunoassay. Ein Sandwich-Immunoassay schließt typischerweise ein, dass eine Testprobe, von der vermutet wird, dass sie einen Analyten enthält, mit einem im Wesentlichen festen inerten Kunststoff-, Latex- oder Glaskügelchen oder -mikropartikel oder einem anderen Trägermaterial in Kontakt gebracht wird, welches mit einem spezifischen Bindungsglied beschichtet worden ist, das ein Bindungspaar mit dem Analyten bildet. Das Bindungsgliedbeschichtete Trägermaterial wird normalerweise als ein "Einfangreagenz" bezeichnet. Nachdem der Analyt an das Trägermaterial gebunden ist, wird die übrige Testprobe von dem Trägermaterial entfernt. Das Trägermaterial, an welches der Analyt gebunden ist, wird mit einem Konjugat behandelt, welches im Allgemeinen ein zweites Bindungsglied umfasst, das mit einer signalerzeugenden Gruppe markiert ist. Das Konjugat wird an den Analyten gebunden, welcher an das Trägermaterial gebunden ist. Die Kombination von Trägermaterial mit dem ersten Bindungsglied, dem Analyten und dem Konjugat, die daran gebunden sind, wird von allem ungebundenen Konjugat getrennt, typischerweise mit einem oder mehreren Waschschritten. Das Signal, das durch die signalerzeugende Gruppe durch entsprechende Anregung erzeugt wird, kann dann visuell beobachtet werden, oder besser durch ein Messgerät, um die Anwesenheit oder die Menge eines Analyten in einer Testprobe anzuzeigen. Es versteht sich selbstverständlich, dass die Reihenfolge und Anzahl der Schritte, die eingesetzt werden, um solche Assays durchzuführen, die hierin beschriebene Erfindung nicht beschränken soll.

[0099] Wie zuvor erwähnt kann der Analyt, der durch einen derartigen Immunoassay bestimmt wird, das Produkt oder die Produkte einer Amplifikationsreaktion sein. Entsprechend können die Analyte Nukleinsäuresequenzen umfassen oder sonst wie die Produkte einer Hybridisierungsreaktion sein wie LCR, welche beschrieben ist in den Europäischen Patentanmeldungen EP-A-320-308 und EP-A-439-182, und PCR, welche beschrieben ist in den US-Patenten Nummer 4.683.202 und 4.683.195.

[0100] In Fällen, wo die Analyte zum Beispiel LCR- oder PCR-Reaktionsprodukte oder -Sequenzen umfassen, können die Sequenzen ein Bindungsglied umfassen, oder können modifiziert werden, um ein Bindungsglied zu umfassen, das ein Bindungspaar mit einem Indikatorreagenz bildet, und ein Bindungsglied, das ein Bindungspaar mit einem Einfangreagenz bildet.

[0101] Automatisierte Systeme, die zur Durchführung von Sandwich-Immunoassays, wie zum Beispiel ein Mikropartikel-Enzymimmunoassay (MEIA), geeignet sind, sind auf dem Gebiet gut bekannt. Ein besonders bevorzugtes und kommerziell erhältliches automatisiertes Messgerät, welches eingesetzt werden kann, um MEIAs durchzuführen, ist das IMx®-System, welches erhältlich ist von Abbott Laboratories, Abbott Park, IL. Protokolle für MEIAs wie jene, die von dem Abbott IMx®-Messgerät durchgeführt werden, sind auf dem Gebiet gut bekannt und sind beschrieben worden in Fiore, M. et al., Clin. Chem., 34/9: 1726–1732 (1988).

[0102] Die durch beherbergende Gruppen verstärkten polymeren Farbstoffe dieser Erfindung stellen außergewöhnliche Ergebnisse bei der Durchflusszytometrie bereit, die jene weit übertreffen, die mit bisher bekannten fluoreszierenden Farbstoffen, Polymeren und Konjugaten erhalten wurden. Diese polymeren Farbstoffe können verwendet werden anstelle der bisher bekannten Fluoreszenzfarbstoffe, Polymere und Konjugate wie Phycobiliprotein-Cy5-Tandems und dergleichen.

[0103] Herkömmliche signalerzeugende Gruppen (d. h. Fluorophore) mit hohen Stokesschen Verschiebungen sind bei Multiplex-Anwendungen mit vernünftiger Empfindlichkeit zu schwach zu detektieren. Die Erfindung überwindet dieses Problem und kann in vielen Anwendungen verwendet werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Multiplex-Assays einschließlich Multiplexen durch Multicolor-Fluoreszenz-Immunoassay, Durchflusszytometrie, Immunphänotypisierungsassays, bildgebende Anwendungen, immunologisches Anfärbfen, Fluoreszenzmikroskopie, immunchromatographisches Anfärbfen, Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (FPIA), Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), Fluoreszenzdetektion von Analyten, und andere. Die Erfindung ist besonders wirksam für Durchflusszytometrieanwendungen. Jedoch ist sie nicht beschränkt auf diese Anwendungen, und tatsächlich ist sie geeignet für viele Anwendungen, in welche Fluoreszenzprüfung oder -detektion verwickelt ist und welche Problemen unterworfen sind wie jenen, die zuvor mit Bezug auf den Stand der Technik besprochen wurden.

[0104] Zusätzlich sind viele der signalerzeugenden Gruppen, die zur Verwendung in dieser Erfindung nützlich sind, synthetisch. Synthetisch hergestellte signalerzeugende Gruppen sind typischerweise stabiler als natürlich vorkommende Fluorophore.

[0105] Die vorliegende Erfindung verringert die Umweltempfindlichkeit dieser und anderer Farbstoffe, indem diese Farbstoffe mit einer geeigneten und erwünschten Mikroumgebung bereitgestellt werden. Dadurch, dass die Farbstoffe in einer derartigen Mikroumgebung fixiert sind, wird die Wirksamkeit der fluoreszierenden Eigenschaften dieser Farbstoffe durch Makroumgebung, Konjugation oder andere Faktoren nicht signifikant beeinträchtigt.

[0106] Die Erfindung wird spezieller veranschaulicht werden durch die folgenden, nicht beschränkenden Beispiele. In diesen Beispielen wurden die folgenden Puffer eingesetzt:

Phosphatpuffer, der 100 mM Phosphat und 100 mM NaCl enthielt, pH 5,5 (nachfolgend "Puffer Nr. 1")

Phosphatpuffer, der 100 mM Phosphat und 100 mM NaCl enthielt, pH 7,0 (nachfolgend "Puffer Nr. 2")

Triethanolaminpuffer, der 50 mM Triethanolamin, 160 mM NaCl enthielt, pH 8,0 (nachfolgend "Puffer Nr. 3")

Acetatpuffer, pH 4,5 (0,1 N Acetat, 0,1 N NaCl) (nachfolgend "Puffer Nr. 4")

Acetatpuffer; pH 5,5 (0,1 N Acetat, 0,1 N NaCl) (nachfolgend "Puffer Nr. 5")

Phosphatpuffer, der 50 mM Triethanolamin, 160 mM NaCl enthielt, pH 7,0, mit 0,1 mM ZnCl₂ und 1 mM MgCl₂, (nachfolgend "Puffer Nr. 6")

HEPES-Puffer, pH 6,8 (0,1 N HEPES) (nachfolgend "Puffer Nr. 7")

Phosphatpuffer, der 100 mM Phosphat und 100 mM NaCl enthielt, pH 7,5 (nachfolgend "Puffer Nr. 8")

20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 (0,02 N Phosphat, 0,02 N Natriumchlorid) (nachfolgend "Puffer Nr. 9")

[0107] In diesen Beispielen wurden die folgenden Handelsmarken eingesetzt:

"SEPHACRYL S-300", Pharmacia LKB Biotechnology AB

"CENTRICON-30", W. R. Grace & Co.

"PARK", Parr Instrument Co.

"CELITE", Celite Corporation

"SEPHADEX G-25", Pharmacia LKB Biotechnology AB

"CENTRIPREP-30", W. R. Grace & Co

"BIO-GEL TSK-50XL", Toso-Haas Corporation

"BIO-SIL SEC-300", BioRad Corporation

BEISPIEL I

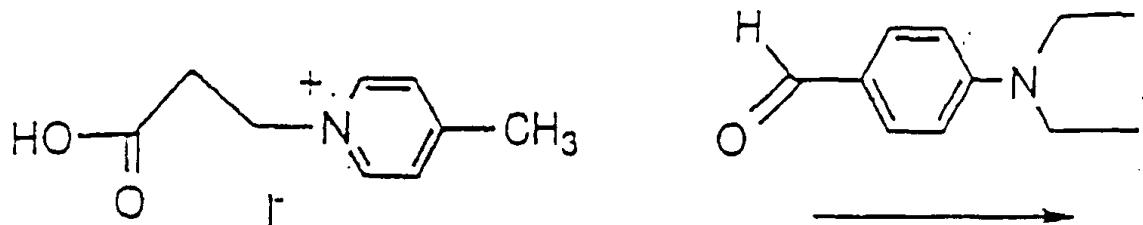
Herstellung des Cyclodextrinderivats von Acrylamidhydrazidpyridiniumanilinmonoenpolymer

[0108] Farbstoff 1 wurde hergestellt, indem 4-(Diethylamino)benzaldehyd mit dem synthetischen Intermediat I in Anwesenheit einer Base umgesetzt wurde. Das synthetische Intermediat I wurde hergestellt, indem 4-Methylpyridin mit 3-Iodpropionsäure umgesetzt wurde. Acrylamidhydrazidpyridiniumanilinmonoenpolymer 11B wurde hergestellt, indem Farbstoff 1 an dem Carboxylsubstituenten mit einem Hydrazinanteil von Acrylamidhydrazidpolymer 11A umgesetzt wurde unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (nachfolgend "EDAC") als Dehydratisierungsmittel. Der resultierende polymere Farbstoff 11B wurde weiter umgesetzt mit Cyclodextrinaldehyd 6, um ein Cyclodextrinderivat von Acrylamidhydrazidpyridiniumanilinmonoenpolymer 11D herzustellen.

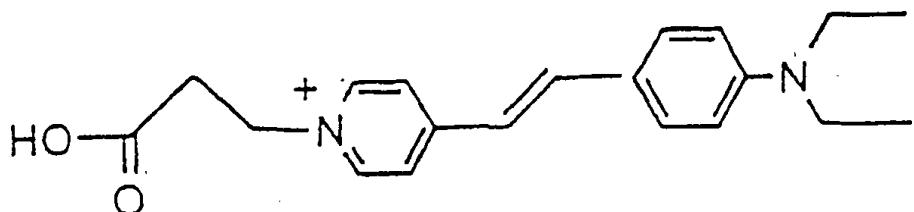
Herstellung von Farbstoff 1

[0109] Ein Reaktionsgemisch wurde hergestellt, indem 4-(Diethylamino)benzaldehyd (0,5 g, 2,8 mmol, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI), ein Intermediat (synthetisches Intermediat I, 0,462 g) und Piperidin (1 ml) in wasserfreiem Ethanol (5 ml) vereinigt wurden.

[0110] Das Reaktionsgemisch wurde auf eine Temperatur von 100°C erhitzt und bei dieser Temperatur vier Stunden lang gehalten, dann wurde auf Raumtemperatur (25°C) gekühlt. Das Ethanollösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und das Produkt wurde anschließend gereinigt durch präparative HPLC auf einer C-8-Umkehrphasensäule unter Elution mit einer 2 : 1 Methanol/Wasser-Flüssigphase. Die Ausbeute von Farbstoff 1 betrug 29%. Die Herstellung ist in Schema 2A veranschaulicht.

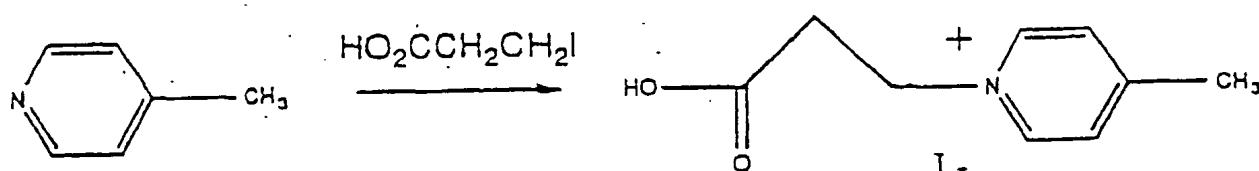


Synthetisches Intermediat I

**Farbstoff 1**

Schema 2A

[0111] Das synthetische Intermediat I wurde hergestellt, indem eine Lösung am Rückflusskühler erhitzt wurde, die aus 4-Methylpyridin (1 g, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) und 3-Iodpropionsäure (10,7 g, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) in Ethanol bestand. Die Herstellung ist in Schema 2B veranschaulicht.

**Synthetisches Intermediat I**

Schema 2B

[0112] Das synthetische Intermediat I wurde gereinigt durch Silicagel-Chromatographie unter Verwendung eines Gradienten von 5 bis 20% CH_3OH in der mobilen Phase CH_2Cl_2 .

[0113] Alternativ kann Farbstoff 1 synthetisch hergestellt werden unter Verwendung eines modifizierten Syntheseweges, wie beschrieben durch Stevens, A. C. et al., Bioconjugate Chemistry, 1993, 4, 19–24.

Herstellung von polymerem Farbstoff 11B

[0114] Der polymere Farbstoff 11B wurde hergestellt, indem Farbstoff 1 an die polymere Einheit 11A angelagert wurde unter Verwendung von EDAC als Dehydratisierungsmittel. Die polymere Einheit 11A (5 mg, Sigma Chemical Co., Katalog Nr. P-9505, Molekulargewicht 180.000) wurde in 1,0 ml Phosphatpuffer gelöst, der 100 mM Phosphat und 100 mM NaCl enthielt, pH 5,5 (nachfolgend "Puffer Nr. 1"). Ungefähr 150 Moläquivalente von Farbstoff 1 (1,4 mg, $4,2 \times 10^{-6}$ mol) wurden zu dieser Lösung hinzugegeben. Mehrere 10-mg-Aliquote von festem EDAC wurden in ungefähr $\frac{1}{2}$ -Stunden-Intervallen hinzugegeben, während das Reaktionsgemisch über den Verlauf von mehreren Stunden gerührt wurde. Reinigung wurde erreicht durch Ausschlusschromatographie ("SEPHADEX G-25") unter Verwendung von Puffer Nr. 1 als mobile Phase. Die Hohlraumvolumenfraktionen wurden dann zusammengefasst.

Herstellung von polymerem Farbstoff 11D

[0115] Nachdem der Chromatographieschritt wie oben ausgeführt war, betrug die Konzentration der Vorratslösung des resultierenden polymeren Farbstoffs 11B in Puffer Nr. 1 0,5 mg/ml. Ein Aliquot (3,0 ml) der Vorratslösung von polymerem Farbstoff 11B in Puffer Nr. 1 (1,5 mg polymerer Farbstoff 11B) wurde genommen und Cyclodextrinaldehyd 6 (9,0 mg, hergestellt wie beschrieben in Huff, J. B. Bieniarz, C., J. Org. Chem. 1994, 59, 7511–7516) wurde zu dem Aliquot hinzugegeben. Die resultierende Lösung wurde bei Raumtemperatur (25°C) mindestens 24 Stunden lang inkubiert gelassen. Der resultierende polymere Farbstoff 11D wurde auf einer Mitteldrucksäule ("SEPHRCRYL S-300") bei einer Strömungsgeschwindigkeit von ungefähr 1,0 ml/min unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe gereinigt. Die hochmolekulargewichtigen Fraktionen wurden gesammelt, zusammengefasst und unter Verwendung eines Mikroindicators ("CENTRICON-30") eingeengt.

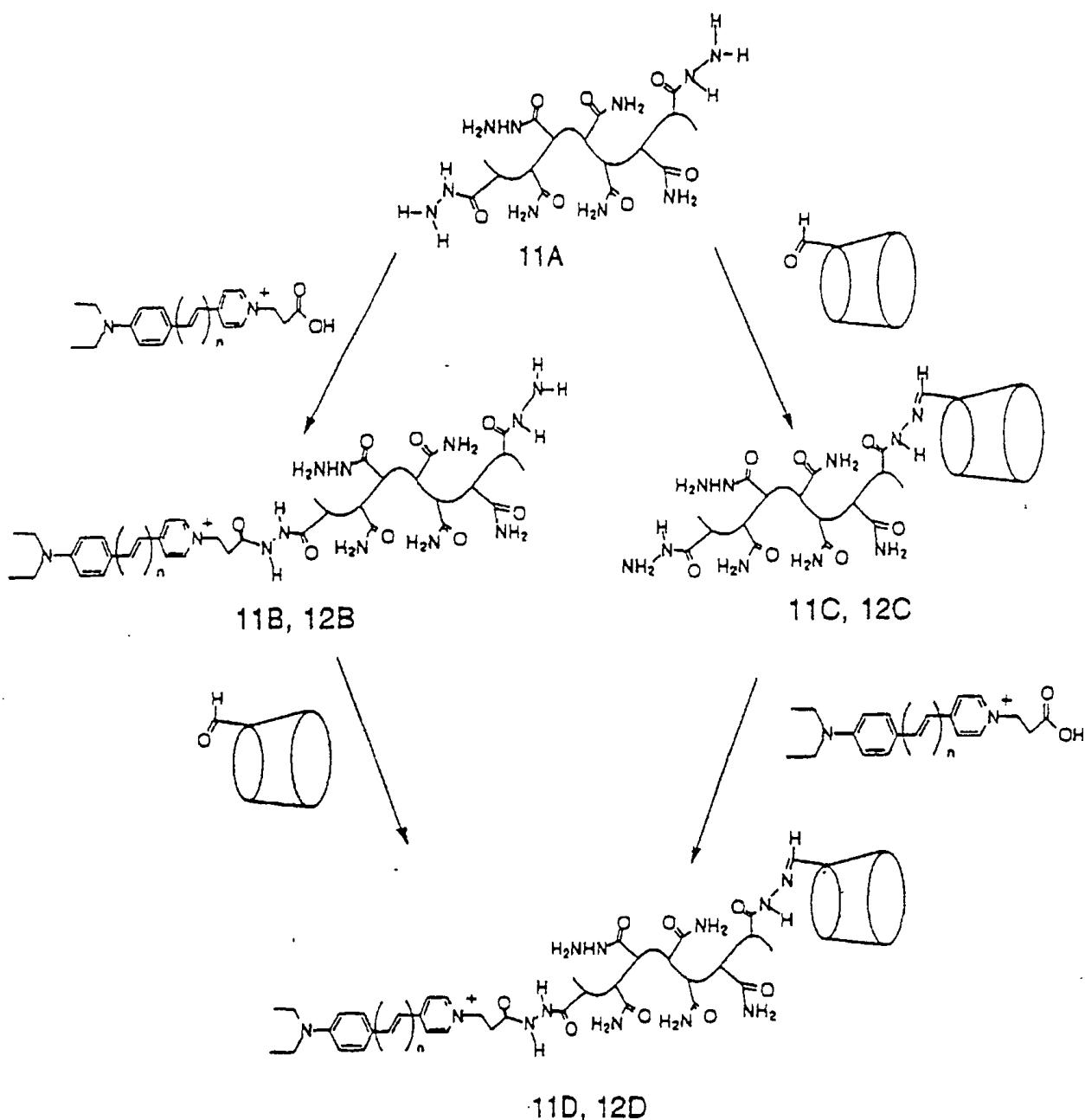
[0116] Die relativen Fluoreszenzintensitäten von Farbstoff 1, polymerem Farbstoff 11B und polymerem Farbstoff 11D bei Anregung bei 488 nm und Emission bei 614 nm sind in Fig. 1 gezeigt. In Fig. 1 – Fig. 9 ist die Fluoreszenzintensität, ob relativ oder korrigiert, in willkürlichen Einheiten ausgedrückt.

BEISPIEL II

Herstellung von polymerem Farbstoff 11D

[0117] Der polymere Farbstoff 11D wurde hergestellt, wie in BEISPIEL 1 beschrieben. Farbstoff 1 wurde hergestellt, wie in BEISPIEL I beschrieben. Die Anlagerung von Farbstoff 1 an die polymere Einheit 11A wurde bewirkt, indem EDAC als Dehydratisierungsmittel wie in BEISPIEL I beschrieben verwendet wurde.

[0118] Signalerhöhung wurde wesentlich verbessert durch die Zugabe von Cyclodextrinaldehyd 6 zu der Lösung von polymerem Farbstoff 11B. Cyclodextrin und Farbstoff 1 wurden an das Acrylamidhydrazidpolymergerüst über die Carboxylgruppe angelagert, wie in Schema 3 gezeigt. Der resultierende polymere Farbstoff 11D, an welchen Cyclodextrin (über Cyclodextrinaldehyd 6) kovalent angelagert war, kann, um lineare Antwort bereitzustellen, auf eine Konzentration des polymeren Farbstoffs verdünnt werden, wie in **Fig. 3** gezeigt ist. In **Fig. 3** zeigt Kurve A die Fluoreszenzintensität von polymerem Farbstoff 11B als eine Funktion der Konzentration an, wobei die Anregungswellenlänge 488 nm ist und die Emissionswellenlänge 580 nm ist; Kurve B zeigt die Fluoreszenzintensität von polymerem Farbstoff 11B als eine Funktion der Konzentration an, wobei die Anregungswellenlänge 488 nm ist und die Emissionswellenlänge 614 nm ist; Kurve C zeigt die Fluoreszenzintensität vom polymerem Farbstoff 11D als eine Funktion der Konzentration an, wobei die Anregungswellenlänge 488 nm ist und die Emissionswellenlänge 580 nm ist; Kurve D zeigt die Fluoreszenzintensität von polymerem Farbstoff 11D als eine Funktion der Konzentration an, wobei die Anregungswellenlänge 488 nm und die Emissionswellenlänge 614 nm ist. Ein Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität als eine Funktion der Wellenlänge ist in **Fig. 2** gezeigt. In **Fig. 2** zeigt Kurve A die relative Fluoreszenzintensität von polymerem Farbstoff 11B als eine Funktion der Wellenlänge an; Kurve B zeigt die relative Fluoreszenzintensität von polymerem Farbstoff 11D als eine Funktion der Wellenlänge an.

**Polymer 11/12**

Schema 3

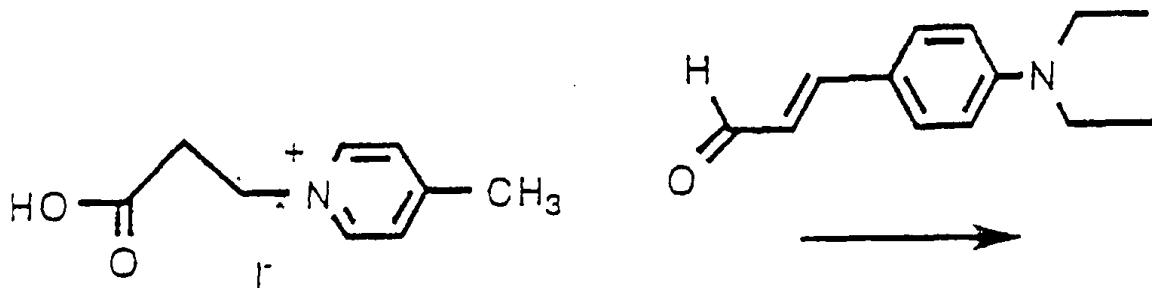
[0119] In polymeren Farbstoffen 11B und 11D, n = 1. In polymeren Farbstoffen 12B und 12D, n = 2.

BEISPIEL III**Herstellung des Cyclodextrinderivats von Acrylamidhydrazidpyridiniumanilindienpolymer**

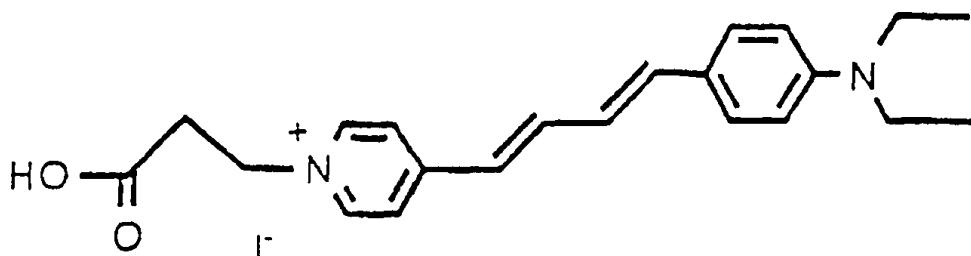
[0120] Farbstoff 3 wurde hergestellt, indem trans-4-(Diethylamino)zimtaldehyd mit dem synthetischen Intermediat I in Anwesenheit einer Base umgesetzt wurde. Der polymere Farbstoff 12B wurde hergestellt durch Reaktion von Farbstoff 3 an dem Carboxylsubstituenten mit einem Hydrazinanteil von Polymer 11A unter Verwendung von EDAC als Dehydratisierungsmittel. Der resultierende polymere Farbstoff 12B wurde weiter mit Cyclodextrinaldehyd 6 umgesetzt, um den polymerem Farbstoff 12D herzustellen.

Herstellung von Farbstoff 3

[0121] Ein Reaktionsgemisch wurde hergestellt, indem trans-4-(Diethylamino)zimtaldehyd (0,43 g, Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI), synthetisches Intermediat I (0,62 g) und Piperidin (1 ml) in Methanol (10 ml) vereinigt wurden. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine Temperatur von 110°C erhitzt und bei dieser Temperatur ½ Stunde lang gehalten, und dann wurde es auf einem Eisbad (0°C) gekühlt. Das Methanollösungsmitel wurde durch Filtration auf einem Glasfiltertrichter entfernt. Der resultierende Niederschlag wurde mit Diethylether gewaschen. Das feste Produkt wurde dann gereinigt entweder durch préparative HPLC auf einer C-8-Umkehrphasensäule unter Elution mit 70 : 30 Methanol/Wasser-Flüssigphase oder durch Ausfällen mit Diethylether. Die Herstellung ist in Schema 4 veranschaulicht.



Synthetisches Intermediat I



Dye 3

Schema 4

Herstellung von polymerem Farbstoff 12B

[0122] Polymer 11A (4 mg, Sigma Chemical Company, Katalog Nr. P-9905, Molekulargewicht 180.000) wurde in Puffer Nr. 1 (2,0 ml) durch magnetisches Rühren, mindestens 8 Stunden lang bei Raumtemperatur (25°C), gelöst. Farbstoff 3 (1,45 mg, 0,0268 mmol, 75 Moläquivalente des Farbstoffs pro Mol Polymer) wurde in N,N-Dimethylformamid (DMF) (200 µl) gelöst, um eine Vorratslösung zu bilden, und die resultierende Vorratslösung wurde dann zu dem Reaktionsgemisch, das Polymer 11A enthielt, unter Rühren hinzugegeben. Vier Aliquote (je 50 µl) eines EDAC-Vorrats, zusammengesetzt aus 2,37 mg EDAC gelöst in 200 µl Puffer Nr. 1, wurden in ½-Stunden-Intervallen (2,5 Moläquivalente EDAC pro Mol Farbstoff für jedes Aliquot) zu dem Reaktionsgemisch hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 bis 4 Stunden lang gerührt, und der polymere Farbstoff wurde gereinigt durch Ausschlusschromatographie auf einer Säule ("SEPHADEX G-25") in Phosphatpuffer, der 100 mM Phosphat und 100 mM NaCl enthielt, pH 7,0 (nachfolgend Puffer Nr. 2). Das Hohlraumvolumenmaterial, das den polymeren Farbstoff enthielt, wurde gesammelt und wurde unter Verwendung eines Mikroindicators ("CENTRICON-30") auf ungefähr 1,5 ml eingeengt.

BEISPIEL IV

Herstellung von polymerem Farbstoff 12B

[0123] Der polymere Farbstoff 12B wurde ebenfalls auf die folgende Art und Weise hergestellt: Polymer 11A (10,0 mg, Sigma Chemical Co., Katalog Nr. P-9905, Molekulargewicht 180.000) wurde in einem Puffer Nr. 1 (2,0 ml) gelöst durch magnetisches Rühren mindestens 8 Stunden lang bei Raumtemperatur (25°C). Farbstoff 3 (2,9 mg, 0,0536 mmol, 150 Moläquivalente Farbstoff pro Mol Polymer) wurde in N,N-Dimethylformamid (200

μl) gelöst, um eine Vorratslösung zu bilden. Die gesamte Vorratslösung, die Farbstoff 3 enthielt, wurde dann zu der Lösung, die Polymer 11A enthielt, unter Röhren hinzugegeben. Zuletzt wurden vier Aliquote (je 250 mg) festes EDAC zu dem gerührten Reaktionsgemisch zur Anfangszeit und zu den Zeiten $\frac{1}{2}$ Stunde, 2 Stunden und 3 $\frac{1}{2}$ Stunden hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 bis 4 weitere Stunden lang gerührt.

[0124] Der polymere Farbstoff 12B wurde durch Ausschlusschromatographie auf einer Säule ("SEPHADEX G-25") in Puffer Nr. 2 gereinigt. Das Hohlraumvolumenmaterial wurde gesammelt und polymerer Farbstoff 12B wurde dann unter Verwendung eines Mikroindicators ("CENTRICON-30") auf ungefähr 1 bis 2 ml eingeengt.

[0125] Ein Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von Farbstoff 3, polymerem Farbstoff 12B und polymerem Farbstoff 12B in Anwesenheit von 0,1 M Cyclodextrin ist in **Fig. 4** gezeigt.

Herstellung von polymerem Farbstoff 12D

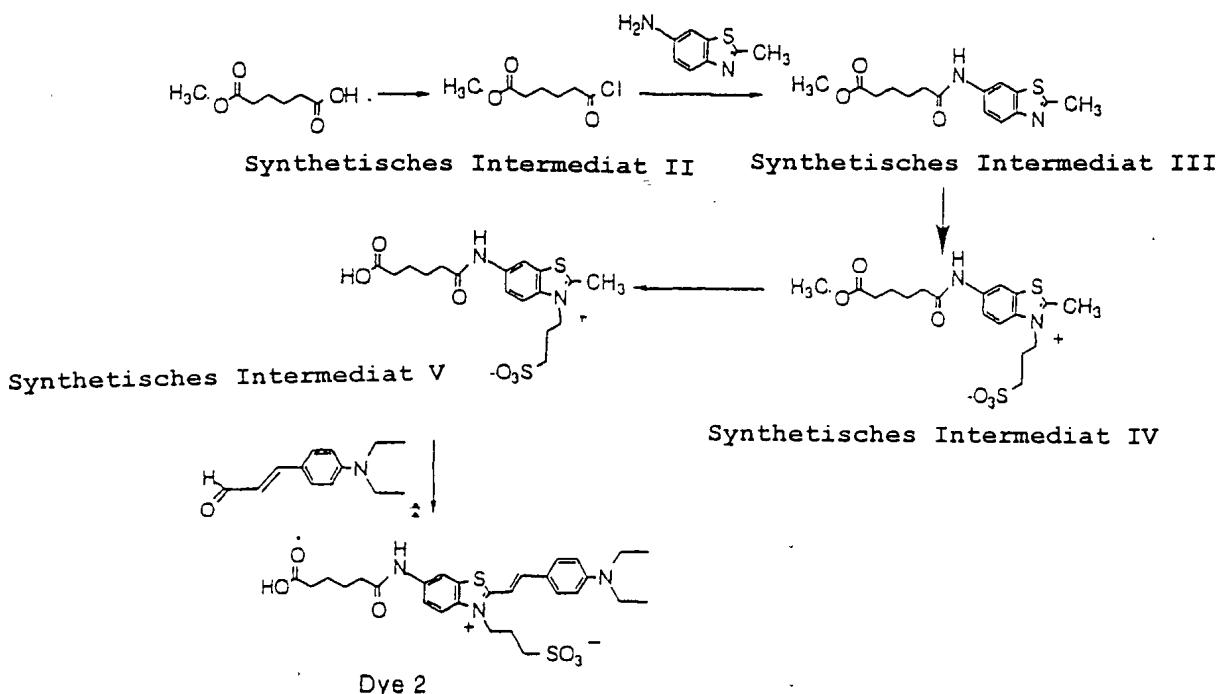
[0126] Der polymere Farbstoff 12B wurde mit Cyclodextrinaldehyd umgesetzt, um polymeren Farbstoff 12D zu ergeben. Der polymere Farbstoff 12B (250 μl bei einer Konzentration von 1,1 mg/ml) wurde mit Cyclodextrinaldehyd (1,5 mg, hergestellt wie beschrieben in Huff, J. B., Bieniarz, C., *J. Org. Chem.*, 1994, 59, 7511–7516) bei einer Endkonzentration von 6,0 mg/ml Cyclodextrin in Puffer Nr. 1 umgesetzt. Die Reaktion wurde ungefähr vier Stunden lang bei Raumtemperatur in der Dunkelheit ausgeführt. Der resultierende polymere Farbstoff 12D wurde dann durch Ausschlusschromatographie ("SEPHADEX G-25") gereinigt, und die Hohlraumvolumenfraktionen wurden zusammengefasst und unter Verwendung eines Mikroindicators ("CENTRICON-30") eingeengt.

BEISPIEL V

Herstellung des Cyclodextrinderivats von Acrylamidhydrazidbenzothiazoliumanilinmonoenpolymer

[0127] Der polymere Farbstoff 17D wurde durch die Reaktion von Cyclodextrinmonoaldehyd mit Acrylamidhydrazidbenzothiazoliumanilinmonoenpolymer hergestellt. Das letztere Polymer wiederum wurde hergestellt durch Reaktion von Farbstoff 2 mit Polymer 11A unter Verwendung von EDAC als Dehydratisierungsmittel. Farbstoff 2 wurde synthetisch hergestellt durch die Kondensation des synthetischen Intermediats V und trans-4-(Diethylamino)zimtaldehyd in Anwesenheit von Piperidin, und das entsprechende Strukturaddukt wurde aus dem Reaktionsgemisch durch HPLC isoliert. Alternativ kann Farbstoff 2 durch die Kondensation des 2-Methylbenzothiazolium-Intermediats (nachfolgend "synthetische Intermediat V") und 4-(Diethylamino)benzaldehyd in Anwesenheit von Piperidin hergestellt werden.

[0128] Die Synthese von Farbstoff 2 ist in Schema 5 veranschaulicht.



Schema 5

Herstellung des synthetischen Intermediats V

[0129] Adipinsäuremonoethylester (17,42 g, Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO.) wurde mit SOCl₂ (9,0 ml, Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO.) umgesetzt, indem ein Reaktionsgemisch zusammengesetzt aus den zwei Verbindungen in Anwesenheit eines Tropfens N,N-Dimethylformamid als einem Katalysator für die Reaktion am Rückflusskühler erhitzt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine Temperatur von 90°C erhitzt und bei dieser Temperatur ½ Stunde lang gehalten. Die Masse des überschüssigen SOCl₂ wurde unter Vakuum entfernt. Dann wurde eine minimale Menge Diethylether zu der Mischung hinzugegeben und die Mischung wurde unter Vakuum erhitzt, um das SOCl₂/Diethylether-Azeotrop zu entfernen. Dieser Schritt, der die Azeotropentfernung einschloss, wurde zweimal wiederholt. Die verbleibenden Spuren von Thionylchlorid und Diethylether wurden dann entfernt durch Aussetzen gegenüber Hochvakuum für eine Stunde lang. Das synthetische Intermediat II wurde als ein Öl isoliert und wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

[0130] Das synthetische Intermediat II (5,83 g) und 5-Amino-2-methylbenzothiazol (6,0 g, Adrich) wurden in Pyridin mit Dimethylaminopyridin (0,46 g) als Acylierungskatalysator gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde mehrere Stunden lang bei einer Temperatur von 110°C erhitzt. Die Masse des Pyridinlösungsmittels wurde unter Vakuum entfernt, und die verbleibenden Spuren wurden durch Pyridin/CH₂Cl₂-Azeotrop entfernt. Das Reaktionsgemisch wurde in CH₂Cl₂ und gesättigtem NaHCO₃ verteilt. Die organische Schicht wurde über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in einer minimalen Menge von CH₂Cl₂ gelöst und Diethylether wurde hinzugegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert und verworfen. Das Filtrat wurde gesammelt, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt, um das kristalline synthetische Intermediat III zu ergeben.

[0131] Das synthetische Pmidintermediat III (7,4 g) wurde in einer minimalen Menge von Acetonitril gelöst und 1,3-Propansulfon (6,9 g) wurde zu der Lösung hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 72 Stunden lang am Rückflusskühler erhitzt, bis Dünnschichtchromatographie (DC) anzeigen, dass kein Ausgangsmaterial mehr übriggeblieben war. Das Reaktionsprodukt wurde dann isoliert, indem es in Methanol gelöst wurde und mit Diethylether ausgefällt wurde. Ein quaternisierter Ester, synthetisches Intermediat IV, wurde als ein weißer Feststoff gewonnen.

[0132] Das synthetische quaternisierte Esterintermediat IV wurde in 0,02 bis 0,4 N HCl hydrolysiert. Das Ausmaß der Hydrolyse wurde sorgfältig durch DC überwacht und die Hydrolyse wurde bei Vollständigkeit gestoppt. Das synthetische quaternisierte Esterintermediat IV (0,30 g) wurde in 0,4 N HCl (30 ml) gelöst. In einem alternativen Verfahren wurde das synthetische quaternisierte Esterintermediat IV (0,5 g) in 4,0 N HCl anstelle von 0,4 N HCl gelöst, um das gleiche Ergebnis zu erreichen. Das 2-Methylbenzothiazoliumhydrolyseprodukt, synthetisches Intermediat V, wurde isoliert, indem das Reaktionsgemisch zuerst eingefroren wurde und dann das Lösungsmittel unter Verwendung eines Rotationsverdampfer bei ungefähr 0,1 mm Hg Druck entfernt wurde.

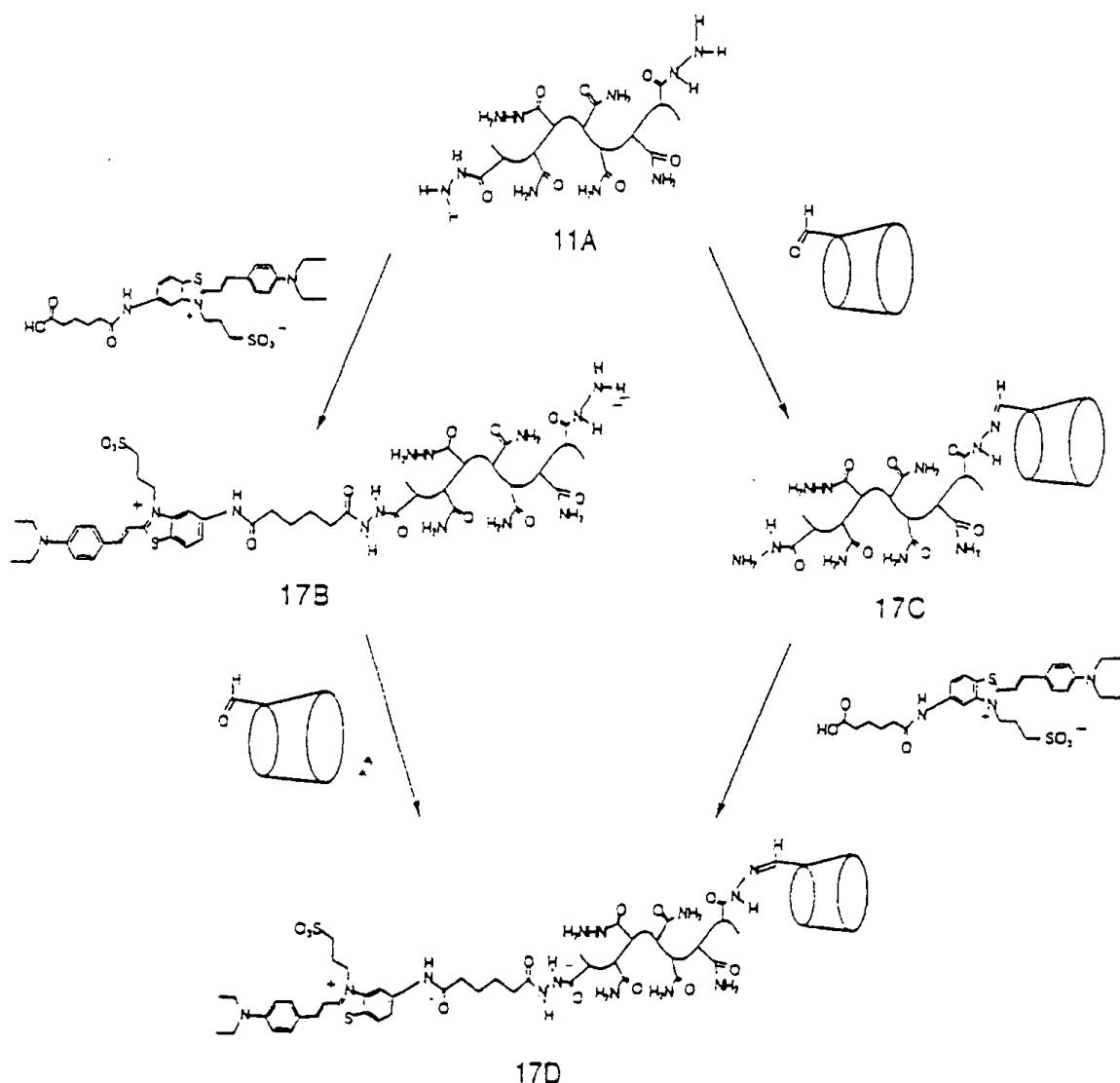
Herstellung von Farbstoff 2

[0133] Das synthetische Intermediat V (100 mg, 0,24 mmol) und trans-4-(Diethylamino)zimtaldehyd (50 mg, 0,24 mmol) wurden in Methanol (4 ml) gelöst und Piperidin (0,25 ml) wurde zu der Lösung hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde am Rückflusskühler vier Stunden lang erhitzt. Überschüssiges Lösungsmittel wurde entfernt, und der Rückstand wurde wieder in Methanol gelöst. Ein Feststoff wurde mit Diethylether ausgefällt und durch Filtration gesammelt. Das Benzothiazoliumanilinmonoen, Farbstoff 2, wurde auf einer Vakuumpumpe über Nacht getrocknet. Falls erwünscht kann der reine Farbstoff durch Umkehrphasen-HPLC-Chromatographie erhalten werden, und die Struktur kann durch ¹H NMR und Massenspektralanalyse bestätigt werden.

[0134] In einem alternativen Verfahren können das synthetische Intermediat V (100 mg, 0,24 mmol) und trans-4-(Diethylamino)zimtaldehyd (0,24 mmol) in Methanol (4 ml) gelöst werden und Piperidin (0,25 ml) kann zu der Lösung hinzugegeben werden. Das Reaktionsgemisch kann am Rückflusskühler vier Stunden lang erhitzt werden. Überschüssiges Lösungsmittel kann dann entfernt werden, und der Rückstand kann wieder in Methanol gelöst werden. Das feste Produkt kann dann mit Diethylether ausgefällt und durch Filtration gesammelt werden.

Herstellung von polymerem Farbstoff 17B

[0135] Der polymere Farbstoff 17B (ein Vorläufer von polymerem Farbstoff 17D) wurde synthetisiert durch Anlagerung von Farbstoff 2 an Polymer 11A unter Verwendung von EDAC als Dehydratisierungsmittel. Die Herstellung ist in Schema 6 gezeigt.



Schema 6

[0136] Polymer 11A (20 mg, Sigma Chemical Co., Katalog Nr. P-9905, Molekulargewicht 180.000) wurde in Puffer Nr. 1 (4,0 ml) gelöst, um eine Konzentration des Polymers von 5 mg/ml ($2,78 \times 10^{-8}$ Mol Polymer) zu ergeben. Ungefähr 150 Moläquivalente von Farbstoff 2 (5,0 mg, $4,17 \times 10^{-6}$ Mol) wurden zu der Lösung hinzugegeben, die das Polymer enthielt, indem Farbstoff 2 (5,0 mg) in DMSO gelöst wurde und diese Lösung zu der gepufferten wässerigen Lösung des Polymers hinzugegeben wurde. Fünf 300-mg-Aliquote von festem EDAC wurden in etwa ½-Stunden-Intervallen hinzugegeben, als das Reaktionsgemisch in der Dunkelheit über Nacht gerührt wurde.

[0137] Der polymere Farbstoff von dem Reaktionsgemisch wurde von ungebundenem Farbstoff getrennt durch Elution in Puffer Nr. 1 auf einer Säule ("SEPHADEX G-25"). Die Hohlraumvolumenfraktionen wurden gesammelt (ungefähr 3,0 ml Gesamtvolumen) und das Produkt wurde unter Verwendung eines Zentrifugenmikroindickers ("CENTRICON-30") eingeengt.

Herstellung von polymerem Farbstoff 17D

[0138] Der polymere Farbstoff 17B wurde zu einer Konzentration von 1,0 mg/ml in Puffer Nr. 1 verdünnt, um eine Vorratslösung zu bilden. Ein Aliquot des polymeren Farbstoffs 17B in Lösung (3,0 ml, 3,0 mg Polymer) wurde aus der Vorratslösung genommen, die polymeren Farbstoff 17B enthielt, und Cyclodextrinaldehyd 6 (1,9 mg, hergestellt wie beschrieben in Huff, J. B., Bieniarz, C., J. Org. Chem., 1994, 59, 7511–5716) wurde hinzugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur (25°C) 72 Stunden lang in der Dunkelheit inkubieren gelassen. Der resultierende polymere Farbstoff 17D wurde auf einer Säule ("SEPHACRYL 5-300") durch Elution in Puffer Nr. 2 bei einer Strömungsgeschwindigkeit von etwa 1 bis 3 ml/min unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe gereinigt. Die hochmolekulargewichtigen Fraktionen wurden gesammelt (ungefähr 5,0 ml), zusammengefasst und unter Verwendung eines Mikroindickers ("CENTRICON-30") eingeengt.

[0139] Ein Vergleich der Fluoreszenzemission für polymeren Farbstoff 17B allein, polymeren Farbstoff 17B plus Cyclodextrin, das nicht kovalent gebunden ist, und polymeren Farbstoff 17D (kovalent angelagertes Cyclodextrin) ist in **Fig. 5** gezeigt. In **Fig. 5** zeigt Kurve A die relative Fluoreszenzintensität von polymerem Farbstoff 17B als eine Funktion der Wellenlänge an; Kurve B zeigt die relative Fluoreszenzintensität von polymerem Farbstoff 17B plus Cyclodextrin, das nicht kovalent gebunden ist, als eine Funktion der Wellenlänge an; Kurve C zeigt die relative Fluoreszenzintensität von polymerem Farbstoff 17D als eine Funktion der Wellenlänge an. **Fig. 6** zeigt die Verdünnungskurven von polymerem Farbstoff 17D. Diese Kurven zeigen eine lineare Fluoreszenzantwort über der Konzentration von polymerem Farbstoff 17D an. Ebenfalls eingeschlossen ist die Verdünnungskurve für polymeren Farbstoff 17B allein und polymeren Farbstoff 17B in einem Vorratsverdünnungsmittel mit 0,25 mg/ml Cyclodextrin. In **Fig. 6** zeigt Kurve A die Fluoreszenz von polymerem Farbstoff 17D als eine Funktion der Verdünnung des Farbstoffs an; Kurve B zeigt die Fluoreszenz von polymerem Farbstoff 17B als eine Funktion der Verdünnung des Farbstoffs an; Kurve C zeigt den polymeren Farbstoff 17B plus Cyclodextrin, nicht kovalent gebunden, als eine Funktion der Verdünnung des Farbstoffs.

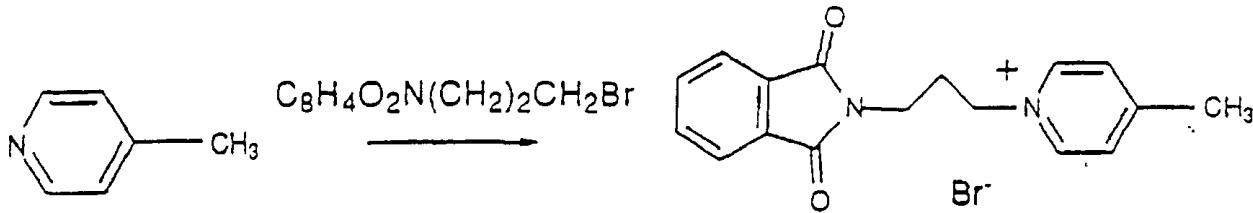
BEISPIEL VI

Herstellung des Cyclodextrinderivats von

[0140] Acrylsäurepyridiniumanilinmonoenpolymer 13D Farbstoff 4 wurde kovalent an Acrylsäurepolymer unter Verwendung der EDAC-Methodologie gebunden. Cyclodextrinmonoamin 7 wurde kovalent an Acrylsäurepyridiniumanilinmonoenpolymer unter Verwendung der EDAC-Methodologie gebunden.

Herstellung von Farbstoff 4

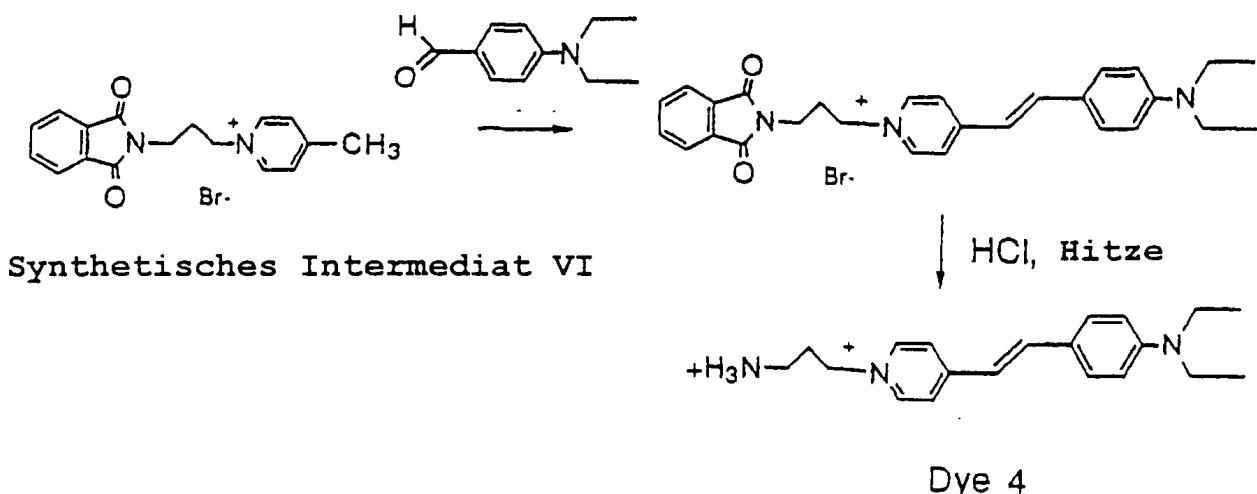
[0141] 4-Methylpyridin (10 g) wurde mit 3-Brompropylphthalimid (28,8 g) in Lösungsmittel Ethanol (20 ml) umgesetzt, als das Reaktionsgemisch auf 100°C erhitzt und bei dieser Temperatur 20 Minuten lang gehalten wurde. Die N-quaternisierte Spezies von N-(3-Phthalimidopropyl)-4-methylpyridiniumbromin (nachfolgend "synthetisches Intermediat VI") wurde gereinigt, indem das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt wurde und der Rückstand wieder in Methanol gelöst wurde. Diese Lösung wurde dann mit Diethylether titriert und auf eine Temperatur von 2 bis 8°C gekühlt, bis sich ein Niederschlag gebildet hatte. Der Niederschlag (23,3 g, synthetisches Intermediat VI) wurde dann durch Filtration getrennt. Die Herstellung des synthetischen Intermediats VI ist in Schema 7 veranschaulicht.



Synthetisches Intermediat VI

Schema 7

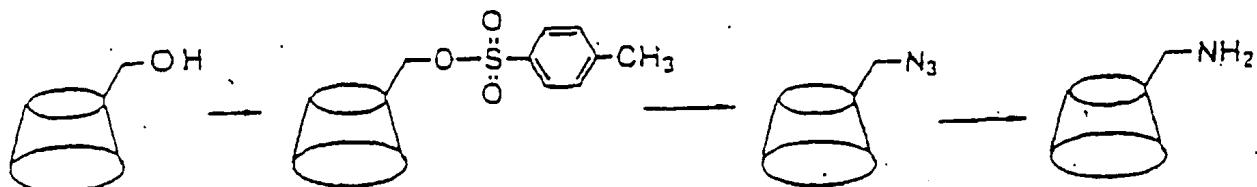
[0142] Das synthetische Intermediat VI (5,0 g) wurde in Pyridin (10 ml) verdünnt, 4-(Diethylamino)benzaldehyd (7 g, Aldrich Chemical Co.) wurde zu dem Reaktionsgemisch hinzugegeben. Die resultierende Suspension wurde dann durch die Zugabe von wasserfreiem Ethanol (4 ml) löslich gemacht. Dieses Reaktionsgemisch wurde vier Stunden lang bei einer Temperatur von 100°C gerührt, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Das Imidintermediat wurde gereinigt durch Silicagelsäulenchromatographie unter Elution mit einer Mischung von CH₂Cl₂ (95 Vol-%)/Methanol (5 Vol-%). Das Imidintermediat wurde hydrolysiert zur freien Aminverbindung Farbstoff 4, indem sie in konzentrierter HCl (30 ml) fünf Stunden lang am Rückflusskühler erhitzt wurde. Das saure Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur gekühlt und das restliche Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde, um Farbstoff 4 bereitzustellen, durch präparative HPLC gereinigt unter Verwendung einer C-8-Umkehrphasensäule und Methanol mit 0,5% Trifluoressigsäure als die mobile Phase. Die Herstellung dieses Farbstoffs ist in Schema 8 veranschaulicht.



Schema 8

Herstellung von Cyclodextrinmonoamin

[0143] Cyclodextrinamin wurde hergestellt, wie in Schema 9 veranschaulicht.



Schema 9

Herstellung von Cyclodextrinmonotosylat

[0144] Beta-Cyclodextrin wurde erhalten von der Aldrich Chemical Company. Cyclodextrinmonotosylat wurde hergestellt wie beschrieben in Petter, R. C., Salek, J. S., Sikorski, C. T., Kumaravel, G., Lin, F.-T., J. Amer. Soc. 1990, 112, 3360–3368.

Herstellung von Cyclodextrinmonoazid

[0145] Ein Reaktionsgemisch wurde hergestellt durch die Zugabe von Beta-Cyclodextrintosylat (3,06 g) und Natriumazid (0,76 g) zu Lösungsmittel Dimethylformamid (60 ml). Die resultierende Mischung wurde auf eine Temperatur von 80°C erhitzt und bei dieser Temperatur über Nacht gehalten, und dann unter Vakuum eingeengt. Der eingeengte Rückstand wurde durch Umkehrphasen-(C-18)-Silica (40 g, Fluka Nr. 60756) in einem Glasfiltertrichter filtriert. Nicht umgesetztes Cyclodextrinmonotosylat wurde von dem C-18-Silica mit Wasser gewaschen, und das Cyclodextrinmonoazidprodukt wurde von dem C-18-Silica entfernt, indem durch die Säule mit einer Mischung von Acetonitril (50 Vol-%) und Wasser (50 Vol-%) gewaschen wurde, gefolgt von Waschen durch die Säule mit Acetonitril (100%). Fraktionen von den C-18-Silica-Waschungen wurden durch Normalphasen-DC geprüft unter Verwendung eines Lösungsmittelgemischs von Isopropanol (55 Vol-%)/Ammoniumhydroxid (35 Vol-%)/Wasser (10 Vol-%). Das Ammoniumhydroxid war konzentriertes Ammoniumhydroxid in Wasser. Die C-18-Silica-Waschfraktionen, die frei von Monotosylat waren, wie bestimmt durch DC, wurden vereinigt und unter reduziertem Druck eingeengt. Das konzentrierte Material wurde in Methanol gelöst und das Produkt, Cyclodextrinmonoazid, wurde mit Diethylether ausgefällt. Das feste Cyclodextrinmonoazidprodukt wurde dann filtriert und mit Diethylether gewaschen.

Herstellung von Cyclodextrinmonoamin 7

[0146] Cyclodextrinmonoazid (0,51 g) wurde in Wasser (50–100 ml) gelöst. Kohlenstoff mit 5% Palladium (150 mg) wurde zu der Lösung unter einer Stickstoffatmosphäre hinzugegeben. Der Kohlenstoff/Palladium-Katalysator löste sich nicht. Die Reaktionssuspension wurde unter einer Wasserstoffatmosphäre gesetzt und über Nacht in einem Schüttelapparat/Hydrierapparat ("PARR") geschüttelt (bei 20 Psi H₂-Druck). Das Reaktionsge-

misch wurde durch Normalphasen-DC unter Verwendung einer Mischung von Isopropanol (55 Vol-%)/Ammoniumhydroxid (35 Vol-%)/Wasser (10 Vol-%) als ein Entwicklungslösungsmittel überwacht. Das Ammoniumhydroxid war konzentriertes Ammoniumhydroxid in Wasser. Das Reaktionsgemisch wurde durch ein Filterhilfsmittel ("CELITE") zweimal filtriert. Nachdem das Fehlen von nicht umgesetzten Ausgangsmaterial in dem Reaktionsgemisch bestätigt wurde, wurde das wässrige Filtrat unter Vakuum eingeengt und Cyclodextrinmonoamin (0,28 g) wurde erhalten. Eine zusätzliche Waschung des Reaktionsrückstands auf Filterhilfsmittel ("CELITE") mit Wasser (500 ml), gefolgt von Konzentration, erbrachte zusätzliches Cyclodextrinmonoamin (0,057 g). Beide Chargen Produkt wurden vereinigt und ohne weitere Reinigung zur Herstellung der polymeren Farbstoffe 13D, 15D und 18D verwendet.

Herstellung von Acrylsäurepyridiniumanilinmonoenpolymer (polymerer Farbstoff 13B)

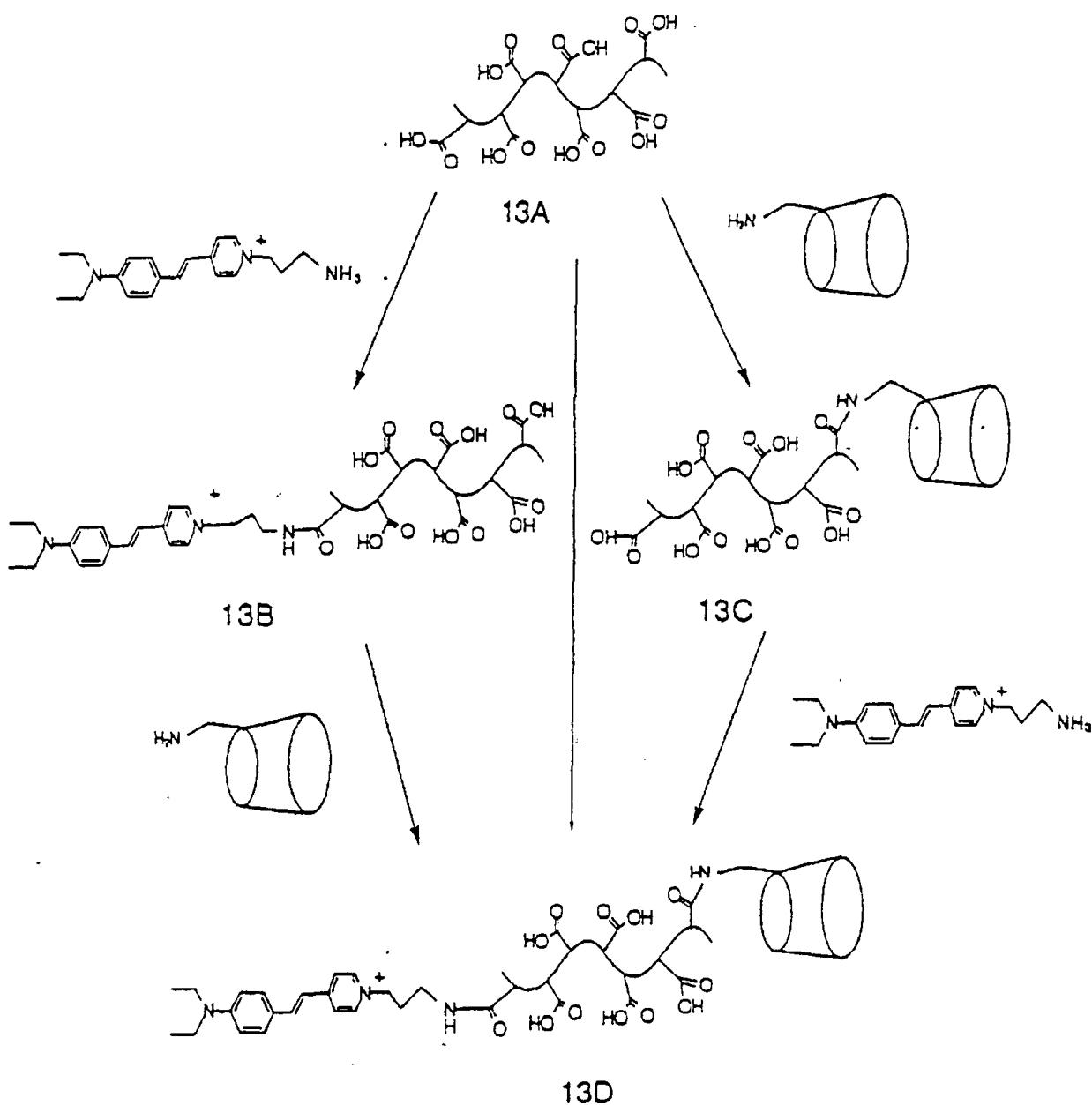
[0147] Eine Vorratslösung von Acrylsäurepolymer 13A (Molekulargewicht ungefähr 200.000, Polysciences, Warrington, PA) wurde hergestellt, indem Acrylsäurepolymer in deionisiertem Wasser bei einer Konzentration von 20 mg/ml gelöst wurde. Ein Reaktionsgemisch wurde hergestellt, indem ein 1-ml-Aliquot der Vorratslösung von Acrylsäurepolymer und Farbstoff 4 (0,68 mg, 20 Moläquivalente) vereinigt wurden. Aliquote von festem EDAC (je 3,3 mg) wurden in ½-Stunden-Intervallen in fünf Inkrementen über einen Zeitraum von 2 Stunden hinzugegeben, während das Reaktionsgemisch fortlaufend gerührt wurde. Der resultierende polymere Farbstoff 13B wurde gereinigt durch Sammlung des Hohlraumvolumens auf einer Ausschlussäule (100–300 Maschen, "SEPHADEX G-25").

Herstellung des Cyclodextrinderivats von

Acrylsäurepyridiniumanilinmonoenpolymer (polymerer Farbstoff 13D)

[0148] Ein Reaktionsgemisch, das Farbstoff 4 (0,68 mg), Cyclodextrinmonoamin 7 (4,0 mg) und eine Lösung von Acrylsäurepolymer (1,0 ml, 20 mg/ml) in deionisiertem Wasser enthielt, wurde hergestellt. Fünf Aliquote EDAC (je 10 mg) wurden zu dem Reaktionsgemisch über einen Zeitraum von zwei Stunden hinzugegeben. Die Mischung wurde fortlaufend gerührt. Der resultierende polymere Farbstoff wurde durch Ausschlusschromatographie ("SEPHADEX G-25") gereinigt. Die Hohlraumvolumenfraktionen wurden vereinigt und auf 3,0 ml eingeengt unter Verwendung eines Zentrifugeneindickers ("CENTRIPREP-30"). Die Mischung wurde unter Verwendung eines Trockeneis/Aceton-Bads gefroren und anschließend lyophilisiert, um den reinen festen polymeren Farbstoff 13D zu erhalten. Die Herstellung von polymerem Farbstoff 13D ist in Schema 10 veranschaulicht.

[0149] **Fig. 7** vergleicht die Fluoreszenz von gereinigtem polymeren Farbstoff 13B bei $1,1 \times 10^{-7}$ M (Kurve A) mit gereinigtem polymeren Farbstoff 13D bei $1,1 \times 10^{-7}$ M (Kurve B) (beide unter Verwendung einer Anregung von 488 nm).



Schema 10

BEISPIEL VII

Herstellung des Permethylcyclodextrinderivats von Acrylsäurepyridiniumanilinmonoenpolymer

[0150] Sowohl Permethylcyclodextrin 8 als auch Farbstoff 4 wurden kovalent an Acrylsäurepolymer gebunden unter Verwendung der EDAC-Methodologie.

Herstellung von Permethylcyclodextrinmonoazid

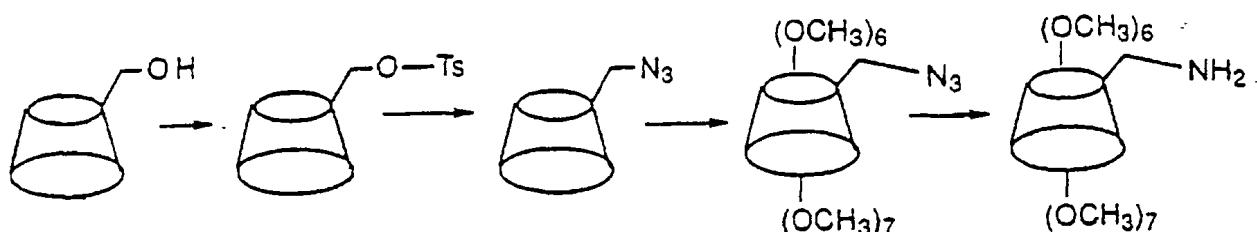
[0151] Beta-Cyclodextrin wurde erhalten von der Aldrich Chemical Company. Das Cyclodextrinmonotosylat wurde hergestellt wie beschrieben in Petter, R. C., Salek, J. S., Sikorski, C. T., Kumaravel, G., Lin, F.-T., J. Amer. Chem. Soc. 1990, 112, 3360-. Das Cyclodextrinmonotosylat wurde dann zu dem Cyclodextrinmonoazid umgewandelt, wie beschrieben in Beispiel VI, und dann in das Permethylcyclodextrinmonoazid auf die folgende Art und Weise umgewandelt.

[0152] Beta-Cyclodextrinmonoazid (0,242 g, 0,2 mmol) wurde in einer Mischung, die 3,5 ml Dimethylformamid und 3,5 ml Dimethylsulfoxid enthielt, suspendiert, und die resultierende Suspension wurde $\frac{1}{2}$ Stunde lang gerührt, bis beobachtet wurde, dass die gerührte Suspension klar war. Dann wurden BaO (1,95 g) und Ba(OH)₂·8H₂O (1,95 g) zu der Suspension in aufeinanderfolgenden Teilen hinzugegeben. Die Suspension wurde auf eine Temperatur von 0°C unter Verwendung eines Eisbades gekühlt. Dimethylsulfat (3,3 ml, 34 mmol)

wurde zu der Suspension über einen Zeitraum von einer Stunde hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 48 Stunden lang bei einer Temperatur von 2–8°C gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von konzentriertem Ammoniumhydroxid (10 ml) quenched und das restliche Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der verbleibende Feststoff wurde in einem Liter CHCl₃ verrührt und die resultierende Suspension wurde filtriert. Der resultierende Feststoff wurde dann noch einmal mit CHCl₃ (ein Liter) gewaschen. Die CHCl₃-Extrakte wurden vereinigt, auf ein minimales Volumen reduziert, indem das meiste des CHCl₃ unter reduziertem Druck entfernt wurde, und Hexan (1 l) wurde hinzugegeben, um Permethylcyclodextrinmonoazid (140 mg) zu ergeben.

Herstellung von Permethylcyclodextrinmonoamin

[0153] Permethylcyclodextrinmonoazid (100 mg) wurde in Wasser (20 ml) gelöst. Dann wurde fester Kohlenstoff, der 10% Palladium (30 mg) enthielt, hinzugegeben, und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht kräftig geschüttelt unter Verwendung eines Schüttelapparates "PARR" unter einer Wasserstoffatmosphäre bei etwa 20 Psi Druck. Das resultierende Produkt wurde durch ein Filterhilfsmittel ("CELITE") filtriert, und das Filtrat wurde unter reduziertem Druck eingeengt, um das Produkt Permethylcyclodextrinmonoamin 8 zu ergeben. Permethylcyclodextrinmonoamin 8 wurde wie in Schema 11 veranschaulicht hergestellt.

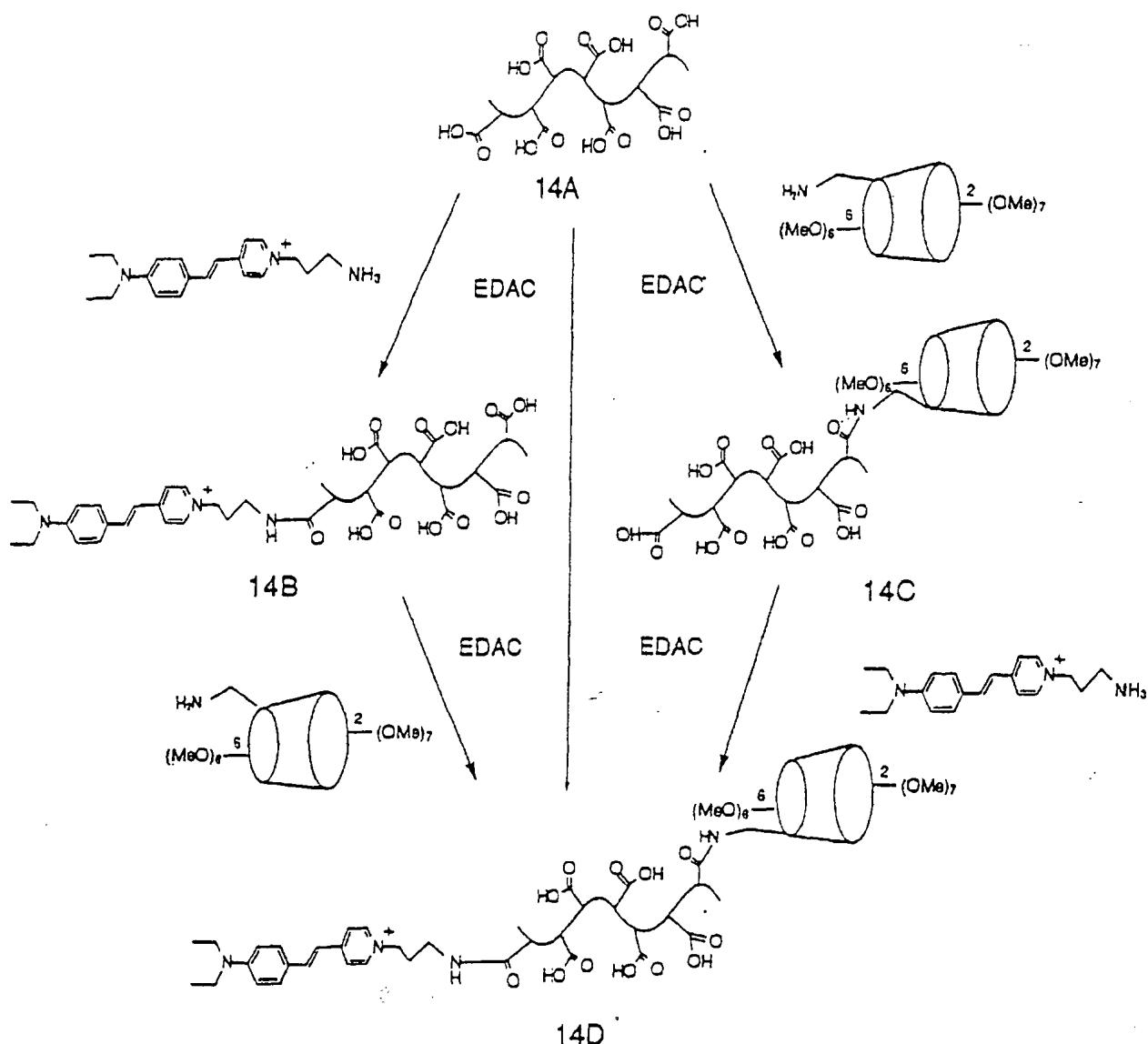


Schema 11

Herstellung des Permethylcyclodextrinderivats von

Acrylsäureoyridiniumanilinmonoenmonoaminpolymer (polymerer Farbstoff 14D)

[0154] Farbstoff 4 wurde auf die zuvor beschriebene Art und Weise hergestellt. Polyacrylsäure (5 mg) wurde in deionisiertem Wasser (0,25 ml) gelöst. Zu dieser Lösung wurde Farbstoff 4 (3,4 mg) und Permethylcyclodextrinmonoamin 8 (24 mg) hinzugegeben. Fünf Aliquote EDAC (je 52 mg) wurden zu dem Reaktionsgemisch hinzugegeben, wobei jedes Aliquot in einem ½-Stunden-Intervall hinzugegeben wurde. Das resultierende Produkt wurde durch Zentrifugation ("CENTRIPREP-30") gereinigt, gefolgt von wiederholten Waschungen mit frischem deionisiertem Wasser, bis kein restlicher Farbstoff durch die Membran hindurchgelangte. Die Herstellung von polymerem Farbstoff 14D ist in Schema 12 veranschaulicht.



Schema 12

[0155] Der resultierende polymere Farbstoff 14D wurde dann auf Fluoreszenz geprüft und seine Intensität wurde mit der Intensität des Phycobiliproteins Phycoerythrin verglichen. **Fig. 8** zeigt die Ergebnisse des Fluoreszenztests, wobei die Fluoreszenz von polymerem Farbstoff 14D (Kurve A) und Phycoerythrin (Kurve B) bei der gleichen Konzentration verglichen wurde.

[0156] Die relative Photostabilität über 16 Stunden für den polymeren Farbstoff 14D verglichen mit der von Phycoerythrin unter den gleichen Bedingungen in Umgebungsraumlicht wird in **Fig. 9A** und **Fig. 9B** gezeigt. In **Fig. 9A** zeigt Kurve A die anfängliche relative Fluoreszenzintensität von polymerem Farbstoff 14D als eine Funktion der Wellenlänge; Kurve B zeigt die relative Fluoreszenzintensität von polymerem Farbstoff 14D als eine Funktion der Wellenlänge, 16 Stunden nachdem die Anfangsspektren beobachtet wurden. In **Fig. 9B** zeigt Kurve A die anfängliche relative Fluoreszenzintensität von Phycoerythrin als eine Funktion der Wellenlänge; Kurve B zeigt die relative Fluoreszenzintensität von Phycoerythrin als eine Funktion der Wellenlänge, 16 Stunden nachdem die Anfangsspektren beobachtet wurden. **Fig. 9A** und **Fig. 9B** zeigen an, dass der polymere Farbstoff 14D stabiler ist als Phycoerythrin.

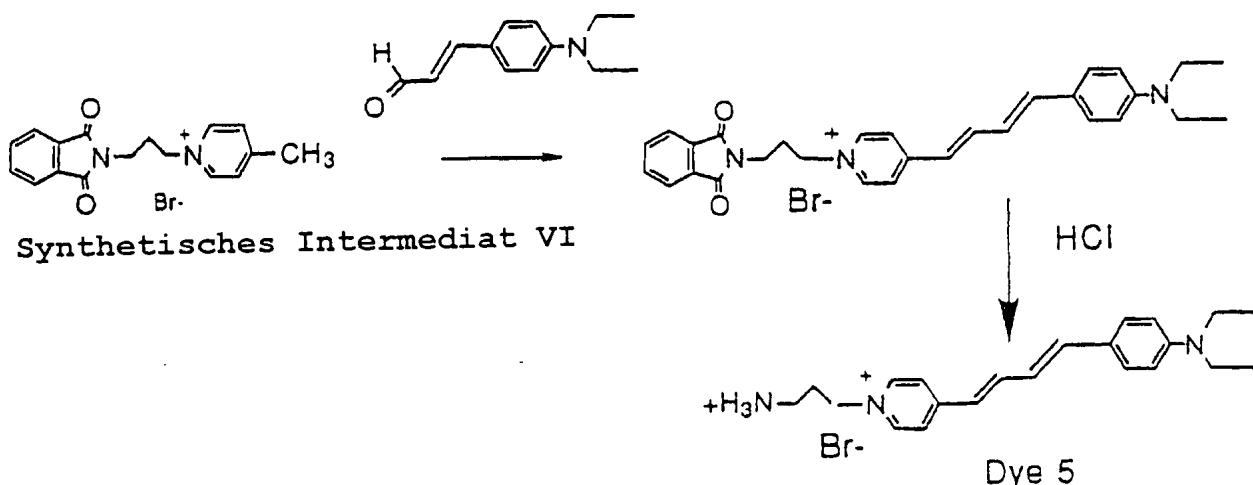
BEISPIEL VIII

Herstellung von Acrylsäurepyridiniumanilindienpolymer

Herstellung von Farbstoff 5

[0157] Farbstoff 5 wurde hergestellt durch die Kondensation des synthetischen Intermediats VI mit trans-4-(Diethylamino)zimtaldehyd in einem Verfahren, das identisch ist mit dem, das in Beispiel VI zur Her-

stellung von Farbstoff 4 beschrieben wurde, außer dass trans-4-(Diethylamino)zimtaldehyd für N,N-Diethylbenzaldehyd ersetzt wurde. Das Verfahren ist in Schema 13 veranschaulicht.



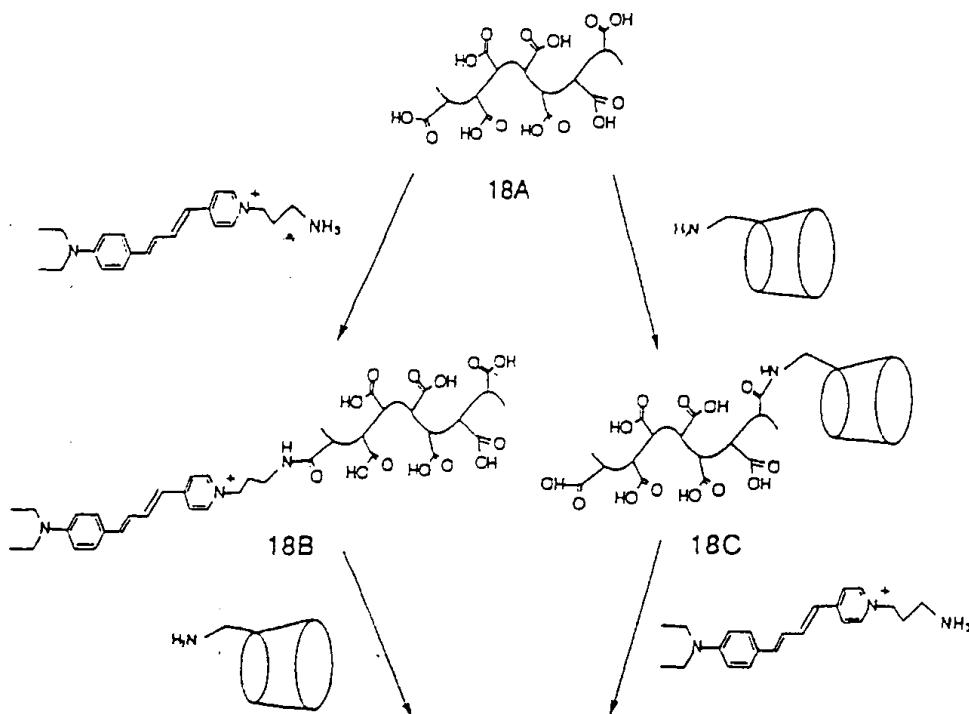
Schema 13

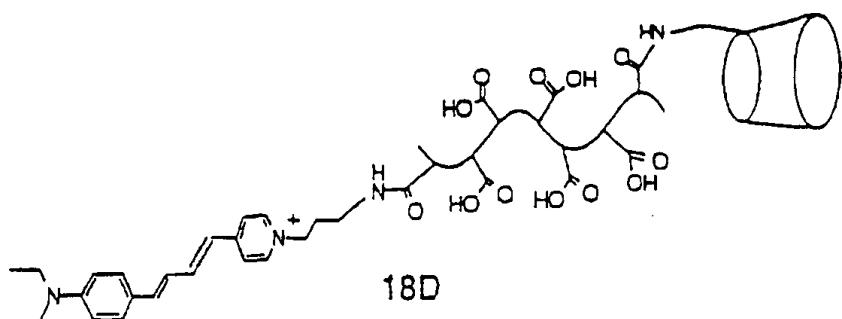
[0158] Farbstoff 5 wurde durch C-8-Umkehrphasen-HPLC gereinigt unter Verwendung von Acetonitril (25 Vol-%)/Wasser (75 Vol-%) als mobile Phase.

Herstellung von Cyclodextrin-modifiziertem

Acrylsäurepyridiniumanilindienpolymer (polymerer Farbstoff 18D)

[0159] Acrylsäurepyridiniumanilindienpolymer kann hergestellt werden, wie in Beispiel VI beschrieben, außer dass Farbstoff 5 für Farbstoff 4 ersetzt wird. Dieses Verfahren ist in Schema 14 veranschaulicht.





Schema 14

BEISPIEL IX

Konjugation von Acrylamidhydrazidpyridiniumanilinmonoenpolymer an Anti-CD8-IgG-Antikörper

[0160] Eine Vorratslösung von polymerem Farbstoff 11D wurde wie in Beispiel I beschrieben hergestellt, um eine Konzentration von 2,7 mg/ml zu ergeben. Eine Vorratslösung von Anti-CD8-IgG-Antikörper wurde in Puffer Nr. 2 bei einer Konzentration von 10 mg/ml hergestellt. Ein Aliquot, das 5,0 mg Anti-CD8-IgG-Antikörper enthielt, wurde aus der Vorratslösung entnommen und auf rund 300 µl konzentriert unter Verwendung eines Mikroindicators ("CENTRICON-30"). Das konzentrierte Material wurde dann mit einem Puffer verdünnt, der 50 mM Thiethanolamin, 160 mM NaCl enthielt, pH 8,0 (nachfolgend "Puffer Nr. 3"). Die Endkonzentration von Anti-CD8-IgG-Antikörper war ungefähr 3 bis 4 mg/ml.

[0161] Eine Vorratslösung von Natriumperiodat in Puffer Nr. 3 wurde mit einer Konzentration von 42,8 mg/ml hergestellt. Etwa 120 µl dieser Vorratslösung wurde zu dem Anti-CD8-IgG-Antikörper in Triethanolaminpuffer hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei einer Temperatur von 2–8°C in der Dunkelheit inkubiert, während es leicht mit einem mechanischen Schüttelapparat eine Stunde lang geschüttelt wurde. Der resultierende oxidierte IgG-Antikörper wurde dann gereinigt durch Elution durch eine Säule (100–300 Maschen, "SEPHADEX G-25") mit Puffer Nr. 1. Fraktionen wurden durch Ultraviolett-Spektroskopie (UV) untersucht, und jene Hohlraumvolumenfraktionen mit mehr als 0,2 AU (erledigt gegen den gleichen Puffer Nr. 1) wurden zusammengefasst und eingeengt, um ein Endvolumen von 1 bis 3 mg/ml zu ergeben.

[0162] Der polymere Farbstoff 11D wurde hergestellt durch Reaktion von polymerem Farbstoff 11B (0,24 mg/ml) mit Cyclodextrinaldehyd (6,0 mg/ml, hergestellt wie beschrieben in J. Org. Chem., 1994, 59, 7511–7516). Der Fortschritt der Reaktion wurde überwacht durch Ausschluss-HPLC unter Verwendung einer Ausschlussäule ("BIO-GEL TSK-50XL" oder "BIO-SIL SEC-300") bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 1,0 ml/Minute in Puffer Nr. 2. Der polymere Farbstoff 11D, hergestellt wie in Beispiel I beschrieben, wurde dann mit dem frisch hergestellten oxidierten Antikörper vereinigt. Die Molverhältnisse von polymerem Farbstoff 11D zu IgG-Antikörper waren entweder 1,5/1,0 oder 3,0/1,0. Der Ertrag der Biokonjugation wurde bewertet durch genaue Injektionen von Ausgangsmaterialvorratslösungen und Reaktionsgemisch auf eine Ausschlussäule ("BIO-SIL SEC-300" oder "BIO-GEL TSK-50XL"). Das resultierende Konjugat wurde dann auf einer Mitteldrucksäule (SEPHACRYL S-300) durch Elution mit Puffer Nr. 2 gereinigt. Die hochmolekulargewichtigen Fraktionen wurden gesammelt und Konzentrationen wurden aus Ultraviolett-Spektren der Fraktionen bewertet. Fraktionen wurden in einem Durchflusszytometer auf Leistungsfähigkeit geprüft.

BEISPIEL X

Konjugation von Acrylamidhydrazidpyridiniumanilinmonoenpolymer an Anti-CD8-IgG-Antikörper

[0163] Alternativ kann der polymere Farbstoff 11B an IgG-Antikörper konjugiert werden. Das Konjugat, das den polymeren Farbstoff 11B umfasst, wird verwendet anstelle eines Konjugats, das den polymeren Farbstoff 11D umfasst (siehe Beispiel IX), und das erstere wird dann in das letztere in situ umgewandelt durch die Zufügung von Cyclodextrinaldehyd bei einer Konzentration von etwa 6 mg/ml. In dem alternativen Verfahren ist die Konzentration von Konjugat etwa 0,2 bis etwa 0,4 mg/ml.

BEISPIEL XI

Konjugation von Acrylamidhydrazidpyridiniumanilindienpolymer an Anti-CD8-IgG-Antikörper

[0164] Der polymere Farbstoff 12B wurde an IgG-Antikörper auf die folgende Art und Weise konjugiert. Der

DE 697 20 809 T2 2004.04.01

IgG-Antikörper wurde wie in Beispiel IX beschrieben oxidiert. Der IgG-Antikörper wurde gereinigt unter Verwendung einer Säule ("SEPHADEX G-25"), die mit Puffer Nr. 1 ins Gleichgewicht gebracht wurde. Der Antikörper wurde dann zu einer Konzentration von etwa 3,0 mg/ml verdünnt (wie bestimmt durch A_{280} -UV-Messung). Der IgG-Antikörper wurde dann in Acetatpuffer (pH 4,5, 0,1 N Acetat, 0,1 N NaCl) (nachfolgend "Puffer Nr. 4") unter Verwendung eines Mikroeindickers ("CENTRICON-30") ausgetauscht, wobei die Endkonzentration etwa 3,0 mg/ml betrug. Der polymere Farbstoff 12B (hergestellt wie in Beispiel IV beschrieben) wurde dann in Acetatpuffer (pH 5,5, 0,1 N Acetat, 0,1 N NaCl) (nachfolgend "Puffer Nr. 5") unter Verwendung eines Mikroeindickers ("CENTRICON-30") ausgetauscht. Zuletzt wurde ein Teil (400 Mikroliter, 1,2 mg) Antikörpervorrat in Puffer Nr. 4 bei einer Konzentration von 3,0 mg/ml zu einem Teil polymerem Farbstoff 12B (1,5 ml, 4,5 mg) bei einer Konzentration von 3,0 mg/ml in Puffer Nr. 5 hinzugegeben. Die resultierende Mischung wurde über Nacht bei einer Temperatur von 2–8°C unter leichtem Schütteln in der Dunkelheit inkubieren gelassen.

[0165] Das resultierende Konjugat wurde dann mit Cyclodextrinaldehyd umgesetzt, indem genügend Cyclodextrinaldehyd hinzugegeben wurde, um eine Endkonzentration von 3,0 mg Cyclodextrinaldehyd pro ml Puffer zu ergeben. Das rohe Biokonjugat wurde dann über Nacht in Anwesenheit von Cyclodextrinaldehyd inkubiert und unter Verwendung einer Säule ("SEPHACRYL 5-300") gereinigt.

BEISPIEL XII

Konjugation von Acrylamidhydrazidpyridiniumanilindienpolymer an Anti-CD8-IgG-Antikörper

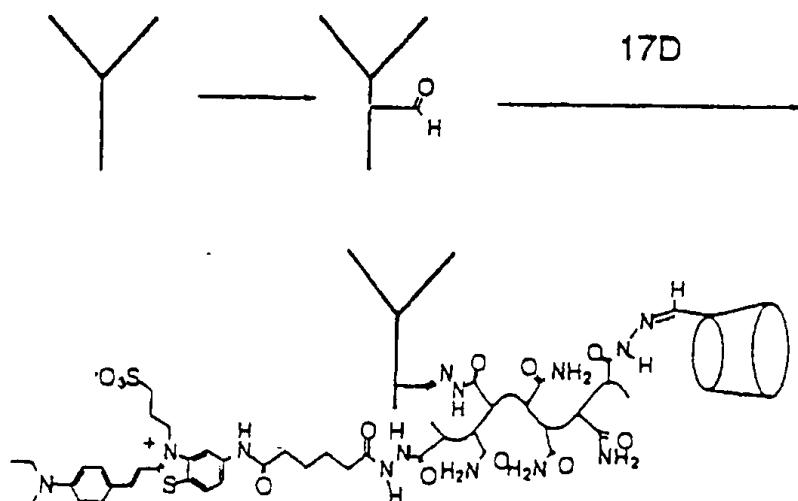
[0166] In einer alternativen Ausführungsform wurde der polymere Farbstoff 12D an IgG-Antikörper auf die folgende Art und Weise konjugiert. Der polymere Farbstoff 12B wurde wie in Beispiel IV beschrieben hergestellt. Dann wurde festes Cyclodextrinaldehyd bei einem Verhältnis von 1,5 mg Cyclodextrinaldehyd für je 0,4 mg polymeren Farbstoff 12B in 0,250 ml Puffer Nr. 5 hinzugegeben. Das Cyclodextrinaldehyd und der polymere Farbstoff 12B reagierten, als das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur in der Dunkelheit gerührt wurde. Das Reaktionsprodukt wurde durch Ausschlusschromatographie ("SEPHADEX G-25") gereinigt, um polymeren Farbstoff 12D zu ergeben. Der polymere Farbstoff 12D wurde dann bei einem Verhältnis von 3,0 Äquivalenzen polymerem Farbstoff für jedes Äquivalent IgG-Antikörper umgesetzt, wie in Beispiel XI unter Verwendung von polymerem Farbstoff 12B beschrieben. Der Biokonjugation folgte dann HPLC, wie in Beispiel XI beschrieben. Das resultierende Konjugat wurde unter Verwendung einer Ausschlussäule ("SEPHACRYL 5-300") gereinigt.

BEISPIEL XIII

Konjugation von Acrylamidhydrazidbenzathiazoliumanilinmonoenpolymer an IgG-Antikörper

[0167] Der polymere Farbstoff 17D wurde auf die in Beispiel V beschriebene Art und Weise hergestellt. Ein Aliquot polymerer Farbstoff (3,0 ml, 1,0 mg polymerer Farbstoff pro 1,0 ml Lösung) wurde von einer Vorratslösung des polymeren Farbstoffs in Puffer Nr. 2 entnommen. Puffer Nr. 1 wurde verwendet, um Puffer Nr. 2 unter Verwendung eines Mikroeindickers ("CENTRICON-30") auszutauschen. Die Konzentration des polymeren Farbstoffs war dann 2,36 mg/ml. Der Antikörper wurde auf die Art und Weise oxidiert, die in Beispiel IX beschrieben ist, und Biokonjugation von polymerem Farbstoff 17D an IgG-Antikörper wurde auf die Art und Weise durchgeführt, die für den polymeren Farbstoff 11D in Beispiel XI beschrieben wurde.

[0168] Schema 15 ist eine schematische Darstellung des Verfahrens zur Herstellung des Konjugats von diesem Beispiel.



Schema 15

BEISPIEL XIV

Konjugation von thioliertem Acrylsäurepyridiniumanilinmonoenpolymer an Maleimidderivatisierten Anti-CD4-IgG-Antikörper

Herstellung von thiophosphoryliertem Acrylsäurepolymer

[0169] Acrylsäurepolymer (100 mg) wurde in deionisiertem Wasser (50 ml) gelöst. Cystamin-S-phosphat (1,6 mg, Aldrich Chemical Company) wurde zu der Lösung hinzugegeben. Dann wurden fünf Aliquote EDAC (je 8,5 mg) zu der Lösung in ½-Stunden-Intervallen über einen Zeitraum von mehreren Stunden hinzugegeben, als die Lösung fortlaufend gerührt wurde. Das resultierende Produkt wurde durch Filtrationsreinigung ("CENTRIPREP-30") gereinigt. Ein Teil wurde abgezogen, hydrolysiert und untersucht. Standard-DTNB-Thiol-Assaymethologie wurde verwendet, um zu bestimmen, dass für den Teil festgestellt wurde, dass er neun Thiolgruppen pro polymeren Farbstoff im Mittel enthält.

Herstellung von Cyclodextrin-modifiziertem

Acrylsäurepyridiniumanilinmonoen-thiophosphoriliertem Polymer (polymerer Farbstoff 15D)

[0170] Thiophosphatpolymer (5,0 mg) wurde in deionisiertem Wasser (1,0 ml) gelöst. Als nächstes wurden Farbstoff 4 (1,7 mg, hergestellt auf die Weise, die in Beispiel VI beschrieben ist) und Cyclodextrinamin 7 (12 mg, hergestellt wie in Beispiel VI beschrieben) zu dieser Lösung hinzugegeben. Fünf Aliquote EDAC (je 26 mg) wurden zu dem Reaktionsgemisch in ½-Stunden-Intervallen hinzugegeben. Das Material wurde dann durch Zentrifugation ("CENTRIPREP-30") gereinigt und zur Konjugation an IgG-Antikörper verwendet.

Konjugation von polymerem Farbstoff 15D an IgG-Antikörper

[0171] Ein Aliquot Anti-CD4-IgG-Antikörper (0,500 ml) wurde von einer Vorratslösung genommen, die 4,0 mg Antikörper pro 1,0 ml Lösung enthielt. Das Material wurde in Puffer Nr. 3 unter Verwendung eines Mikroelindikers ("CENTRICON-30") ausgetauscht. Ein zweiter Austausch wurde durchgeführt, um den IgG-Antikörper zurück in Puffer Nr. 3 zu bringen. Oxidation wurde durchgeführt, indem Natriumperiodat (42,8 mg) in Puffer Nr. 3 gelöst wurde und 0,100 ml dieser Vorratslösung zu dem Antikörper hinzugegeben wurde, um ein Reaktionsgemisch zu bilden. Die Konzentration an Antikörper für diese Reaktion lag bei 1,0 mg/ml. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunden lang bei einer Temperatur von 2–8°C inkubiert. Der oxidierte Antikörper wurde dann gereinigt unter Verwendung einer Säule ("SEPHADEX G-25"), die mit Puffer Nr. 5 ins Gleichgewicht gebracht wurde. Fraktionen wurden gesammelt und jene Hohlraumvolumenfraktionen, die AU-Auslesungen von mindestens 0,1 bei A280 enthielten, wurden vereinigt. Dann wurde, die Lösung, die IgG-Antikörper enthielt, eingengt, um eine Konzentration von etwa 1,5 mg/ml zu ergeben.

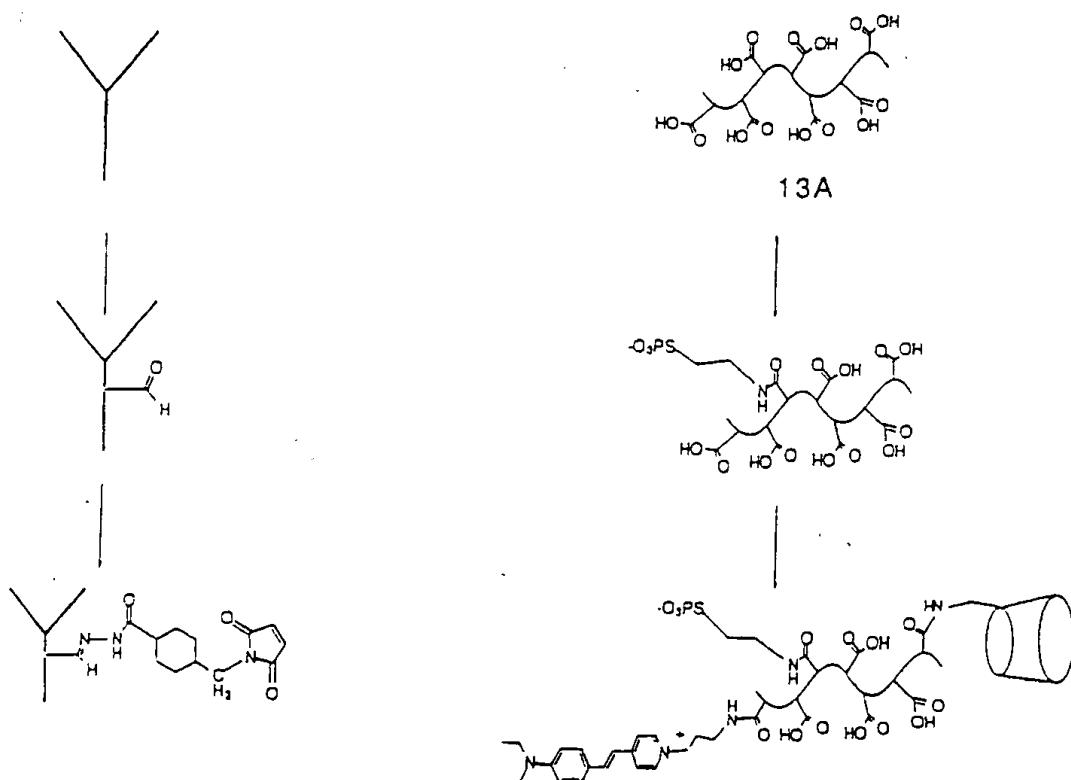
[0172] Dann wurde Hydrazidomaleimid M2C2H (0,369 mg, Pierce Chemical, Katalog Nr. 22304) in Puffer Nr. 2 (0,100 ml) gelöst und zu dem oxidierten IgG-Antikörper (etwa 2,0 mg IgG-Antikörper) hinzugegeben. Die Mischung wurde dann bei Raumtemperatur zwei Stunden lang inkubiert und über Nacht bei einer Temperatur von etwa 2–8°C leicht geschüttelt. Der Maleimid-derivatierte IgG-Antikörper wurde dann durch Ausschlusschromatographie

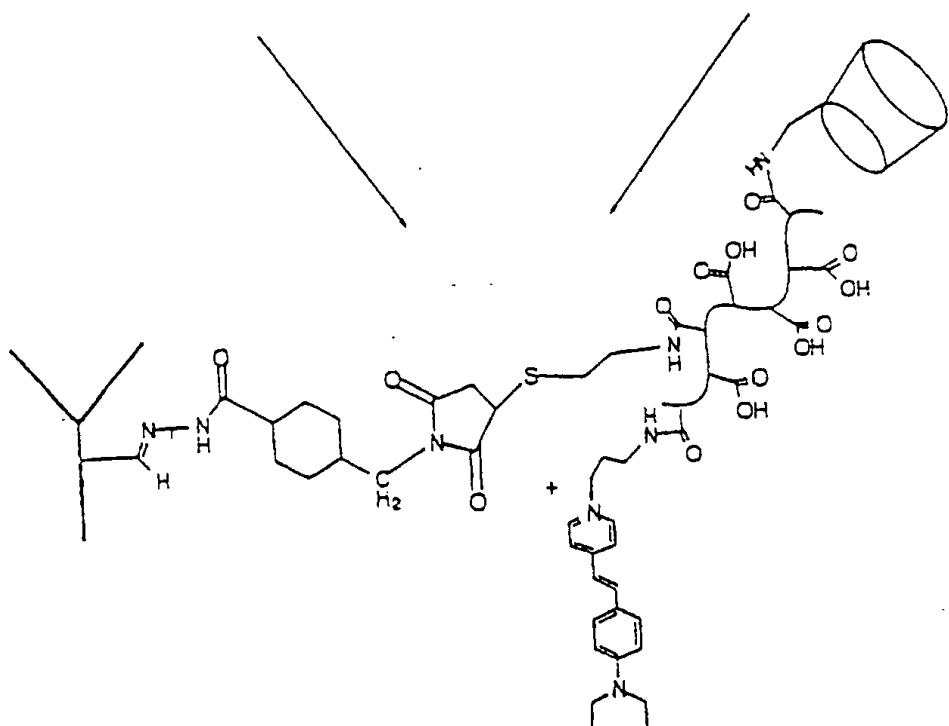
matographie ("SEPHADEX G-25") gereinigt, und die Hohlraumvolumenfraktionen wurden vereinigt.

[0173] Die IgG-Antikörper-Lösung (1,7 mg) wurde zuerst eingeengt auf rund 0,3–0,4 ml und dann auf 1,0 ml verdünnt mit Phosphatpuffer von pH 7,0 mit 0,1 mM ZnCl₂ und 1 mM MgCl₂ (nachfolgend "Puffer Nr. 6"). Ein Aliquot alkalische Phosphatase (0,005 ml mit einer Stoffkonzentration von 10 mg Enzym/ml, Boehringer Mannheim) wurde dann zu dieser Lösung hinzugegeben.

[0174] Als nächstes wurde polymerer Farbstoff 15D (2,55 mg) mit deionisiertem Wasser (2,31 ml) verdünnt und die resultierende Lösung wurde zu dem Maleimid-derivatisiertem IgG-Antikörper/alkalische Phosphatase-System hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden lang bei einer Temperatur von 2–8°C in der Dunkelheit unter leichtem Schütteln inkubiert. Wahlweise können die restlichen Thiole mit 100 Äquivalenten N-Ethylmaleimid vor der Reinigung abgedeckt werden. Das Reaktionsgemisch wurde unter Verwendung einer Säule ("SEPHACRYL S-300") mit Puffer Nr. 2 gereinigt und das Konjugat wurde aus dem Hohlraumvolumen isoliert. Die Menge an Konjugat wurde aus UV-Analyse oder durch visuelle Bewertung bewertet. Analyse durch HPLC zeigte Verbrauch von nicht konjugiertem IgG-Antikörper an.

[0175] Schema 16 veranschaulicht die Herstellung des Biokonjugats von diesem Beispiel.





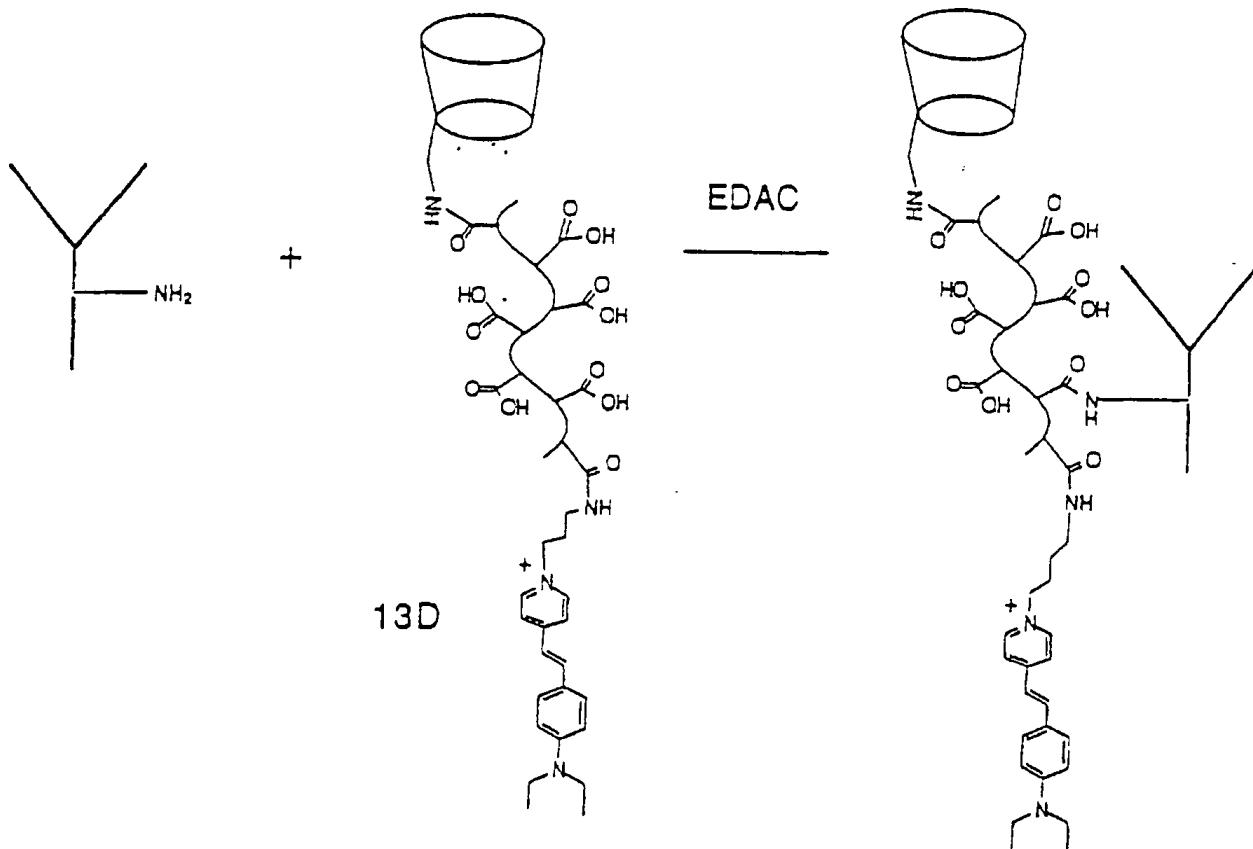
Schema 16

BEISPIEL XV

Konjugation von Acrylsäurepyridiniumanilinmonoenpolymer an IgG-Antikörper

[0176] Der polymere Farbstoff 13D wurde hergestellt auf die Weise, die in Beispiel VI beschrieben ist. Der polymere Farbstoff 13D wurde dann an IgG-Antikörper auf die folgende Art und Weise konjugiert. Anti-CD4-IgG-Antikörper wurde in HEPES-Puffer von pH 6,8 (0,1 N HEPES) (nachfolgend "Puffer Nr. 7") unter Verwendung eines Mikroeindickers ("CENTRICON-30") ausgetauscht. IgG-Antikörper wurde dann mit Puffer Nr. 7 verdünnt, um eine Konzentration von 1,0 mg Antikörper pro ml zu ergeben. Der polymere Farbstoff 13D wurde dann in deionisiertes Wasser unter Verwendung eines Mikroeindickers ("CENTRICON-30") ausgetauscht, um eine Konzentration von etwa 1,0 mg polymerem Farbstoff pro ml zu ergeben. Dann wurden Sulfo-N-hydroxy-succinimid (0,0036 ml eines 30-mg/ml-Vorrats) in deionisiertem Wasser (0,108 mg) und EDAC (0,0039 ml eines 50-mg/ml-Vorrats) in deionisiertem Wasser zu polymerem Farbstoff 13D in deionisiertem Wasser hinzugegeben, um den polymeren Farbstoff 13D zur Konjugation zu aktivieren. Der aktivierte polymere Farbstoff 13D in deionisiertem Wasser (1,8 ml, 1,8 mg) wurde mit IgG-Antikörper (1,0 ml, 1,0 mg) in Puffer Nr. 7 gemischt. Der Fortschritt der Reaktion wurde dann überwacht durch Ausschluss-HPLC unter Verwendung einer "BIO-GEL TSK-50XL"-Säule mit Puffer Nr. 1 als die mobile Phase. Das Reaktionsprodukt wurde dann durch Ausschlusschromatographie ("SEPHACRYL 5-300") unter Verwendung von Puffer Nr. 7 als die mobile Phase gereinigt.

[0177] Schema 17 veranschaulicht das Verfahren von diesem Beispiel.



Schema 17

BEISPIEL XVI

Konjugation von Maleimid-derivatisiertem Acrylsäurepyridinumianilinmonoenpolymer an thiolierten IgG-Antikörper

[0178] Acrylsäurepolymer (100 mg) wurde in deionisiertem Wasser (5,0 ml) gelöst und mit Hydrazidomaleimidlinker M2C2H (15 mg, Pierce Chemical Co., Rockford, IL) durch EDAC-Kopplung umgesetzt. Die Kopplung wurde bewirkt durch die Zugabe von fünf Aliquoten EDAC (je 15 mg) über einen Zeitraum von zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Rühren. Das resultierende Maleimid-derivatisierte Polymer wurde durch Zentrifugation ("CENTRIPREP-30") gereinigt.

[0179] Um auf Maleimide zu untersuchen, wurde Maleimid-derivatisiertes Polymer 13A (1 mg) in 1 ml 100 mM Phosphatpuffer bei pH 7,5 gelöst. Cysteamin-HCl (0,1 mg) wurde zu der Lösung hinzugegeben und die Mischung wurde eine Stunde lang inkubieren gelassen. Genau 0,100 ml der obigen Mischung wurde auf 1 ml verdünnt mit Phosphatpuffer, der 100 mM Phosphat und 100 mM NaCl enthielt, pH 7,5 (nachfolgend "Puffer Nr. 8"), und ein Standard-DTNB-Assay für Thiole wurde durchgeführt. Die Lösungsadsorption wurde bei 412 nm abgelesen und mit der Cysteamin/DTNB-Standardkurve verglichen. Folglich konnte die Zahl der Thiole, die an die verfügbaren Maleimide kovalent gebunden worden waren, indirekt aus dem beobachtbaren Unterschied bestimmt werden.

[0180] Der Maleimid-derivatierte polymere Farbstoff (5,0 mg), wie oben hergestellt, wurde in deionisiertem Wasser (1,0 ml) gelöst. Farbstoff 4 (1,7 mg) und Cyclodextrinamin 7 wurden dann zu dieser Lösung hinzugegeben. Zuletzt wurden fünf Aliquote EDAC (je 26 mg) in gleichen Intervallen über einen Zeitraum von zwei Stunden hinzugegeben. Das resultierende Material wurde dann durch Ausschlusschromatographie ("SEPHADEX G-25") gereinigt.

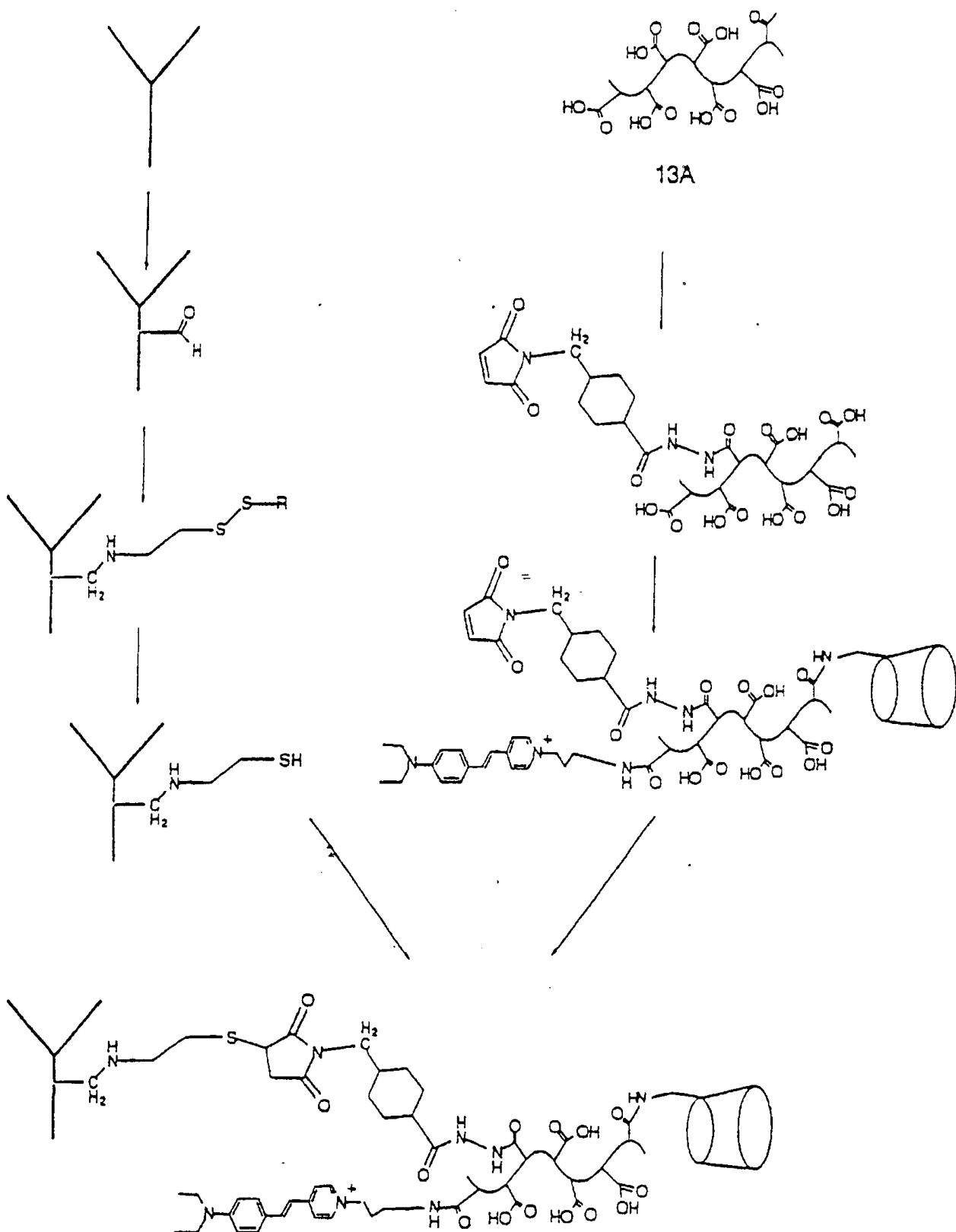
[0181] Der polymere Farbstoff 16 wurde an thiolierten IgG-Antikörper auf die folgende Art und Weise konjugiert. Anti-CD4-IgG-Antikörper (3,0 mg) wurde in Puffer Nr. 3 unter Verwendung eines Mikrobinders ("CENTRICON-30") ausgetauscht und zu einem Endvolumen von 1,0 ml verdünnt. Dann wurde NaIO₄ (0,110 ml einer Vorratslösung mit 42,8 mg/ml) zu dieser IgG-Antikörper-haltigen Lösung hinzugegeben und die resultierende Lösung wurde eine Stunde lang bei einer Temperatur von 2 bis 8°C inkubiert. Der oxidierte IgG-Antikörper wurde dann durch Gelfiltrationschromatographie ("SEPHADEX G-25") mit Puffer Nr. 2 als der Eluent gereinigt. Die Hohlraumvolumenfraktionen wurden dann vereinigt und zu einem Volumen von 0,086 ml eingeengt, um eine Endkonzentration von IgG-Antikörper von etwa 3,5 mg/ml zu ergeben.

[0182] Cystamin (0,250 ml einer Vorratslösung von 170 mg/ml) in Puffer Nr. 3 wurde zu dem frisch oxidierten IgG-Antikörper hinzugegeben, der wie oben beschrieben hergestellt wurde, um ein Reaktionsgemisch zu ergeben. Nachdem das Reaktionsgemisch 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert worden war, wurde NaCNBH₃ (0,063 ml einer Vorratslösung von 20 mg/ml) in Puffer Nr. 3 zu dieser Mischung hinzugegeben und die resultierende Mischung wurde ungefähr eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert.

[0183] Der modifizierte IgG-Antikörper wurde dann auf einer Säule ("SEPHADEX G-25") gereinigt und die Hohlraumvolumenfraktionen wurden unter Verwendung eines Mikroeindickers ("CENTRICON-30") eingeengt. Der resultierende Disulfid-funktionalisierten IgG-Antikörper wurde dann durch die Zugabe von 0,050 ml einer 6,2-mg/ml-Vorratslösung von Dithiothreitol in Puffer Nr. 2 reduziert. Nachdem die Mischung bei Raumtemperatur 15 Minuten lang inkubiert worden war, wurde der reduzierte IgG-Antikörper durch Ausschlusschromatographie ("SEPHADEX G-25") gereinigt, und das Hohlraumvolumen wurde zusammengefasst und unter Verwendung eines Mikroeindickers ("CENTRICON-30") eingeengt. Die Lösung wurde auf etwa 0,30 mg/ml verdünnt unter Verwendung von 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 (0,02 N Phosphat, 0,02 N Natriumchlorid (nachfolgend "Puffer Nr. 9").

[0184] Der polymere Farbstoff 16D, hergestellt auf die oben beschriebene Art und Weise, wurde dann in deionisiertes Wasser unter Verwendung eines Mikroeindickers ("CENTRICON-30") ausgetauscht und dann verdünnt, um eine Endkonzentration von 1,0 mg/ml zu ergeben. Ein Teil polymerer Farbstoff-Vorrat (0,500 ml, 0,5 mg Polymer, 1 mg/ml) in deionisiertem Wasser wurde zu Maleimid-derivatisiertem IgG-Antikörper (1,0 ml, 0,3 mg/ml, 0,3 mg Maleimid-derivatisierter IgG-Antikörper) in Puffer Nr. 9 hinzugegeben. Der Fortschritt der Reaktion wurde durch HPLC überwacht und der Verbrauch von IgG-Antikörper wurde angezeigt durch den Verlust von Fläche für den unmodifizierten IgG-Peak. Die Mischung wurde durch Ausschlusschromatographie ("SEPHACRYL S-300") fraktioniert.

[0185] Schema 18 veranschaulicht das Verfahren von diesem Beispiel.



Schema 18

BEISPIEL XVII

Vergleich kommerziell erhältlicher fluoreszierender Konjugate mit Konjugaten dieser Erfindung

[0186] In diesem Beispiel wurde ein Durchflusszytometriformat verwendet, um einen Vergleich zwischen den Signalen vorzunehmen, die von kommerziell erhältlichen oder sonst wie schnell hergestellten fluoreszierenden Phycobiliprotein-basierten Immunokonjugaten und den synthetischen polymeren fluoreszierenden Immuno-

nokonjugaten, die wie in Beispiel IX, X und XI hergestellt wurden, erzeugt werden. Der Vergleich wurde zwischen Konjugaten vorgenommen, die für Lymphozytmarker CD4 oder CD8 spezifisch sind.

[0187] Die Ergebnisse für den Vergleich der Konjugate, die abgeleitet sind von Polymer 11D, hergestellt wie in Beispiel IX beschrieben, und Phycoerythrin-Konjugaten, die von Antikörper mit der gleichen Spezifität abgeleitet sind, werden in **Fig. 10– Fig. 12** gezeigt.

[0188] Die Konjugate des Anti-Phycoerythrins wurden von Coulter (Hialeah, Florida) erhalten oder abgeleitet von Anti-CD8-Antikörper, der von Coulter erhältlich war. Alternativ kann Anti-CD8-Antikörper erhalten werden von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) oder DAKO Corporation (Kopenhagen, Dänemark). In einer alternativen Ausführungsform kann Phycoerythrin (Produkt Nr. P-801) von Molecular Probes (Eugene, Oregon) erhalten werden. SMCC und Traut-Reagenz können erhalten werden von Pierce (Rockford, Illinois). Thiolierung von IgG-Antikörper unter Verwendung von Traut-Reagenz und Maleimid-Derivatisierung von Phycoerythrin können ausgeführt werden unter Verwendung von Standard-Biokonjugationschemie, die dem Durchschnittsfachmann bekannt ist. Reinigung und Charakterisierung von thioliertem IgG-Antikörper und Maleimid-derivatisiertem Phycoerythrin können durchgeführt werden unter Verwendung von Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Biokonjugation und Reinigung des thiolierten IgG-Antikörpers und Maleimid-derivatisierten Phycoerythrins können durchgeführt werden unter Verwendung von Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Alternativ kann das Phycoerythrin mit Traut-Reagenz derivatisiert werden und IgG-Antikörper kann mit Maleimid derivatisiert werden unter Verwendung von SMCC, und die Konjugation der beiden Gebilde kann ausgeführt werden durch Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind.

[0189] Die Ergebnisse für den Vergleich der Konjugate, die abgeleitet sind von Polymer 12D, hergestellt wie in Beispiel XI beschrieben, und Phycoerythrin-Cy5-Konjugaten, die von Antikörper mit der gleichen Spezifität abgeleitet sind, werden in **Fig. 13** gezeigt.

[0190] Phycoerythrin-Cy5-Konjugate wurden erhalten, indem Phycoerythrin mit Cy5 wie folgt umgesetzt wurde. Reaktives Cy5 (Biological Detection Systems, Pittsburgh, PA) wurde mit R-Phycoerythrin (Molecular Probes Corporation, Eugene, Oregon) umgesetzt. Für die Verhältnisse von Farbstoff zu Phycoerythrin wurde berechnet, dass sie zwischen 5 : 1 bis 15 : 1 sein sollen. Derivatisierung wurde erreicht unter Verwendung von Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Reinigung wurde erreicht durch Verfahren wie Gel-filtrationschromatographie oder Zentrifugen-basierter Membrankonzentration, welche Verfahren dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Konjugation des resultierenden Phycoerythrin-Cy5-Farbstoff-Tandems an den Anti-CD8-Antikörper wurde bewirkt unter Verwendung von Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Ein 30-Atom-Linker, hergestellt wie in US-Patent Nr. 5.002.883 beschrieben, wurde verwendet, um den Phycoerythrin-Cy5-Tandem-Farbstoff zu derivatisieren. Anti-CD8-Antikörper wurde thioliert unter Verwendung von Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Der thiolierte Anti-CD8-Antikörper und Maleimid-derivatisiertes Phycoerythrin-Cy5 wurden dann konjugiert und gereinigt durch Ausschlusschromatographie oder ein anderes Verfahren, das dem Durchschnittsfachmann bekannt ist. Alternativ kann SMCC anstelle des 30-Atom-Linkers verwendet werden. SMCC kann verwendet werden, um das Phycoerythrin-Cy5-Tandem durch Reaktion mit Phycoerythrin-Cy5 zu derivatisieren, gefolgt von Reinigung unter Verwendung von Säulen-chromatographie oder anderen Reinigungsverfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind.

[0191] Alternativ können Phycoerythrin-Cy5-Anti-CD8-Konjugate erhalten werden von Dako (Kopenhagen, Dänemark), Coulter (Hialeah, Florida) oder Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Alternativ kann Anti-CD8-Tricolor erhalten werden von Caltag.

[0192] Andere Reagenzien, die in diesem Beispiel verwendet werden, umfassten Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) von pH 7,0 mit 0,1% Natriumazid und 1,0% Rinderserumalbumin (BSA), welche zu den Konjugaten hinzugegeben wurden, und Ammoniumchloridlyselösung. Die Lyselösung wurde folgendermaßen hergestellt:

[0193]

Bestandteil	Menge (g)
NH ₄ Cl	8,26
KHCO ₃	1,0
NaEDTA	0,037

[0194] Die oben aufgeführten Bestandteile wurden in destilliertem Wasser (1,0 Liter) gelöst und die resultierende Lösung wurde auf einen pH von 7,3 eingestellt mit HEPES-Puffer, welcher kommerziell erhältlich ist von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Die Lyselösung wurde vor Verwendung auf eine Temperatur von 41°C erwärmt.

Protokoll

[0195] Die Reagenzien wurden direkt verwendet, um einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor zu detektie-

ren. Die Teströhrchen, in welchen die Tests ausgeführt wurden, enthielten die Primärreagenzien in der Menge von 5 µg. Frisches Vollblut (200 µl) wurde dann in jedes der Reagenzgläser gebracht. Dann wurde der Inhalt von jedem Reagenzglas leicht verwirbelt und bei Raumtemperatur in der Dunkelheit 15 Minuten lang inkubiert. Nach Inkubation wurden die Reagenzgläser einmal in 3 ml des modifizierten PBS gewaschen. Die gewaschenen Reagenzgläser wurden dann 3 Minuten lang bei 500 × Schwerkraft zentrifugiert, die Überstände von diesen Reagenzgläsern wurden dann abgesaugt und die Zellpellets wurden in dem modifizierten PBS wieder suspendiert.

[0196] Nach Inkubation wurden die Reagenzgläser mit Ammoniumchlorid-Lyselösung gemäß dem folgenden Protokoll behandelt.

1. 3,0 ml der Lyselösung wurden zu jedem Reagenzglas hinzugegeben.
2. Der Inhalt von jedem Reagenzglas wurde mit einer Wegwerfpipette g sorgfältig gemischt.
3. Der Inhalt von jedem Reagenzglas wurde bei Raumtemperatur 7 Minuten lang inkubiert.
4. Der Inhalt der Reagenzgläser wurde 3 Minuten lang bei 2000 Upm zentrifugiert.
5. Bis auf 100 µl wurde der gesamte Überstand von jedem Reagenzglas abgesaugt.
6. Der Inhalt der Reagenzgläser wurde verwirbelt, um die Pellets wieder zu suspendieren.
7. 3,0 ml PBS mit 0,1% Natriumazid und 1,0% BSA wurde dann zu den wieder suspendierten Pellets hinzugegeben.
8. Schritte 4–7 wurden wiederholt.
9. 0,5 ml PBS mit 0,1% Natriumazid und 1,0% BSA wurde dann zu den wieder suspendierten Pellets hinzugegeben. Das PBS enthielt außerdem 10 mM (60 mg/ml) Pentosanpolysulfat (Sigma Chemical Company (P8275), eingestellt auf pH 7,5.

[0197] Die Inhalte von jedem Reagenzglas wurden analysiert unter Verwendung eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierapparates Facscan II, erhältlich von Becton-Dickinson Inc. Die Messgeräteeinstellungen wurden optimiert zur Visualisierung auf Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten über Vorwärts- gegen Seiten-Streuparameter. "QuickCal"-Kügelchen (erhältlich von Flow Cytometry Standards Corporation, Durham, N. C.) wurden laufen gelassen, wie durch das begleitende Softwareprogramm angewiesen, um eine Kalibrierkurve zu erzeugen. Der prozentuale Anteil der Fluoreszenzereignisse auf dem Histogramm wurde für jedes Reagenzglas unter Verwendung von drei Lichtstreugittern bestimmt.

Ergebnisse

[0198] Die Ergebnisse dieser Experimente werden gezeigt in **Fig. 10**, **Fig. 11** und **Fig. 12** für Anti-CD8/Phycoerythrin und das Anti-CD8-Pyridiniumanilinmonoenkonjugat von Beispiel IX, und in **Fig. 13** für das Anti-CD8/Phycoerythrin-Cyanin und das Anti-CD8-Pyridiniumanilindienkonjugat von Beispiel X. Die Konjugate der vorliegenden Erfindung stellen eine angemessene Auflösung von markierten und unmarkierten Lymphozyten bereit und stellen Auflösungsergebnisse bereit, die vergleichbar sind mit jenen von kommerziell erhältlichen Konjugaten.

[0199] Verschiedene Modifikationen und Abänderungen dieser Erfindung werden denjenigen, die im Fachgebiet bewandert sind, offensichtlich werden, ohne von dem Schutzmfang und dem Geist dieser Erfindung abzuweichen, und es sollte verstanden werden, dass diese Erfindung nicht übermäßig auf die veranschaulichenden Ausführungsformen, die hierin bekannt gemacht werden, beschränkt werden soll.

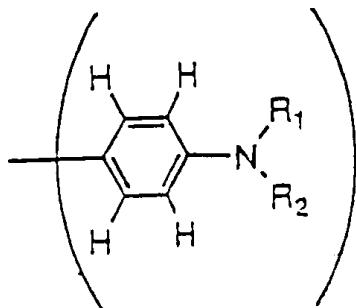
Patentansprüche

1. Ein polymerer Farbstoff, der folgendes umfaßt:
 - (a) eine polymere Einheit; und
 - (b) kovalent gebunden an diese polymere Einheit eine Vielzahl von signalerzeugenden Gruppen, worin die signalerzeugenden Gruppen abgeleitet sind von einem Farbstoff, der mindestens einen Anilinanteil besitzt, der an einen heterozyklischen Anteil gekoppelt ist, der mindestens ein Stickstoffatom in dem Heterozyklus enthält, durch eine ethylenisch ungesättigte Verbindungsgruppe, wobei der polymere Farbstoff hydrophobe und konformationseinschränkende Anteile besitzt, gewählt aus der Gruppe bestehend aus Anteilen von Cyclodextrinen, Carceranden; Calixiranen, molekularen Spalten, Cucurbiterilien und Cyclophanen, die damit in Verbindung stehen.
2. Der polymere Farbstoff von Anspruch 1, worin die polymere Einheit nukleophil ist und die signalerzeugenden Gruppen elektrophil sind.
3. Der polymere Farbstoff von Anspruch 1, worin die signalerzeugenden Gruppen von einem Farbstoff abgeleitet sind, der durch folgende Formel dargestellt wird:

A--L--B

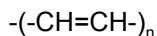
worin A eine heterozyklische Gruppe darstellt;
 L eine Verknüpfungsgruppe darstellt; und
 B eine Anilingruppe darstellt.

4. Der polymere Farbstoff von Anspruch 3, worin B folgende Formel besitzt:



worin R₁ und R₂ unabhängig gewählt sind aus Alkylgruppen, die von 1 bis 6 Kohlenstoffatomen besitzen.

5. Der polymere Farbstoff von Anspruch 3, worin L folgende Formel hat:

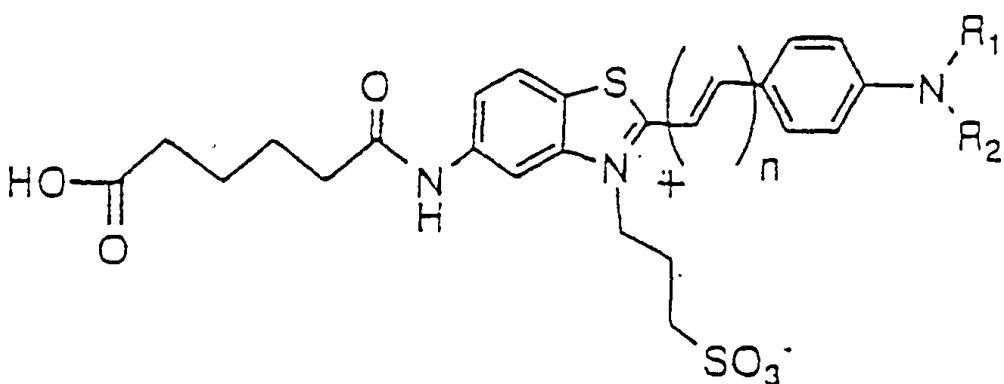


worin n 1, 2 oder 3 darstellt.

6. Der polymere Farbstoff von Anspruch 2, worin die signalerzeugenden Gruppen Carbonsäuregruppen enthalten.

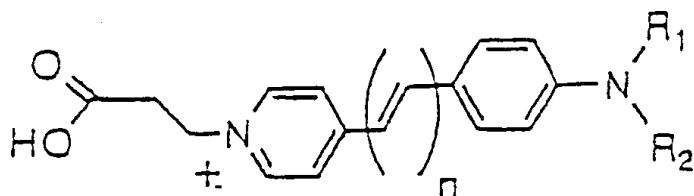
7. Der polymere Farbstoff von Anspruch 6, worin die signalerzeugenden Gruppen von einem Farbstoff abgeleitet sind, der gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Carboxychinoliniumanilin, Carboxybenzathiazoliumanilin, Carboxybenzoxazoliumanilin, Carboxyacridiniumanilin, Carboxybenzimidazoliumanilin, Carboxynaphthindoliumanilin, Carboxynaphthothiazoliumanilin, Carboxynaphthimidizoliumanilin und Carboxynaphthoxazoliumanilin.

8. Der polymere Farbstoff von Anspruch 6, worin die signalerzeugenden Gruppen einen Farbstoff umfassen, der folgende Struktur besitzt:



worin R₁ eine Alkylgruppe darstellt, und R₂ eine Alkylgruppe darstellt, und n eine ganze Zahl von 1 bis einschließlich 3 darstellt.

9. Der polymere Farbstoff von Anspruch 6, worin die signalerzeugenden Gruppen einen Farbstoff umfassen, der folgende Struktur besitzt:

 X^-

worin R₁ eine Alkylgruppe darstellt, und R₂ eine Alkylgruppe darstellt, und n eine ganze Zahl von 1 bis einschließlich 3 dargestellt, und X⁻ ein negativ geladenes Gegenion darstellt.

10. Der polymere Farbstoff von Anspruch 2, worin die polymere Einheit eine Vielzahl der hydrophoben und konformationseinschränkenden Anteile kovalent daran gebunden hat.

11. Eine Zusammensetzung, die den polymeren Farbstoff von Anspruch 2 umfaßt, worin eine Vielzahl der hydrophoben und konformationseinschränkenden Anteile, die mit dem polymeren Farbstoff in Verbindung stehen, nicht kovalent an die polymere Einheit gebunden sind.

12. Der polymere Farbstoff von Anspruch 1, worin die polymer Einheit elektrophil ist, und die signalerzeugenden Gruppen nukleophil sind.

13. Der polymere Farbstoff von Anspruch 12, worin die signalerzeugenden Gruppen Aminogruppen oder Hydrazidgruppen oder sowohl Aminogruppen als auch Hydrazidgruppen enthalten.

14. Der polymere Farbstoff von Anspruch 13, worin die signalerzeugenden Gruppen von einem Farbstoff abgeleitet sind, der gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aminopyridiniumanilin, Aminochinoliniumanilin und Aminoacridiniumanilin.

15. Der polymere Farbstoff von Anspruch 12, worin die polymere Einheit eine Vielzahl der hydrophoben und konformationseinschränkenden Anteile kovalent daran gebunden hat.

16. Eine Zusammensetzung, die den polymeren Farbstoff von Anspruch 12 umfaßt, worin eine Vielzahl der hydrophoben und konformationseinschränkenden Anteile, die mit dem polymeren Farbstoff in Verbindung stehen, nicht kovalent an die polymere Einheit gebunden sind.

17. Ein Konjugat, das folgendes umfaßt:

ein Glied eines Bindungspaares;

mindestens einen polymeren Farbstoff, der an dieses Glied gebunden ist; und

hydrophobe und konformationseinschränkende Anteile, die gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Anteilen von Cyclodextrinen, Carceranden, Calixiranen, molekularen Spalten, Cucurbiterilien und Cyclophanen, die mit dem polymeren Farbstoff in Verbindung stehen, wobei der polymere Farbstoff folgendes umfaßt.

(a) eine polymere Einheit; und

(b) kovalent an die polymere Einheit gebunden, eine Vielzahl von signalerzeugenden Gruppen, worin die signalerzeugende Gruppen von einem Farbstoff abgeleitet sind, der mindestens einen Anilinanteil besitzt, der an einen heterozyklischen Anteil gekoppelt ist, der mindestens ein Stickstoffatom in dem Heterozyklus enthält, durch eine ethylenisch ungesättigte Verknüpfungsgruppe.

18. Das Konjugat von Anspruch 17, worin die hydrophoben und konformationseinschränkenden Anteile, die mit dem polymeren Farbstoff in Verbindung stehen, nicht kovalent an den mindestens einen polymeren Farbstoff gebunden sind.

19. Das Konjugat von Anspruch 17, worin die hydrophoben und konformationseinschränkenden Anteile, die mit dem polymeren Farbstoff in Verbindung stehen, kovalent an den mindestens einen polymeren Farbstoff gebunden sind.

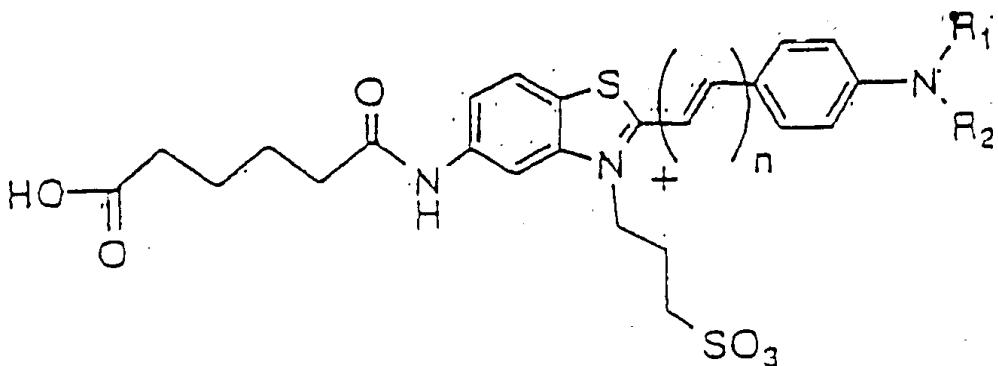
20. Das Konjugat von Anspruch 17, worin die Anzahl an signalerzeugenden Gruppen, die kovalent an die polymere Einheit gebunden sind, optimiert ist, um den größten Signalpegel zu erreichen.

21. Das Konjugat von Anspruch 17, worin der polymere Farbstoff von einem Farbstoff abgeleitet ist gewählt

aus der Gruppe bestehend aus Aminopyridiniumanilin, Aminochinoliniumanilin und Aminoacridiniumanilin.

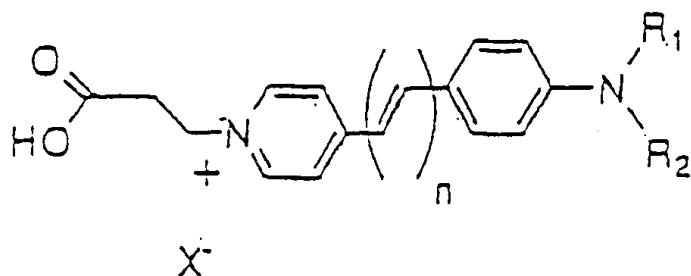
22. Das Konjugat von Anspruch 17, worin der polymere Farbstoff von einem Farbstoff abgeleitet ist, gewählt aus der Gruppe bestehend aus Carboxychinoliniumanilin, Carboxybenzathiazoliumanilin, Carboxybenzoxazoliumanilin, Carboxyacridiniumanilin, Carboxybenzimidazoliumanilin, Carboxynaphthindoliumanilin, Carboxynaphthathiazoliumanilin, Carboxynaphthimidizoliumanilin und Carboxynaphthoxazoliumanilin.

23. Das Konjugat von Anspruch 17, worin der polymere Farbstoff ein Benzothiazolpyridiniumtrien mit folgender Formel umfaßt



worin R₁ eine Alkylgruppe darstellt, und R₂ eine Alkylgruppe darstellt, und n eine ganze Zahl von 1 bis einschließlich 3 darstellt.

24. Das Konjugat von Anspruch 17, worin der polymere Farbstoff ein Aminostyrylpyridinium mit folgender Formel umfaßt:



worin R₁ eine Alkylgruppe darstellt, und R₂ eine Alkylgruppe darstellt, und n eine ganze Zahl von 1 bis einschließlich 3 darstellt, und X⁻ ein negativ geladenes Gegenion darstellt.

25. Das Konjugat von Anspruch 17, worin die hydrophoben und konformationseinschränkenden Anteile, die mit dem polymeren Farbstoff in Verbindung stehen, β-Cyclodextrinaldehydanteile sind, die kovalent an den polymeren Farbstoff gebunden sind.

26. Ein Verfahren zur Immunphänotypisierung von Zellen, das folgende Schritte umfaßt:
- Bereitstellen einer Testprobe;
 - Isolieren von Zellen aus dieser Testprobe;
 - Durchführen einer Lyse an der Testprobe;
 - Hinzufügen des Konjugats von Anspruch 17 zu der Testprobe;
 - Messen der Fluoreszenz der Testprobe.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

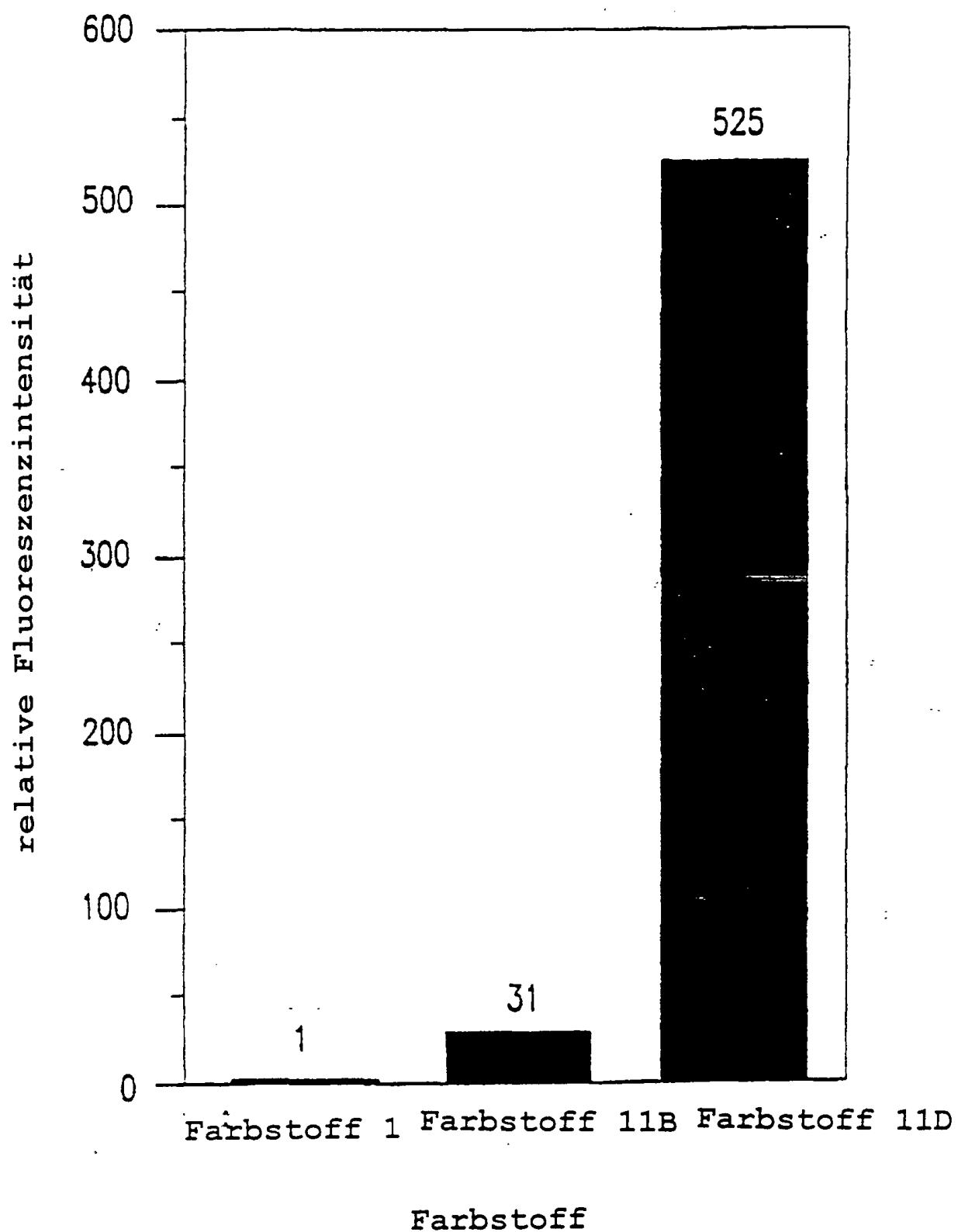


FIG.1

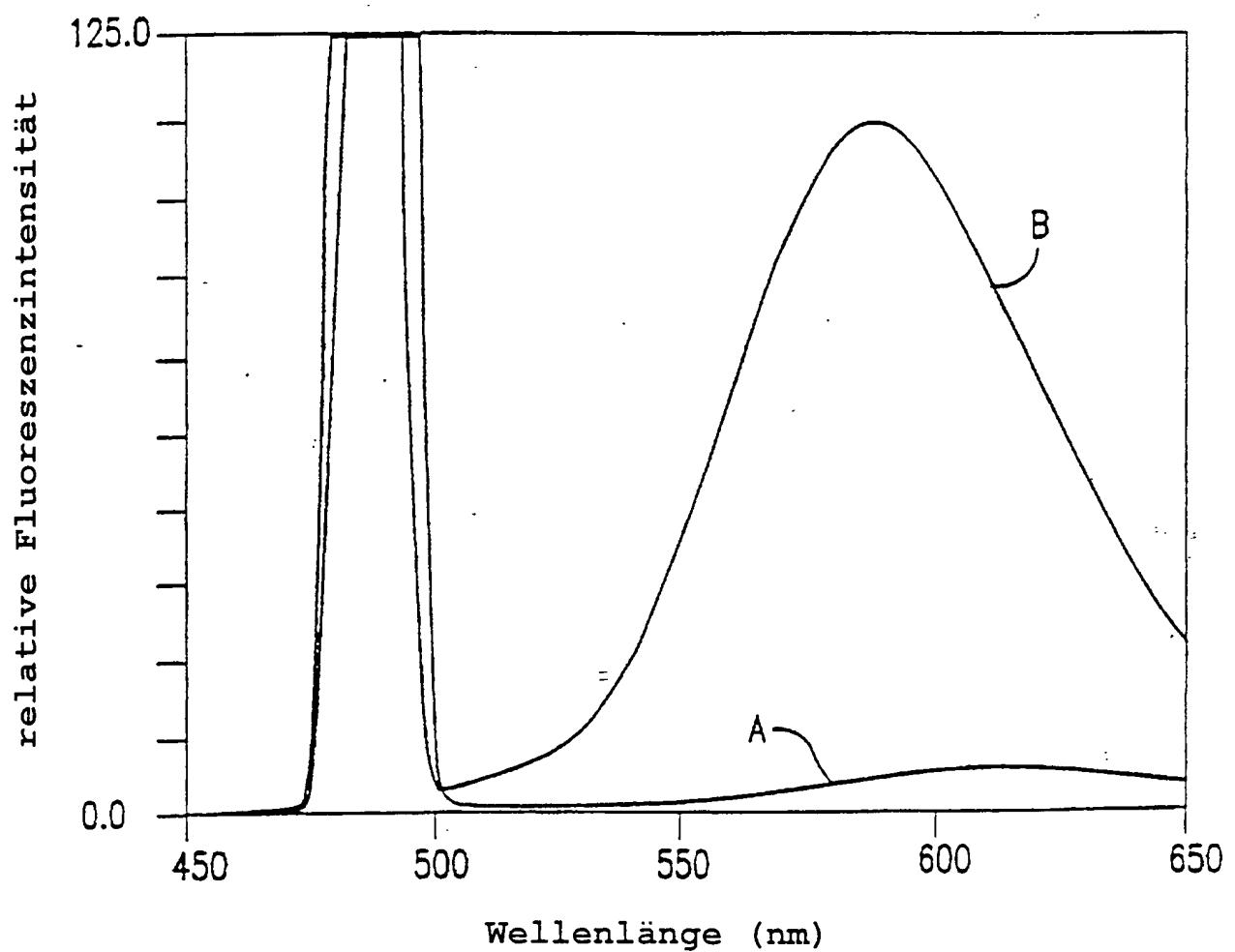


FIG.2

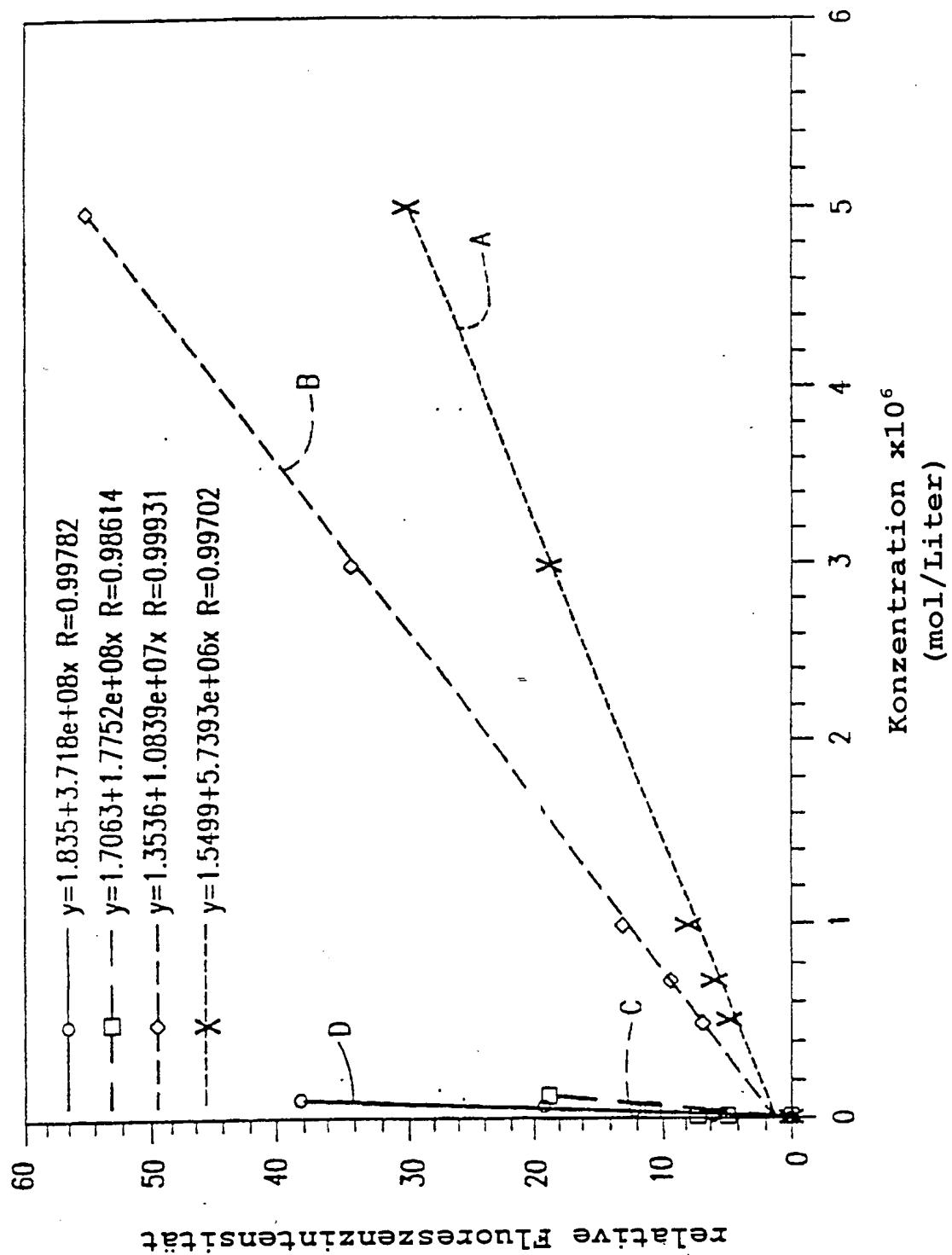


FIG.3

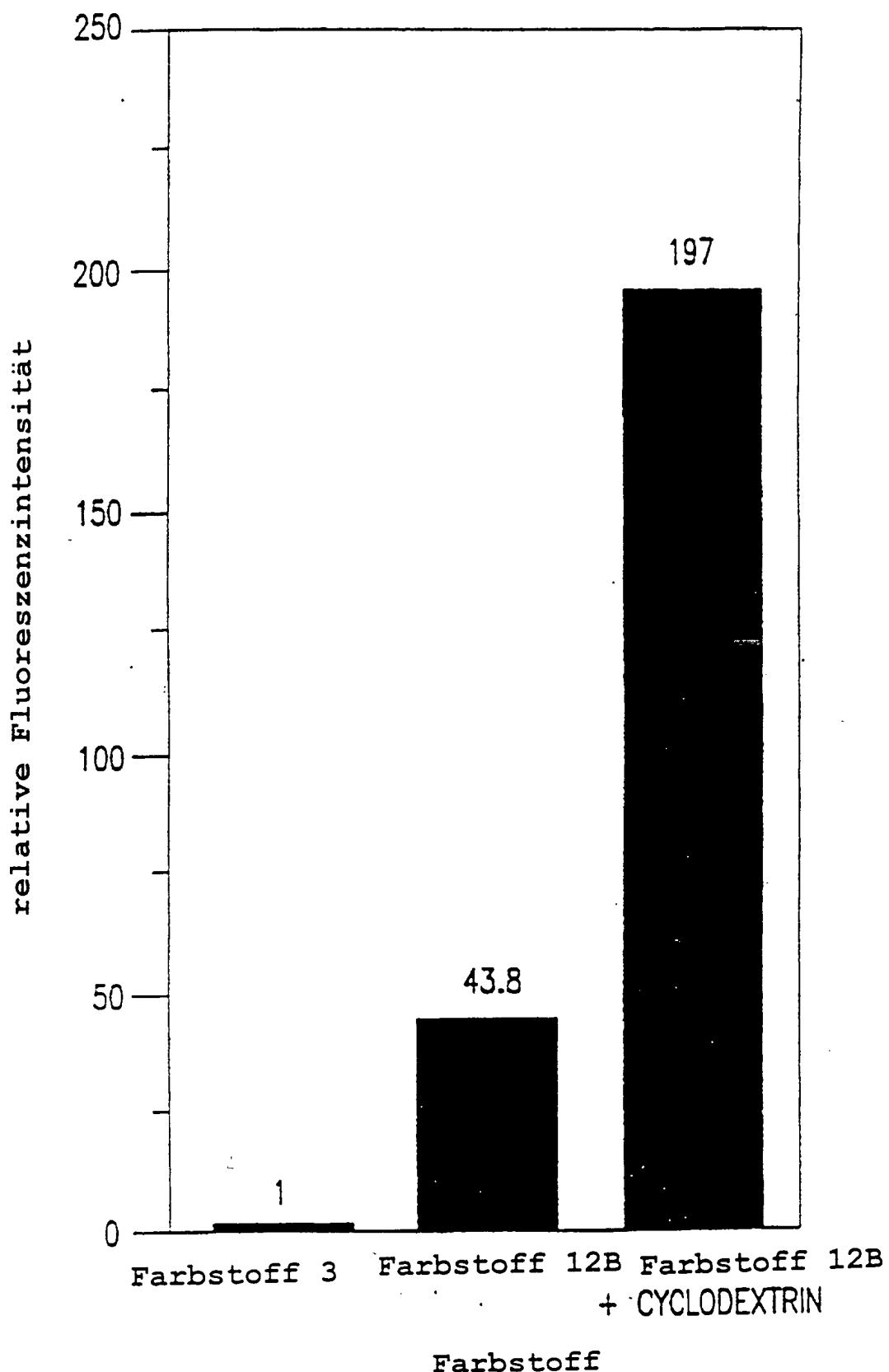


FIG.4

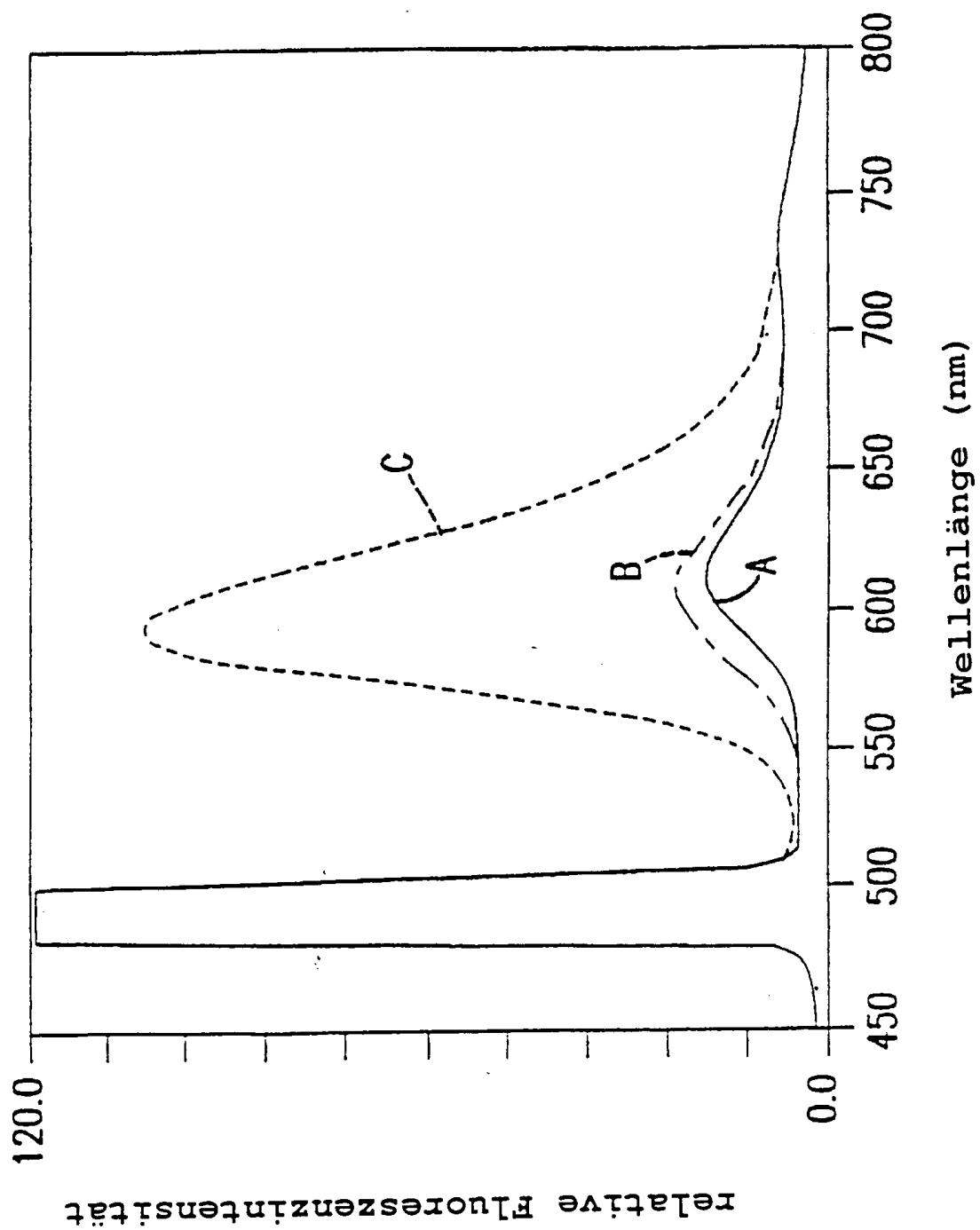


FIG.5

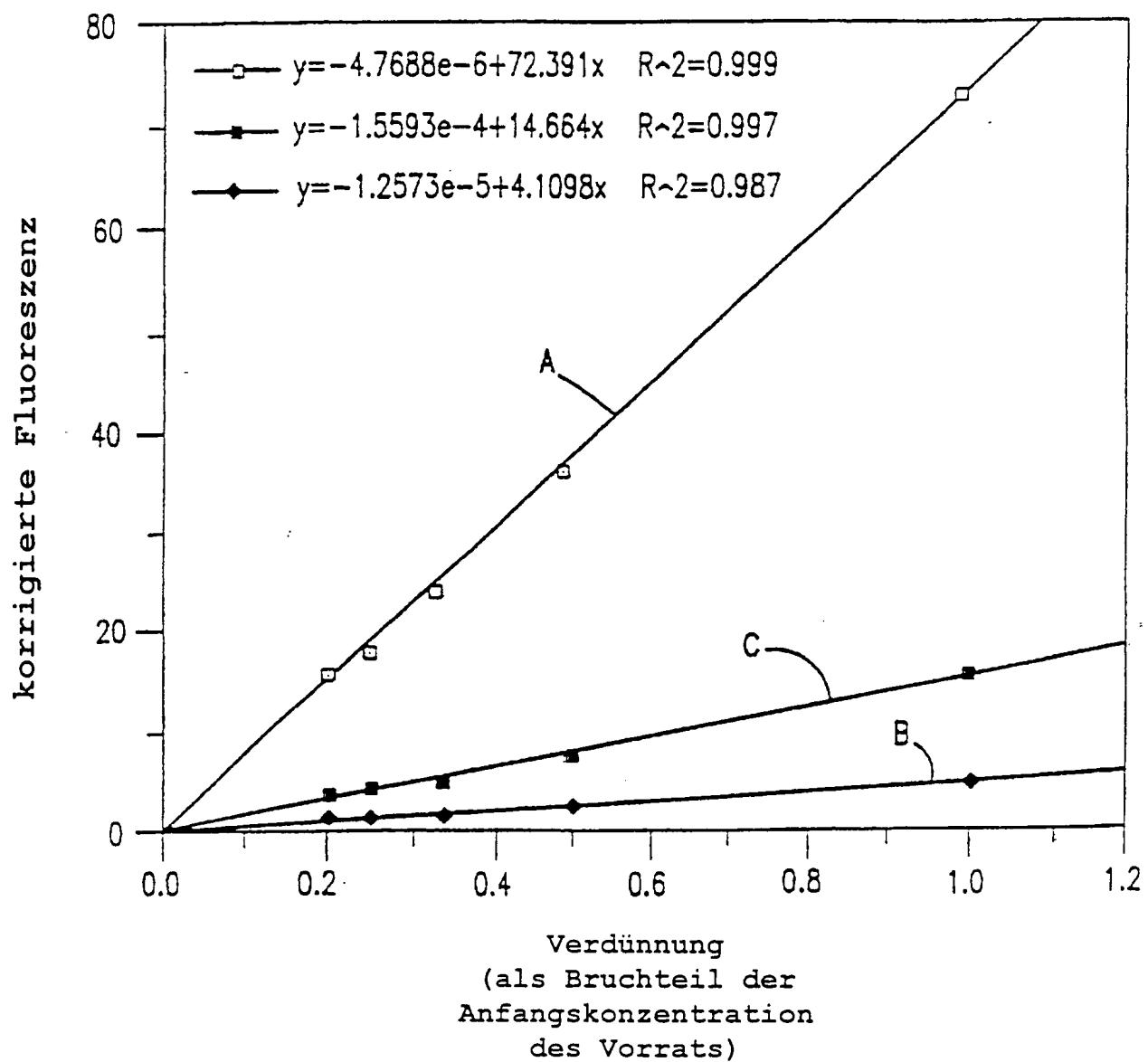


FIG.6

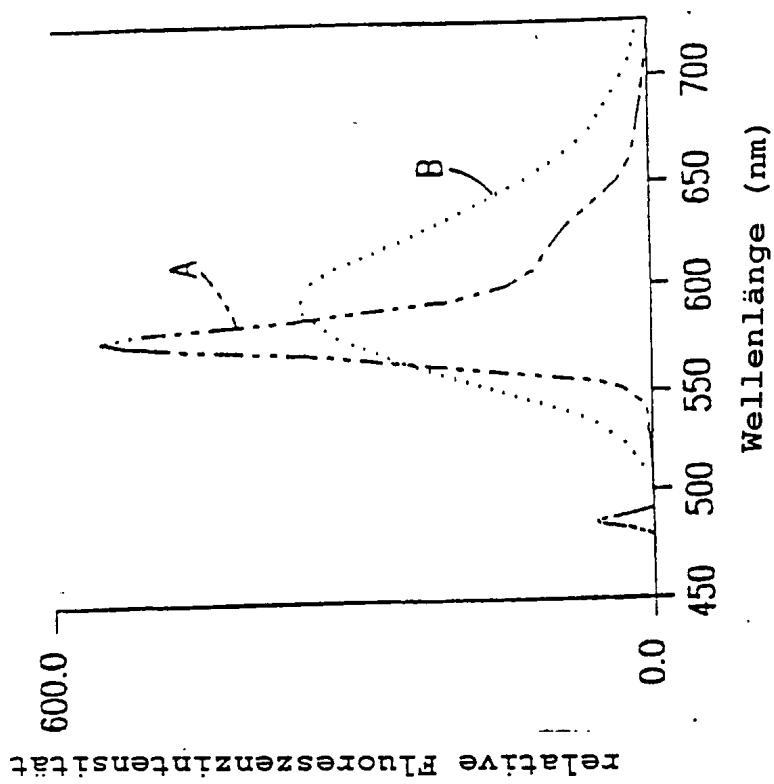


FIG.8

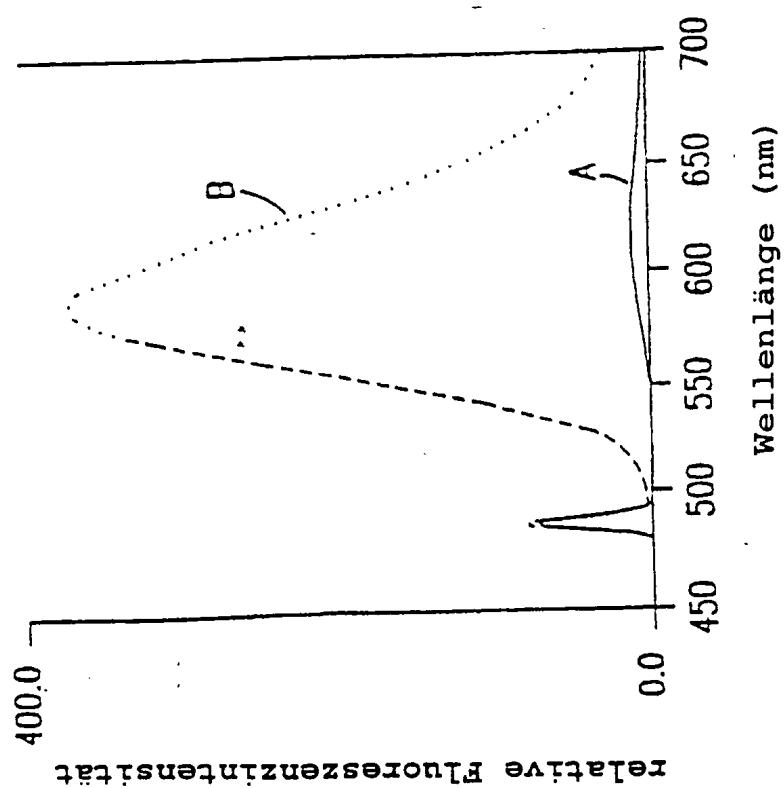


FIG.7

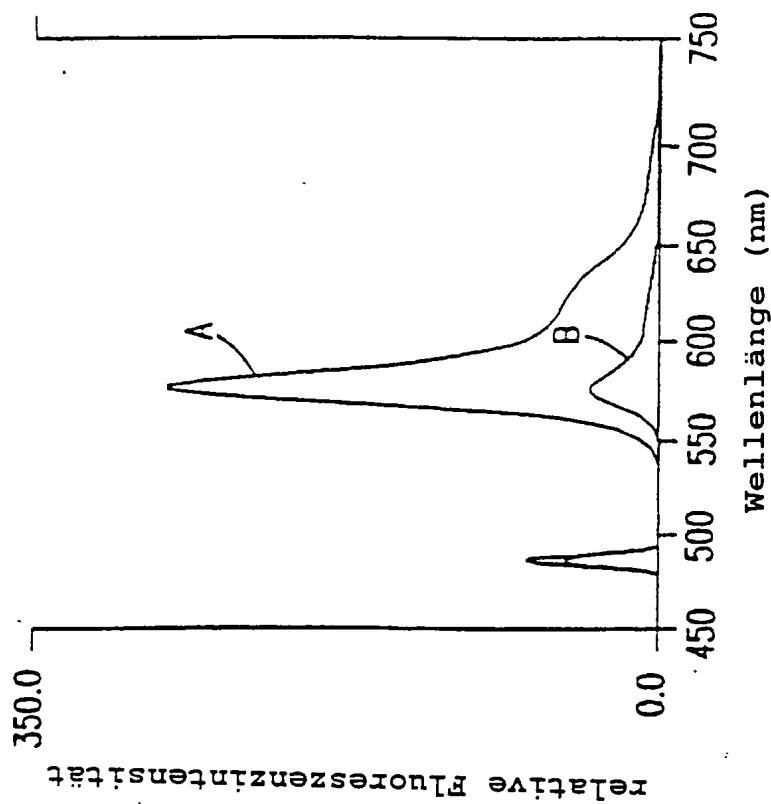


FIG. 9B

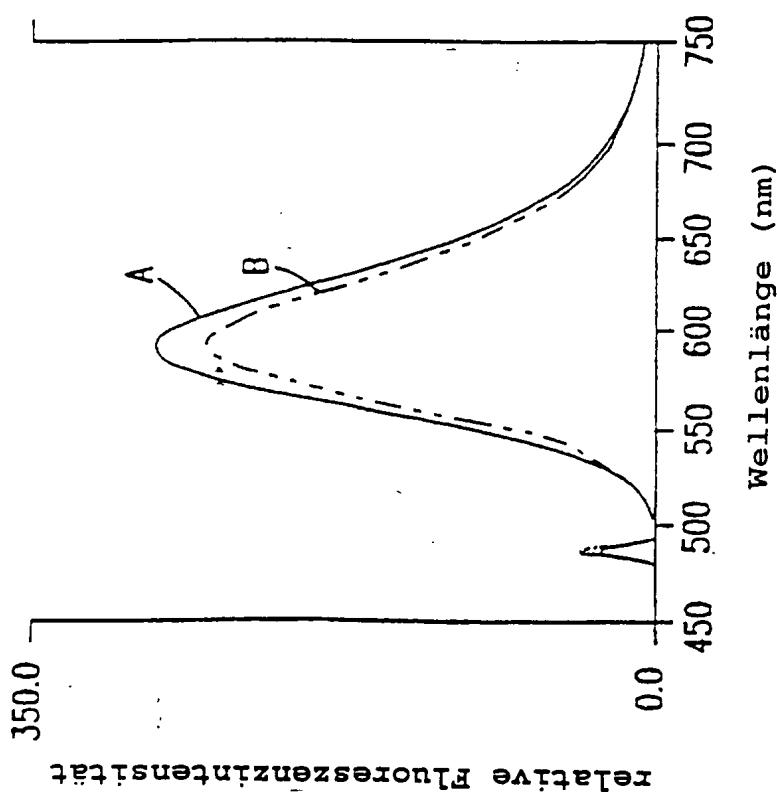
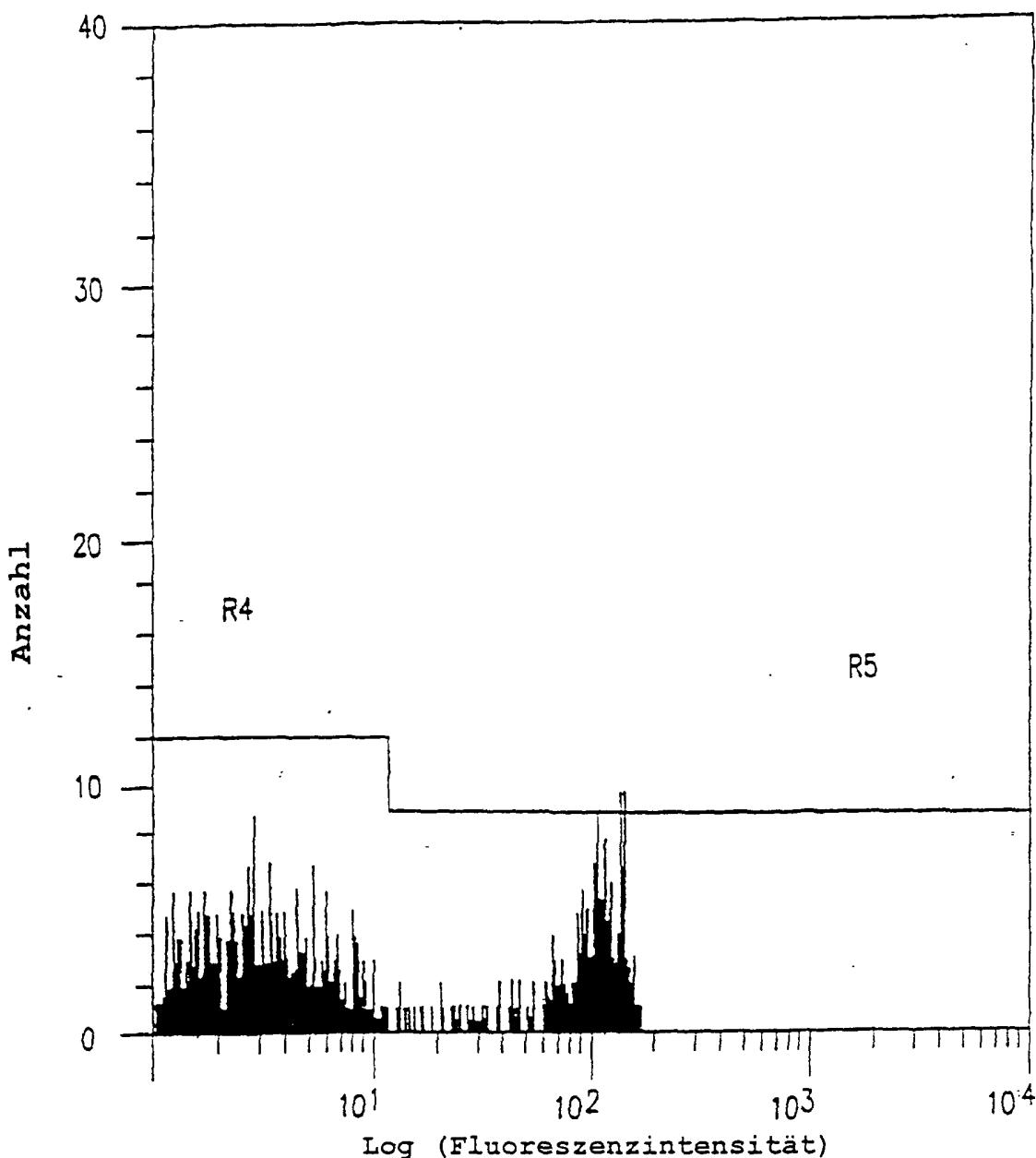


FIG. 9A

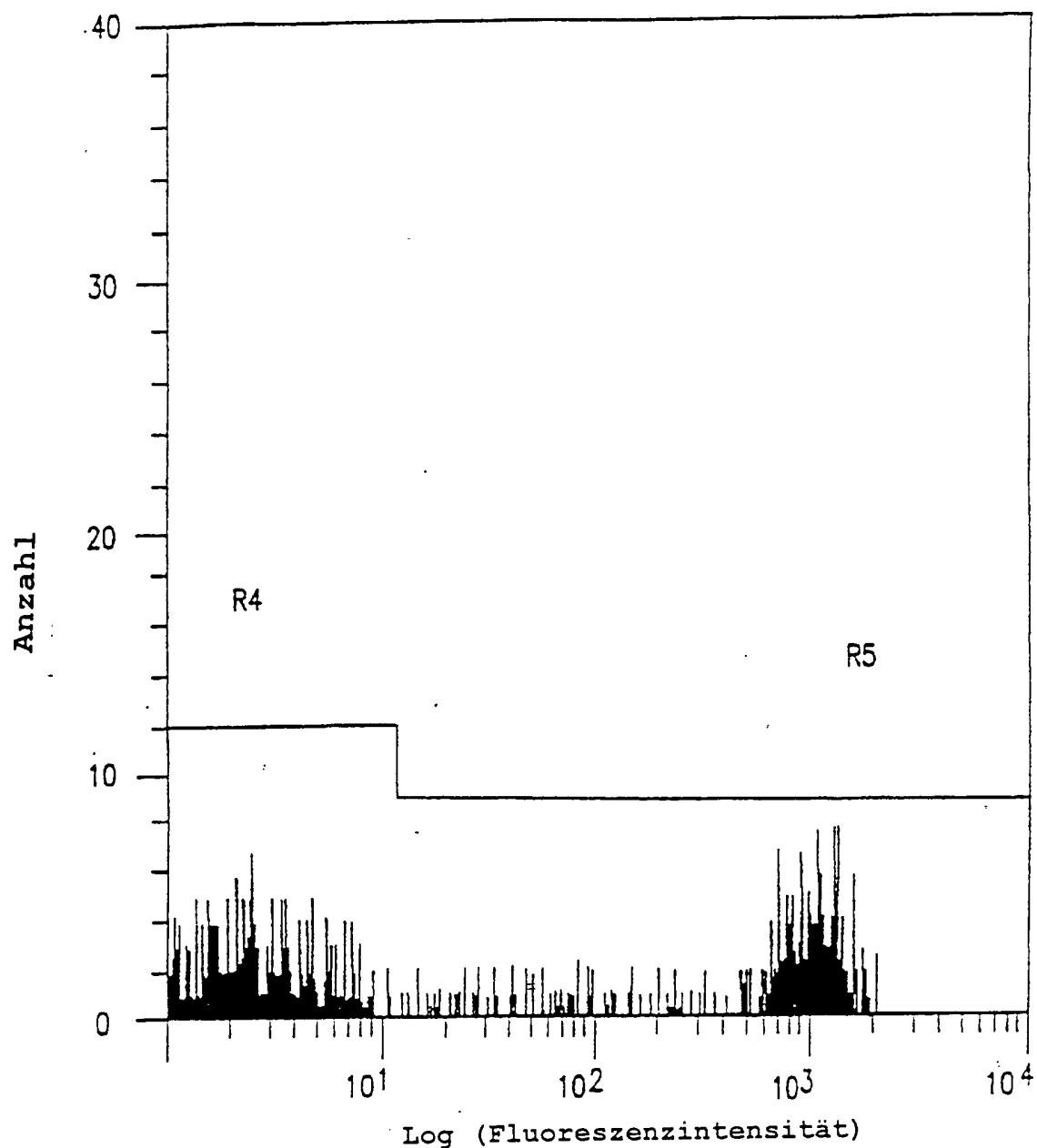


ID1: 17607 C6 1UG PS04

ID2: OKT8 PE-SUBS QPW BB N0405

	TOTAL	GATED	%GATE	linMeanX	linModeX	linMed
R4	9816	1824	77.80	1.74	1.00	1.02
R5	9816	1824	22.26	91.06	145.31	112.93
R7	9816	597	100.00	2.25	1.00	1.98
R8	9816	7018	99.54	2.95	1.00	3.25

FIG.10A

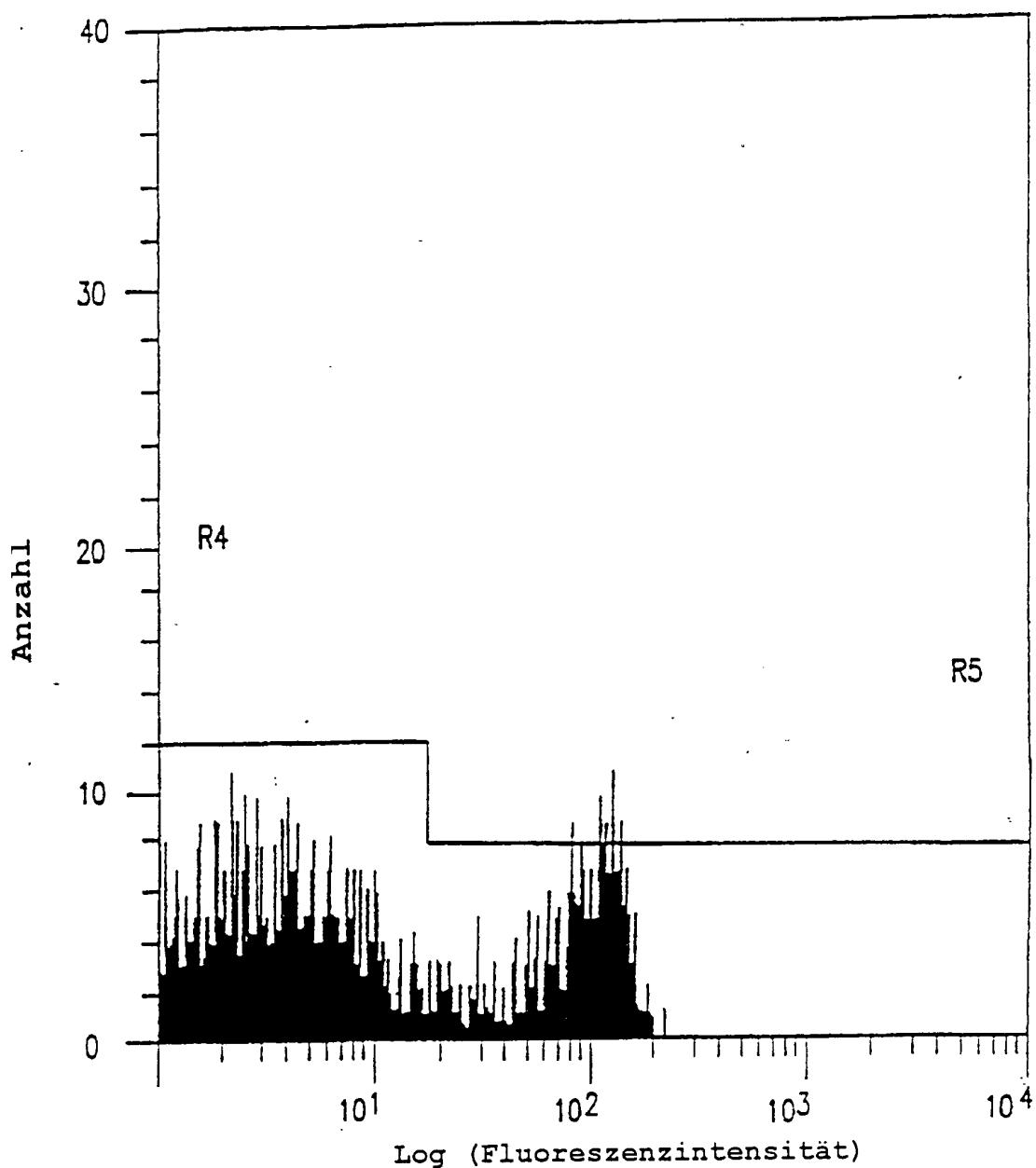


ID1: 17600 4F-8P PS04

ID2: OKT8 PE-SUBS QPW BB N0405

	TOTAL	GATED	%GATE	linMeanX	linModeX	linMed
R4	9816	1887	74.19	1.42	1.00	1.01
R5	9816	1887	25.81	550.38	1162.83	928.44
R7	9816	613	99.67	2.47	1.00	2.25
R8	9816	6972	99.28	3.23	1.00	3.62

FIG.10B

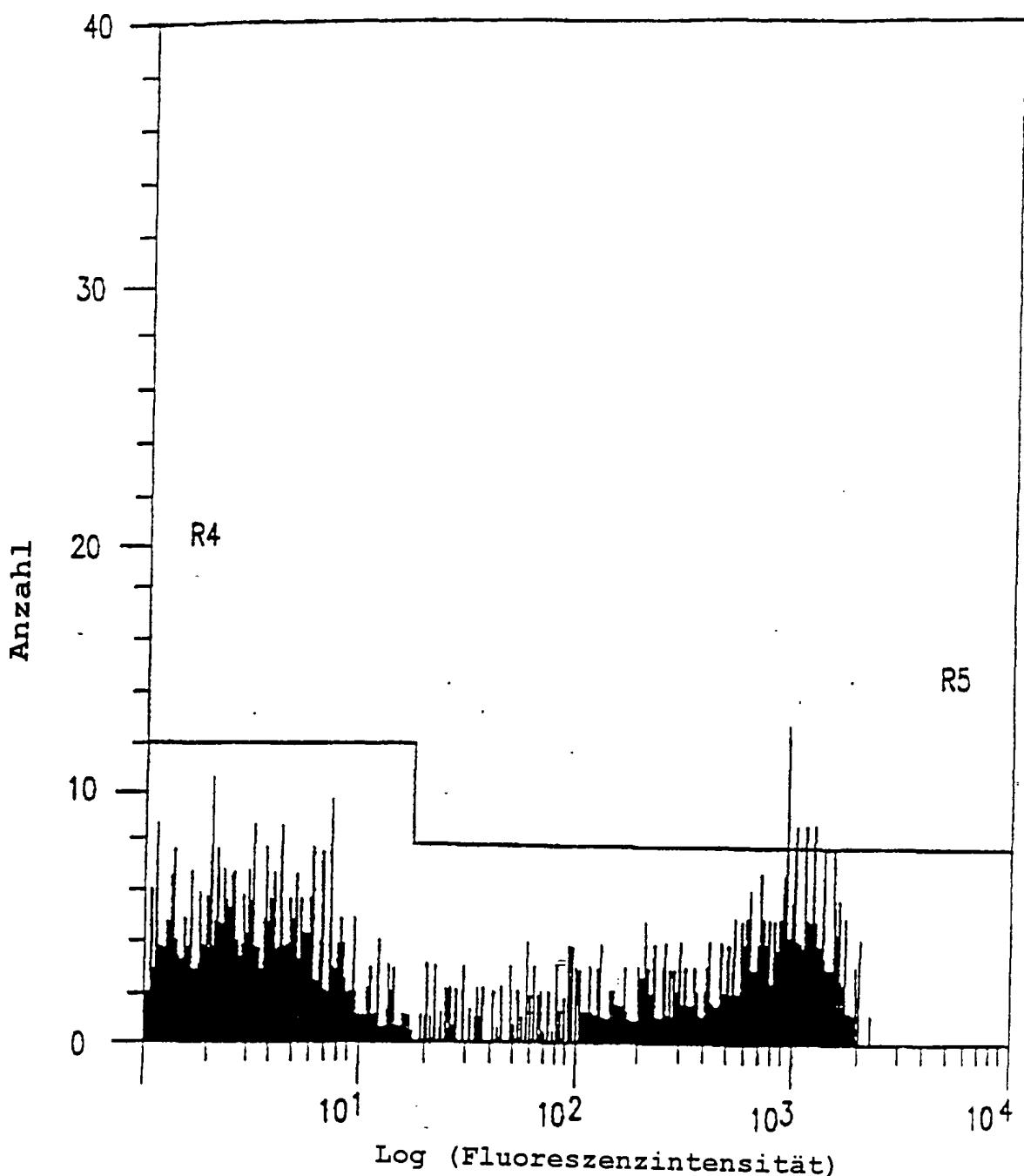


ID1: 17616 C6 1UG PS04

ID2: OKT8 PE-SUBS QPW BB N0406

	TOTAL	GATED	%GATE	linMeanX	linModeX	linMed
R4	9816	3127	76.62	1.94	1.00	1.10
R5	9816	3127	23.38	78.51	124.69	91.81
R7	9816	943	100.00	2.19	1.00	1.83
R8	9816	5237	99.73	2.49	1.00	2.35

FIG.11A

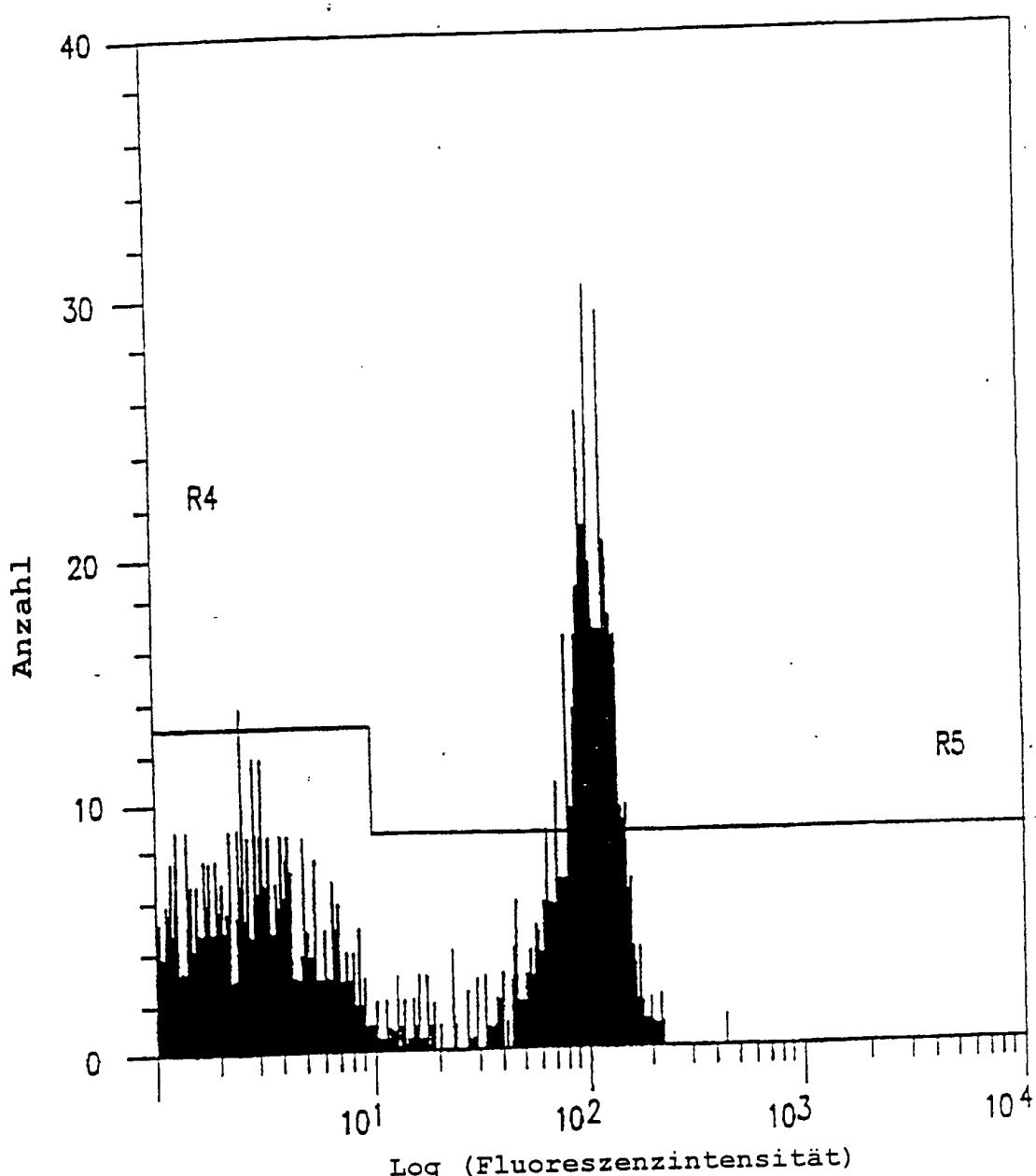


ID1: 17609 4F-8P PS04

ID2: OKT8 PE-SUBS QPW BB N0406

	TOTAL	GATED	%GATE	linMeanX	linModeX	linMed
R4	9816	3288	69.53	1.71	1.00	1.02
R5	9816	3288	30.47	416.65	911.83	641.87
R7	9816	897	100.00	2.12	1.00	1.75
R8	9816	4946	99.58	2.70	1.00	2.74

FIG.11B

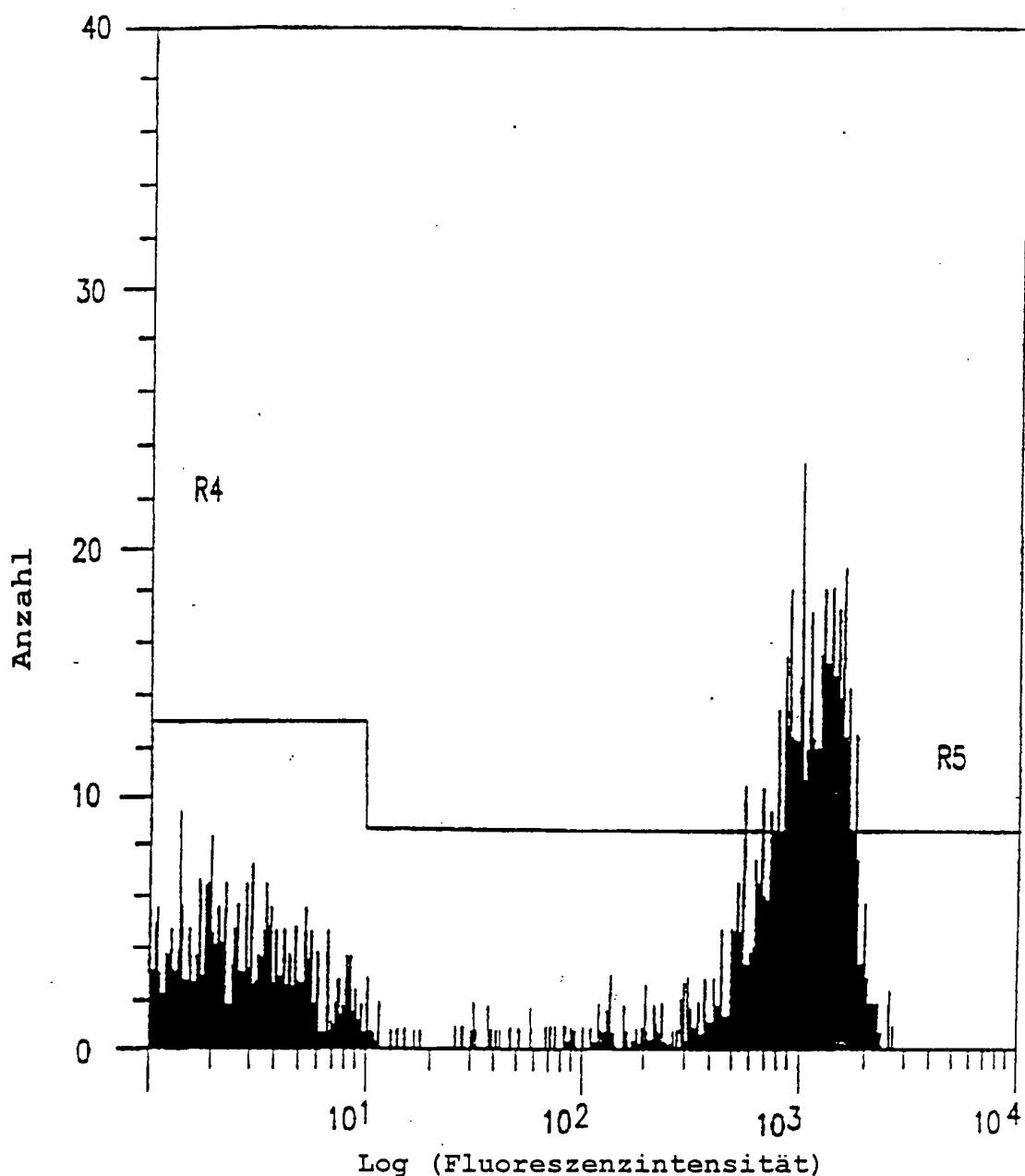


ID1: 17626 C6 1UG PS04

ID2: OKTB PE-SUBS QPW BB N0407

	TOTAL	GATED	%GATE	linMeanX	linModeX	linMed
R4	9816	4333	60.74	1.59	1.00	1.02
R5	9816	4333	39.26	91.26	111.91	105.08
R7	9816	689	100.00	2.21	1.00	1.88
R8	9816	4295	99.81	2.93	1.00	3.19

FIG.12A

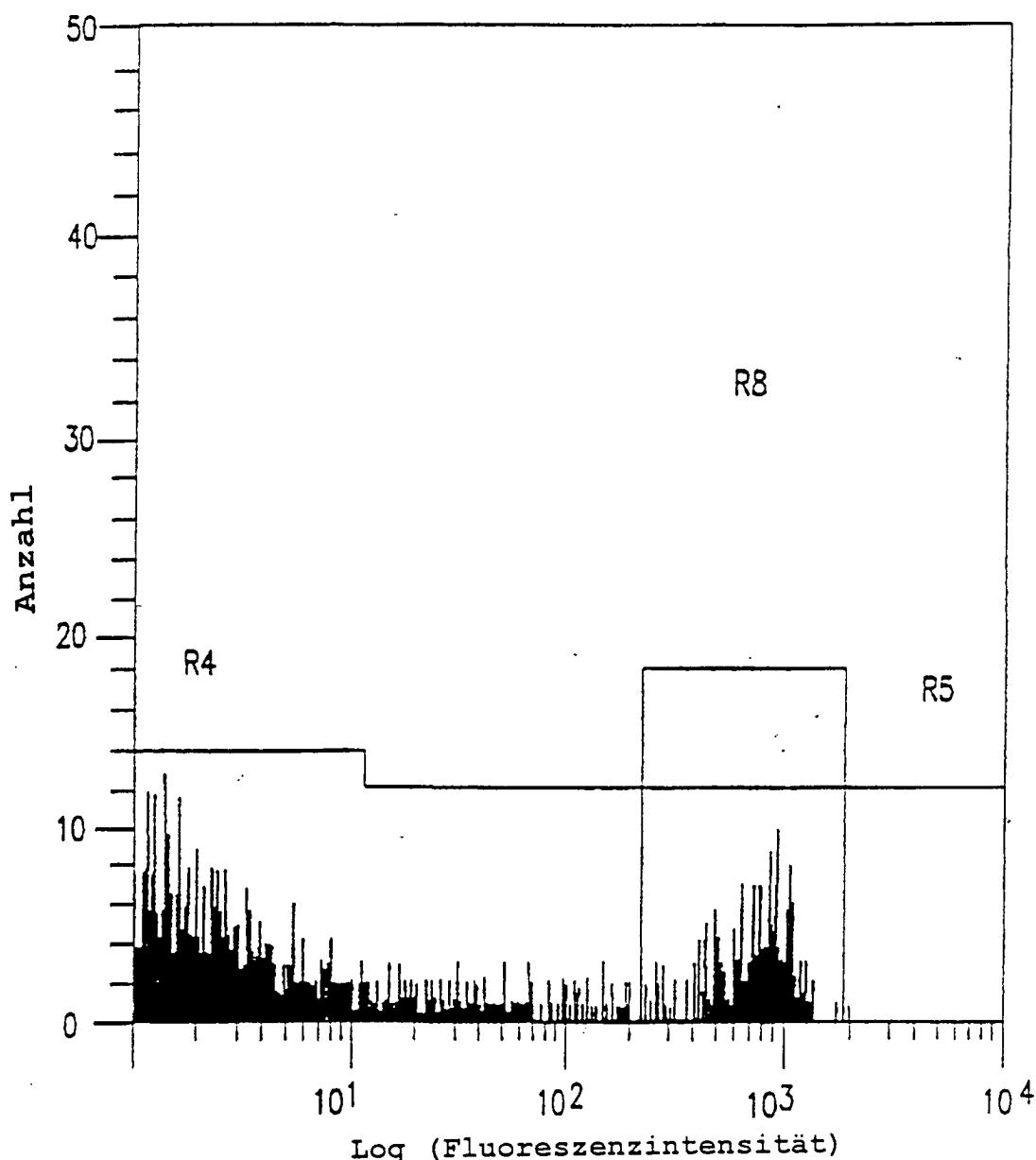


ID1: 17619 4F-8P PS04

ID2: OKT8 PE-SUBS QPW BB N0407

	TOTAL	GATED	%GATE	linMeanX	linModeX	linMed
R4	9816	4278	58.37	1.40	1.00	1.01
R5	9816	4278	41.63	780.35	911.83	962.50
R7	9816	688	99.27	4.83	1.00	4.42
R8	9816	4373	98.40	4.56	1.00	4.75

FIG.12B

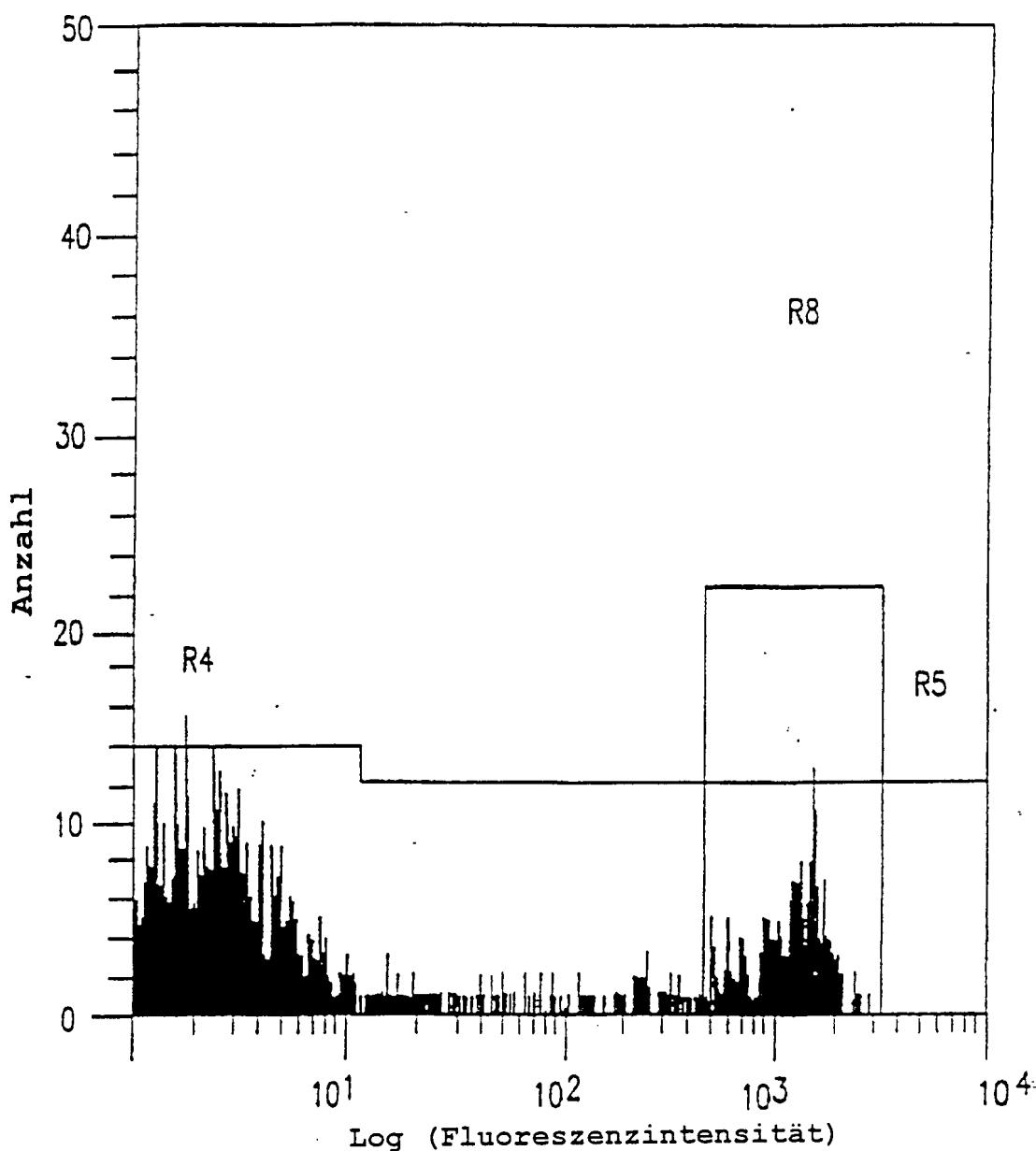


ID1: 16725 8GSM F2 PS04

ID2: BB QPW OKT8 FL4-PAH

	TOTAL	GATED	%GATE	linMeanX	linModeX	linMed
R4	9816	3196	79.88	1.37	1.04	1.05
R5	9816	3196	20.12	336.02	953.83	624.7
R6	9816	928	99.78	1.60	1.04	1.05
R7	9816	5279	99.26	1.85	1.04	1.26
R8	9816	3196	14.77	695.15	953.83	775.4

FIG.13A



ID1: 16720 CD8PCY5 NONE

ID2: BB QPW OKT8 FL4-PAH

	TOTAL	GATED	%GATE	linMeanX	linModeX	linMed
R4	9816	3151	80.26	1.65	1.04	1.06
R5	9816	3151	19.74	573.82	1593.53	1082
R6	9816	938	99.89	11.40	1.04	13.99
R7	9816	5416	98.89	2.12	1.04	1.88
R8	9816	3151	14.73	1199.88	1593.53	1318

FIG.13B

FIG. 14

