(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 649 T2** 2007.02.22

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 708 837 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 649.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/07855**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 923 455.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/002700**
(86) PCT-Anmeldetag: **13.07.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **26.01.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.05.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **08.03.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.02.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***G01N 33/533*** (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
C12Q 3/00 (2006.01)
C08B 37/16 (2006.01)
C08F 8/00 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
91149 **13.07.1993** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill., US

(74) Vertreter:
Schieber · Farago, 80538 München

(72) Erfinder:
HUFF, Bruce, Jeffrey, Park Ridge, IL 60068, US;
BIENIARZ, Christopher, Highland Park, IL 60035, US

(54) Bezeichnung: **DURCH FLUORESZIERENDEN POLYMER MARKIERTE KONJUGATE UND ZWISCHENPRODUKTE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

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

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein fluoreszierendes Konjugat, das bei spezifischen Bindungs-Assays nützlich ist. Im Speziellen betrifft die Erfindung Zusammensetzungen und Intermediate für ein 391 hochgradig fluoreszierendes, wasserlösliches Konjugat, das ein spezifisches Bindungsglied, verbunden mit einem hochgradig fluoreszierenden Polymer, umfasst.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Bindungsaffinität, die Antikörper gegenüber Zelloberflächen aufweisen, wird oftmals als Grundlage für Abbildungssysteme genutzt, die zur zytometrischen und/oder hämotologischen Analyse von Zellproben (im Folgenden Untersuchungsproben) verwendet werden. Abbildungssysteme verwenden häufig Antikörper als Bindungsmoleküle, die sich spezifisch an Stellen an den Oberflächen bestimmter Zellen binden, die in einer Untersuchungsprobe enthalten sind. Um festzustellen, ob sich der Antikörper an die Oberfläche einer Zelle gebunden hat, wird er mit einem fluoreszenten Molekül markiert oder gekennzeichnet. Der Antikörper und sein fluoreszentes Molekül zusammen werden als Konjugat bezeichnet.

[0003] In einer typischen zytometrischen oder hämotologischen Analyse wird das Konjugat mit einer Untersuchungsprobe, die normalerweise Blut oder ein Bestandteil davon ist, der eine Vielzahl von Zellpopulationen enthält, in Kontakt gebracht, um eine Testmischung zu bilden. Die Mischung wird für einen Zeitraum und unter Bedingungen inkubiert, die ausreichen, damit das Konjugat sich an Ziele an der Oberfläche bestimmter Zellpopulationen binden kann. Nach der Inkubationszeit regt eine Energiequelle das fluoreszente Molekül des Konjugats an und bringt es so zum Fluoreszieren. Diese Fluoreszenz wird z. B. mit Hilfe einer Kamera nachgewiesen, die Zellbilder anhand der Fluoreszenz des gebundenen Konjugats erkennt. Aktuell in Abbildungssystemen verwendete Kameras sind hochempfindlich und folglich sehr teuer. Sie sind deshalb notwendigerweise empfindlich, weil sie Konjugate erkennen müssen, die eine relativ schwache Fluoreszenz haben. Zum Beispiel haben die Konjugate, die aktuell in Abbildungssystemen verwendet werden, typischerweise einen Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome (MESF)-Wert von ungefähr 12.000. Eine fluoreszent gefärbte Zelle mit einem MESF-Wert von 12.000 kann von einer photometrisch gekühlten Charged-Coupled Device (CCD)-Kamera mit 12 Bits, 4.096 Ebenen und 500 × 386 Pixeln zuverlässig abgebildet werden. Diese Art von Kamera kostet ungefähr 20.000 Dollar und ist ein großer Kostenpunkt in der Produktion eines Abbildungssystems.

[0004] Es hat mehrere Versuche gegeben, ein Konjugat mit einem MESF-Wert herzustellen, der von einer weniger empfindlichen und daher weniger teuren Kamera nachweisbar ist. In früheren Versuchen, die Fluoreszenz von Konjugaten zu verbessern, wurde die Bindungseffizienz der Konjugate zugunsten eines helleren Konjugats geopfert. Zum Beispiel wurden in einem Versuch, die Fluoreszenz eines Konjugats zu erhöhen, Antikörper nach dem Zufallsprinzip mit mehreren fluoreszenten Molekülen (manchmal als Fluorophore bezeichnet) markiert. Diese Zufallsmarkierung erhöht zwar die Anzahl von Fluorophoren pro Antikörper, bindet aber auch Fluorophore an den Bindungsort des Antikörpers. Daher kann diese Stelle, wenn sich ein Fluorophor an sie bindet, sich nicht an ihr Ziel binden und somit keine Zelloberflächen abbilden und ihrem eigentlichen Zweck dienen. Zusätzlich lässt die Markierung eines Antikörpers mit mehreren Fluorophoren häufig den Fc-Bereich des Antikörpers unbehindert und fähig, sich an Fc-Rezeptoren zu binden, die an der Oberfläche von Zellen in einer Untersuchungsprobe vorhanden sein können.

[0005] Aufgrund ihrer Fähigkeit, sich so zu binden, findet eine unspezifische Bindung des Konjugats statt, und irreführende Bilder sind das Ergebnis.

[0006] Bei einem anderen Versuch, die Fluoreszenz von Abbildungskonjugaten zu erhöhen, wurden mehrere Fluorophore an ein Polymer gebunden, und das Polymer wurde an einen Antikörper gebunden. Dieses Konjugat erfüllt jedoch nicht seinen eigentlichen Zweck, da es erheblicher Löschung und daher einem Signalverlust aufgrund des unangemessenen Abstands zwischen mehreren Fluorophoren auf einer Polymer-Hauptkette unterliegt, die nur begrenzt Raum hat.

[0007] In einem weiteren Versuch, die Fluoreszenz von Abbildungs-Konjugaten zu erhöhen, wurden fluoreszente Mikropartikel oder Kolloidteilchen an einen Antikörper gebunden und verstärkten so die Fluoreszenz des Konjugats. Diese Art von Konjugat hat jedoch den Nachteil, dass sie unlöslich ist. Deshalb werden sie von Phagozyten, die häufig in Untersuchungsproben vorhanden sind, als Fremdkörper erkannt. Folglich werden diese

Konjugate von den Phagozyten aufgenommen, und die mit einer solchen Zelle zusammenhängende Fluoreszenz beruht auf dem fluoreszierenden Partikel im Phagozyten und ist nicht das Ergebnis eines Konjugats, das an einen Marker auf der Oberfläche einer Zelle gebunden ist.

[0008] Es sind als Cyclodextrine bekannte Moleküle auf dem Gebiet der Konjugatsynthese verwendet worden. Cyclodextrin ist ein bekanntes wasserlösliches zyklisches Oligosaccharid mit einem zentralen hydrophoben Hohlraum und einem hydrophilen Außenbereich. Im Allgemeinen ist die Form eines Cyclodextrinmoleküls zylindrisch, wobei ein Ende des Zylinders eine größere Öffnung hat als das andere. Die größere Öffnung ist bekannt als der sekundäre Rand und die andere Öffnung als der primäre Rand. Eine Höhlung, in die kleine Moleküle durch den größeren sekundären Rand eindringen können, ist zwischen den beiden Öffnungen des Cyclodextrinmoleküls vorhanden, und in wässerigen Systemen bietet die Höhlung eines Cyclodextrinmoleküls (des "Wirts") eine hydrophobe Mikroumgebung für die Komplexbildung hydrophober Moleküle mit geringem Molekulargewicht (der "Gastmoleküle").

[0009] Versuche, polymeres Cyclodextrin herzustellen, wurden auch unternommen, um die Fluoreszenz im Zusammenhang mit Konjugaten zu erhöhen. Theoretisch können die Komplex bildenden Eigenschaften eines einzelnen Cyclodextrinmoleküls verstärkt werden, indem mehrere Cyclodextrinmoleküle nahe beieinander liegen (d. h., mehrere Cyclodextrinmoleküle nahe beieinander erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass ein Gastmolekül in den Hohlraum eines Cyclodextrinmoleküls eindringt). Somit könnte, wenn ein polymeres Cyclodextrinmolekül hergestellt würde, dieses theoretisch eine Vielzahl von Gastmolekülen beherbergen. Weiter gäbe es, wenn die Gastmoleküle eines polymeren Cyclodextrinmoleküls Signal erzeugende Gruppen wären, z. B. mehrere Fluorophore nahe beieinander, und die Fluoreszenz des Polymers wäre stärker als diejenige eines einzelnen Fluorophors. Daher wäre, wenn ein Konjugat mit einem Fluorophore enthaltenden polymeren Cyclodextrin hergestellt würde, seine Fluoreszenz theoretisch stärker als bei einem Konjugat mit einem einzigen Fluorophor.

[0010] Es sind mehrere Polymere auf Cyclodextrin-Basis hergestellt worden, um die obige Theorie zu überprüfen. Diese Polymere haben jedoch Probleme, die ihren gewünschten Effekt stark einschränken. Diese Polymere auf Cyclodextrin-Grundlage werden unter Verwendung von Cyclodextrin-Monomeren synthetisiert, die so modifiziert wurden, dass sie mehrere reaktive Gruppen am primären und sekundären Rand des Cyclodextrins enthalten, was es diesen Monomeren ermöglicht, über ihren primären und ihren sekundären Rand zu reagieren und über ihre Vielzahl an reaktiven Gruppen mehrfach zu reagieren. Wenn ein Cyclodextrinmolekül über seinen sekundären Rand gebunden wird, wird die größere Öffnung zum hydrophoben Hohlraum behindert. Folglich ist es schwierig für ein Gastmolekül, in den Hohlraum des Cyclodextrins einzudringen, und der Nutzen des Cyclodextrins als Wirt wird geopfert. Weiterhin ermöglicht das Bilden von Polymeren mit Cyclodextrinen, die mehrere reaktive Gruppen haben, einen hohen Grad an Quervernetzung. Wenn Quervernetzung stattfindet, werden nicht nur die Cyclodextrine über den sekundären Rand gebunden, was die oben erwähnten Probleme verursacht, sondern es bildet sich auch eine Matrix von Cyclodextrinen. Folglich ist die Anzahl polymerisierter Cyclodextrine begrenzt, und viele der polymerisierten Cyclodextrine werden in der Matrix eingelagert. Obwohl viele Cyclodextrine nahe beieinander liegen, haben sehr wenige von ihnen zugängliche sekundäre Öffnungen, und es können sich nur sehr wenige Einschlussverbindungen bilden. Die Probleme mit den oben erwähnten Polymeren sind auf deren Herstellungsverfahren zurückzuführen. Im Speziellen sind die monomeren Cyclodextrine, die verwendet werden, um die Polymere zu synthetisieren, überreaktiv.

[0011] Zur Herstellung eines nützlichen polymeren Cyclodextrins ist es notwendig, einen korrekt reaktiven monomeren Cyclodextrinbaustein zu haben. Ein Beispiel für ein solches reaktives Cyclodextrin ist 6-Cyclodextrinmonoaldehyd. Es sind ältere Wege zur Herstellung von 6-Cyclodextrinmonoaldehyd beschrieben worden, aber diese synthetischen Verfahren benötigen mehrere Schritte, welche die Synthese toxischer und potentiell explosiver Intermediate einschließen. Zusätzlich erfordern diese Verfahren Materialien, die schwer erhältlich und teuer sind. Somit ist zur effektiven Nutzung der Komplex bildenden Eigenschaften von Cyclodextrin, insbesondere im Hinblick auf die Konjugatsynthese, ein sichererer und effizienterer Weg zur Herstellung von 6-Cyclodextrinmonoaldehyd notwendig.

[0012] USP 4,169,137 offenbart ein Antigen nachweisendes Reagens, das ein ein primäres Amin enthaltendes polyfunktionelles polymeres Hauptkettenmolekül umfasst, an das eine Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoff-Radikalen gekoppelt sind, wobei die Anzahl der Fluoreszenzfarbstoffradikale begrenzt ist, um die Bildung eines Komplexes zwischen einem Antikörper mit einem primären Aminanteil, der an das Hauptkettenmolekül gebunden ist, und dem Antigen nicht zu verhindern, worin der Antikörper und das Hauptkettenmolekül durch ein Dianhydrid gebunden sind.

[0013] USP 5,068,227 offenbart Cyclodextrinderivate, die an Bioerkennungs-Moleküle (z. B. Oligopeptide mit geringem Molekulargewicht, makromolekulare Polyaminosäuren, Proteine mit höherem Molekulargewicht) gekoppelt sind, wobei das so gekoppelte Cyclodextrin einen Hohlraum oder eine Komplexbildungszone bereitstellt, in die fluoreszente Marker eingebaut werden können.

[0014] WO 91 02040. offenbart ein Cyclodextrinmolekül, das Fluorophoreinschlussverbindungen einschließt, die an eine spezifische Bindungssubstanz, wie z. B. einen Liganden, einen Ligator oder eine Nukleinsäure, gekoppelt sind.

[0015] WO 91 05605 offenbart Cyclodextrin-Markerzusammensetzungen, die eine Kopplungsgruppe am Cyclodextrinmolekül bereitstellen und eine fluoreszente Substanz und eine spezifische Bindungssubstanz als Ligand oder Ligator einschließen.

[0016] Eine Reduzierung der Kosten für Abbildungssysteme kann erreicht werden durch Reduzierung der Kosten für eine ihrer teuersten Komponenten. Wenn im Speziellen eine kostengünstige Kamera in einem Abbildungssystem benutzt werden könnte, würden die Kosten für das gesamte System erheblich reduziert. Im aktuellen Stadium der Abbildungstechnologie für Konjugate ist dies jedoch nicht praktisch. Daher besteht die Notwendigkeit eines Konjugats, das in der Lage ist, ein Signal abzugeben, welches mit einer kostengünstigen Kamera erfasst werden kann.

Zusammenfassung der Erfindung

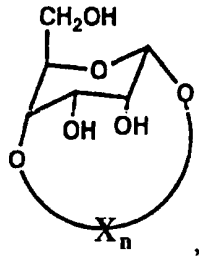
[0017] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Konjugat bereitgestellt, das eine Menge an Fluoreszenz abgibt, die mit einem Nachweisgerät nachweisbar ist, das einen relativ geringen Empfindlichkeitsgrad hat. Zusätzlich werden Intermediate und neue Verfahren bereitgestellt, die zur synthetischen Herstellung der Intermediate nützlich sind. Das Konjugat der vorliegenden Erfindung kann im Wesentlichen in jeder Anwendung eingesetzt werden, die eine fluoreszente Einheit verwendet, welche auf einem spezifischen Bindungsglied immobilisiert wurde.

[0018] Das hierin bereitgestellte Konjugat umfasst ein spezifisches Bindungsglied, das kovalent an mindestens ein hochgradig fluoreszentes Polymer gebunden ist. Das hochgradig fluoreszente Polymer umfasst ein Hauptketten-Polymer, an das fluoreszente Verbindungen direkt gebunden sind. Alternativ können Cyclodextrinmoleküle kovalent an das Hauptketten-Polymer gebunden sein, und die fluoreszenten Verbindungen können in die hydrophoben Mikroumgebungen der Cyclodextrinmoleküle eingeschlossen sein, wodurch die Signal erzeugenden Gruppen indirekt mit dem Polymer verbunden werden. Wenn die fluoreszenten Verbindungen direkt an das Hauptketten-Polymer gebunden werden, können Cyclodextrinmoleküle indirekt zum Polymer hinzugefügt werden, indem sie an die gebundenen Signal erzeugenden Gruppen gebunden werden, oder Cyclodextrin kann zum fluoreszenten Polymer hinzugefügt werden, indem es kovalent daran gebunden wird.

[0019] Ein Verfahren zur Herstellung von 6-Cyclodextrinmonoaldehyd wird beschrieben. Das Verfahren ermöglicht die ortsspezifische Einführung einer Aldehydgruppe in ein Cyclodextrinmolekül. Das Verfahren fügt eine einzelne Aldehydgruppe in den primären Rand eines Cyclodextrinmoleküls ein und erzeugt so ein reaktives Cyclodextrinmolekül, das, wenn es zur Reaktion gebracht wird, keine Quervernetzung verursacht und eine Behinderung der Öffnung des größeren sekundären Randes vermeidet.

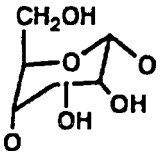
[0020] Das Verfahren zur Herstellung von 6-Cyclodextrinmonoaldehyd umfasst folgende Schritte:

a) Umwandlung eines Cyclodextrinmoleküls mit der Formel

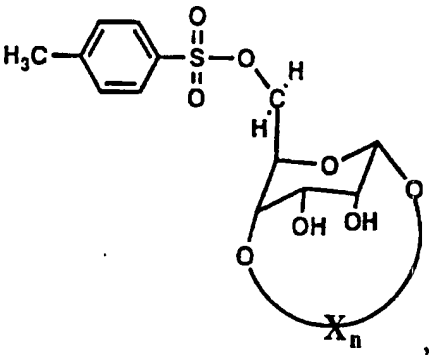


,

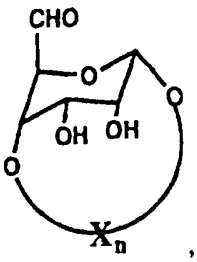
worin X Folgendes ist:



und n 5, 6 oder 7 ist,
in sein Monotosylatderivat mit der Formel



worin X und n wie oben definiert sind; und
b) Umwandlung des Monotosylatderivats in Schritt (a) in 6-Cyclodextrinmonoaldehyd mit der Formel



worin X und n wie oben definiert sind.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0021] Fig. 1 zeigt Alpha (α) -, Beta (β) – und Gamma (γ) – Cyclodextrin und das System zur Nummerierung der Glucoseeinheiten darin.

[0022] Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0023] Die folgenden Definitionen sind auf die Erfindung anwendbar:

Definitionen

[0024] Der Begriff "Analyt", wie hierin verwendet, bezieht sich auf die Verbindung oder Zusammensetzung, die nachgewiesen oder gemessen werden soll und die mindestens ein Epitop oder mindestens eine Bindungsstelle hat. Der Analyt kann jede Substanz sein, für die ein natürlich vorkommendes Bindungsglied existiert oder für die ein Bindungsglied hergestellt werden kann. Analyte schließen Folgendes ein, sollen jedoch nicht darauf beschränkt sein: Toxine, organische Verbindungen, Proteine, Peptide, Mikroorganismen, Zellen, die in menschlichem oder tierischem Blut enthalten sind, Oberflächenantigene, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Hormone, Steroide, Vitamine, Drogen (einschließlich solcher, die für therapeutische Zwecke verabreicht wurden, ebenso wie solcher, die zu illegalen Zwecken verabreicht wurden), Viruspartikel und Metabolite von oder Antikörper zu einer beliebigen der oben erwähnten Substanzen. Solche Analyte schließen z. B. Folgendes ein, sollen jedoch nicht darauf beschränkt sein: Ferritin, Kreatininkinase (creatinine kinase, CK-MB), Digoxin, Phenytoin, Phenobarbitol, Carbamazepin, Vancomycin, Gentamycin, Theophyllin, Valproinsäure, Chinidin, Lutropin (leutinizing hormone, LH), Follikelstimulierungshormon (FSH), Östradiol, Progesteron, IgE-Antikörper, Vitamin B2-Mikroglobulin, glyciertes Hämoglobin (Gly Hb), Cortisol, Digitoxin, N-Acetylprocainamid (NAPA), Procainamid, Antikörper zu Rubella, wie z. B. Rubella-IgG und Rubella-IgM, Antikörper zu Toxoplasmose, wie z. B. Toxoplasmose-IgG (Toxo-IgG) und Toxoplasmose-IgM (Toxo-IgM), Testosteron, Salicylate, Acetaminophen, Hepatitis B-Virusoberflächenantigen (HBsAg), Antikörper zum Hepatitis B-Kernantigen, wie z. B. Anti-Hepatitis

B-Kernantigen IgG und IgM (Anti-HBC), Human Immune Deficiency Virus 1 und 2 (HTLV), Hepatitis B e-Antigen (HBeAg), Antikörper zum Hepatitis B e-Antigen (Anti-HBe), Thyreotropin (thyroid stimulating hormone, TSH), Thyroxin (T4), Gesamt-Triiodthyronin (Gesamt-T3), freies Triiodthyronin (freies T3), Carcinoembryonales Antigen (CEA), Alphafetoprotein (AFP) und Suchtmittel und Controlled Substances, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Amphetamin, Methamphetamin, Barbiturate, wie z. B. Amobarbital, Secobarbital, Pentobarbital, Phenobarbital und Barbital, Benzodiazepine, wie z. B. Librium und Valium, Cannabinoide, wie z. B. Haschisch und Marihuana, Kokain, Fentanyl, LSD, Methaqualon, Opiate, wie z. B. Heroin, Morphin, Codein, Hydromorphon, Hydrocodon, Methadon, Oxycodon, Oxymorphon und Opium, Phencyclidin, Propoxyphen und dergleichen. Der Begriff "Analyt" schließt auch beliebige antigene Substanzen, Haptene, Antikörper, Makromoleküle und Kombinationen davon ein.

[0025] Der Begriff "Cyclodextrin", wie hierin verwendet, bezieht sich auf α-, β- oder γ-Cyclodextrin.

[0026] Der Begriff "optimiertes hochgradig fluoreszentes Polymer", wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein Polymer, auf dem mehrere Signal erzeugende Gruppen immobilisiert sind. Die immobilisierten Signal erzeugenden Gruppen sind in solchen Abständen entlang des Polymers angeordnet, dass das von den Signal erzeugenden Gruppen erzeugte Signal maximiert wird und der Löscheffekt minimiert wird, der damit zusammenhängt, dass mehrere Signal erzeugende Gruppen zu nahe beieinander liegen.

[0027] Der Begriff "primäres Reagens", wie hierin verwendet, bezeichnet ein Mittel, das sich spezifisch an einen Analyten bindet und als Brücke zwischen dem Analyten, an den es gebunden ist, und einem Konjugat verwendet wird, an welches das primäre Reagens gebunden wird.

[0028] Der Begriff "Signal erzeugende Gruppe", wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine fluoreszierende Verbindung (manchmal als Fluorophor bezeichnet), die in der Lage ist, Energie zu absorbieren und Licht abzugeben oder zu fluoreszieren. Beispiele für Signal erzeugende Gruppen schließen Folgendes ein, sollen jedoch nicht darauf beschränkt sein: Fluorescein, Cascade blue, Texas Red™, p-Phthallocyanine, Cyaninfarbstoffe, Thiazole, Dansyl, Naphthalen, p-Toluidinylnaphthalensulfonsäure, Cumarin, Phycoerythrin, Allophycocyanin und dergleichen.

[0029] "Spezifisches Bindungsglied", wie hierin verwendet, bezeichnet ein Glied eines spezifischen Bindungspaares, d. h. zweier verschiedener Moleküle, worin sich eines der Moleküle durch chemische oder physikalische Mittel spezifisch an das andere Molekül bindet. Zusätzlich zu spezifischen Antigen- und- Antikörper-Bindungspaaren schließen andere spezifische Bindungspaare Folgendes ein, sind aber nicht darauf beschränkt: Avidin und Biotin, Kohlenhydrate und Lektine, komplementäre Nukleotidsequenzen, komplementäre Peptidsequenzen, Effektor- und Rezeptormoleküle, einen Enzym-Cofaktor oder ein Substrat und ein Enzym, einen Enzyminhibitor und ein Enzym, polymere Säuren und Basen, Farbstoffe und Proteinbinder, Peptide und spezifische Proteinbinder (z. B. Ribonuclease, S-Peptid und Ribonuclease-S-Protein) und dergleichen. Weiterhin können Bindungspaare Glieder einschließen, die Analoge des ursprünglichen Bindungsglieds sind, z. B. ein Analyt-Analog oder ein Bindungsglied, das durch Rekombinationstechniken oder Molekulartechnik (molecular engineering) hergestellt wurde. Wenn das Bindungsglied ein Immunreaktant ist, kann es z. B. ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, ein rekombinantes Protein oder ein rekombinanter Antikörper, ein chimärischer Antikörper, (eine) Mischung(en) oder (ein) Fragment(e) von diesen sein.

[0030] Der Begriff "Untersuchungsprobe", wie hierin verwendet, bezeichnet ein Material, von dem vermutet wird, dass es Analyte enthält. Die Untersuchungsprobe kann direkt wie aus der Quelle gewonnen verwendet werden oder nach einer Vorbehandlung zur Veränderung der Eigenschaften der Probe. Die Untersuchungsprobe kann aus einer beliebigen biologischen Quelle gewonnen werden, wie z. B. einer physiologischen Flüssigkeit, einschließlich Blut, Speichel, Augenlinsenflüssigkeit, Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit, Schweiß, Urin, Milch, Aszitesflüssigkeit, Schleim, Synovialflüssigkeit, Peritonealflüssigkeit, Fruchtwasser und dergleichen, und Fermentationslösungs-Zellkulturen und chemischen Reaktionsgemischen und dergleichen. Zusätzlich zu biologischen oder physiologischen Flüssigkeiten können auch andere Flüssigkeitsproben verwendet werden, wie z. B. Wasser, Lebensmittel u. Ä., zur Durchführung von Umwelt- oder Lebensmittelproduktionstests. Außerdem kann ein festes Material, von dem vermutet wird, dass es einen Analyten enthält, als Untersuchungsprobe verwendet werden. In manchen Fällen kann es vorteilhaft sein, eine feste Untersuchungsprobe zu modifizieren, um ein flüssiges Medium zu bilden oder einen Analyten freizusetzen. Die Untersuchungsprobe kann vor der Verwendung vorbehandelt werden, z. B. durch Gewinnung von Plasma aus Blut, Verdünnung von dickflüssigen Flüssigkeiten, Filtern von Flüssigkeiten, Destillieren von Flüssigkeiten, Konzentrieren von Flüssigkeiten, Inaktivierung störender Komponenten, Hinzufügen von Reagenzien und dergleichen.

[0031] Gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst das wasserlösliche Hauptkettenpolymer, das für die Herstellung des hierin bereitgestellten Konjugats verwendet wird, ein aminfunktionelles Polymer, das mit den folgenden aminfunktionellen Gruppen typischerweise aminfunktionell ist:



worin R gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus C_1-C_3-Alkyl, 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 $-(CHOH)_4CH_2OH$. Das aminfunktionelle Polymer kann auch Kombinationen der oben angeführten Aminfunktionalitäten haben. Vorzugsweise hat das Polymer ein durchschnittliches Molekulargewicht von zwischen ungefähr 20.000 und 300.000, mehr bevorzugt zwischen ungefähr 100.000 und 250.000 und am meisten bevorzugt zwischen ungefähr 150.000 und ungefähr 200.000.

[0032] Wenn Signal erzeugende Gruppen direkt an das Hauptkettenpolymer gebunden werden sollen, haben die Signal erzeugenden Gruppen vorzugsweise eine reaktive Gruppe, die geeignet ist, um kovalente Bindungen mit dem aminfunktionellen Polymer zu bilden. Signal erzeugende Gruppen, die zu einer solchen Reaktion in der Lage sind, schließen solche ein, die Succinimidyl-aktive Ester haben, Säurehalogenide, Sulfonylhalogenide, Aldehyde, Iodacetyle oder Maleimidogruppen, sind aber nicht darauf beschränkt. Beispiele für Signal erzeugende Gruppen, die die oben erwähnten Funktionalitäten haben können, schließen Folgendes ein: Fluorescein, Cascade blue, Texas Red™, p-Phthallocyanine, Cyaninfarbstoffe, Thiazole, Dansyl, Naphthalen, p-Toluidinylnaphthalensulfonsäure, Cumarin, Phycoerythrin, Allophycocyanin u. Ä.

[0033] Wie zuvor erwähnt, können die Signal erzeugenden Gruppen nicht kovalent in einem hydrophoben Hohlraum eines Cyclodextrinmoleküls eingeschlossen sein, das kovalent an die Polymerhauptkette gebunden ist. In dieser Situation brauchen die Signal erzeugenden Gruppen keine reaktive Gruppe zu tragen. Wie jedoch für den Fachmann verständlich ist, wird die Signal erzeugende Gruppe in der Lage sein, in das spezielle verwendete Cyclodextrinmolekül eingelagert zu werden.

[0034] Wie zuvor erwähnt, wird eine Signallöschung verursacht, wenn mehrere Farbstoffe nach dem Zufallsprinzip auf einem einzigen Polymer platziert werden. Diese Löschung wird durch Optimierung der Anzahl von Farbstoffen, die mit einem einzigen Hauptkettenpolymer verbunden sind, wesentlich reduziert. Durch Optimierung der Anzahl von Farbstoffen, die auf einem einzigen Hauptkettenpolymer platziert sind, sind die einzelnen Farbstoffe weniger anfällig für Löschung. Durch Optimierung der Signal erzeugenden Gruppen auf dem Hauptkettenpolymer kann das Konjugat der vorliegenden Erfindung ein Signal abgeben, das von einem Nachweisgerät mit mit relativ geringer Empfindlichkeit und relativ niedrigem Preis nachgewiesen werden kann. Weiter wird durch Mischen von monomerem Cyclodextrin mit einem Präparat aus optimiertem fluoreszentem Polymerkonjugat unter geeigneten Bedingungen das vom Polymer abgegebene Signal noch weiter verstärkt. Überraschend und unerwartet wurde festgestellt, dass das Signal, das vom Konjugat der vorliegenden Erfindung erzeugt wird, bis zu ungefähr 35-mal gegenüber demjenigen der zurzeit verfügbaren Konjugate verstärkt werden kann.

[0035] Das fluoreszente Polymer kann an jedes spezifische Bindungsglied gebunden werden, das mit einer aminfunktionellen Gruppe am Hauptkettenpolymer reaktiv ist. Obwohl viele spezifische Bindungsglieder zur Verwendung im Konjugat der vorliegenden Erfindung geeignet sind, werden Antikörper bevorzugt.

[0036] Das Konjugat der vorliegenden Erfindung kann in einer Vielzahl von Anwendungen verwendet werden, die Fluoreszenz nutzen, um einen spezifischen Bindungsvorgang nachzuweisen. Solche Anwendungen schließen Folgendes ein, sind aber nicht darauf beschränkt: Bildanalyse, Flusszytometrie, Immunoassays, Fluoreszenzzellfärbung, Fluoreszenzmikroskopie u. Ä.

[0037] Das Binden von Signal erzeugenden Gruppen an ein Hauptkettenpolymer kann durchgeführt werden durch Reagieren der Amingruppen am Hauptkettenpolymer mit den reaktiven Gruppen an den Signal erzeugenden Gruppen. Dieser Vorgang des Bindens der Signal erzeugenden Gruppen an das Polymer wird als "Beladung" des Polymers bezeichnet. Die Beladung eines Polymers mit Signal erzeugenden Gruppen alleine erzeugt jedoch nicht unbedingt ein Polymer, das die größtmögliche Menge an Fluoreszenz aussendet. Dies kann das Ergebnis einer Überbeladung eines Polymers sein, die zur Löschung führt, oder einer Unterbeladung eines Polymers, das weitere Signal erzeugende Gruppen aufnehmen könnte, ohne dass dies zur Löschung führt. Daher wird bevorzugt, die Anzahl Signal erzeugender Gruppen, mit denen ein Polymer beladen wird, zu optimieren, um ein Polymer zu erzeugen, das in der Lage ist, das stärkste Signal abzugeben.

[0038] Die Optimierung der Anzahl von Fluorophoren an einem aminfunktionellen Polymer kann erreicht werden durch die Durchführung einer Reihe von Optimierungsbeladungen und anschließendes Bestimmen, welche Beladung das Polymer ergibt, welches das stärkste Signal aussendet. Im Allgemeinen kann dieses Verfahren durchgeführt werden durch Erstellung einer Reihe von Testbeladungen, die verschiedene Konzentrationen Signal erzeugender Gruppen mit einer konstanten Polymermenge verbinden. Die beladenen Polymere können dann von nicht umgesetzten Verbindungen durch eine Vielzahl von Methoden gereinigt werden, die Personen mit grundlegenden Fachkenntnissen bekannt sind, wie z. B. Ausfällen, isoelektrische Fokussierung oder vorzugsweise Ausschlusschromatographie. Die gereinigten Polymere können dann auf ihre Fähigkeit zur Signalabgabe getestet werden, um zu bestimmen, welche Beladungskonzentration das Polymer ergibt, welches das stärkste Signal aussendet.

[0039] Typischerweise wurde das Polymer, welches das stärkste Signal aussendet, optimal beladen, und die Konzentration, mit der es beladen wurde, kann verwendet werden, um präparative Mengen des fluoreszenten Polymers optimal zu beladen.

[0040] Das bevorzugte Verfahren zur Optimierung der Anzahl Signal erzeugender Gruppen an einem bestimmten Polymer kann durchgeführt werden, indem zunächst das Molekulargewicht des gewünschten wasserlöslichen Polymers berechnet und die gesamte molare Menge aminfunktioneller Gruppen am Polymer ermittelt wird. Als Nächstes wird eine Platte, bestehend aus einer Serie von Lösungen, von denen jede eine andere Konzentration einer Signal erzeugenden Gruppe enthält, erstellt. Die Plattenlösungen umfassen verschiedene Konzentrationen der Signal erzeugenden Gruppe, aufgelöst in einem geeigneten Lösungsmittel, wie z. B. Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylsulfoxid (DMSO). Die verschiedenen Konzentrationen basieren auf der gesamten molaren Menge der Aminfunktionalität auf dem aminfunktionellen Polymer, und eine typische Platte kann folgende Konzentrationen einschließen: 5%, 10%, 15%, 20%, 40%, 75%, 100%, 140% und 200% der gesamten molaren Menge der aminfunktionellen Gruppen am ausgewählten Polymer. Die Plattenkonzentrationen werden vorzugsweise so weit durchgeführt, dass eine Löschung stattfindet, wodurch eindeutig der Punkt angezeigt wird, an dem das Polymer optimal beladen ist. Nachdem die Platte aufgesetzt wurde, wird jedes Glied der Platte zu separaten und äquimolaren Lösungen des Polymers gegeben.

[0041] Jede Lösung aus beladenem Polymer kann dann von nicht umgesetztem Polymer und/oder Signal erzeugenden Gruppen mit Techniken gereinigt werden, die im Fachgebiet gut bekannt sind. Wie oben erwähnt, können die Polymere, nachdem sie gereinigt wurden, auf ihre Fähigkeit zur Signalabgabe analysiert werden, und mit den so gewonnenen Daten kann dann eine präparative Menge von Polymer hergestellt werden. Alternativ können weitere Optimierungsplatten durchgeführt werden, um die optimale Beladungskonzentration genauer zu bestimmen. Es versteht sich natürlich, dass die Art und Weise, in der ein Polymer optimiert wird, nicht auf die hierin beschriebenen Verfahren beschränkt sein soll und dass andere Verfahren ebenfalls angewandt werden können.

[0042] Das hochgradig fluoreszente Polymer kann mit einer Vielzahl von Techniken, die im Fachgebiet gut bekannt sind, an ein spezifisches Bindungspaarglied gebunden werden. Es ist ein bevorzugtes Merkmal dieser Erfindung, das (die) fluoreszente(n) Polymer(e) an oder nahe dem Fc-Abschnitt eines Antikörpers kovalent zu binden. Eine solche Bindung des Polymers an einen Antikörper behindert sterisch den Fc-Abschnitt des Antikörpers und hindert ihn so daran, sich z.B. an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche bestimmter Zellpopulationen zu binden. Zusätzlich lässt die ortsspezifische Bindung die hypervariablen Bereiche der Antikörper unbehindert und fähig, sich an ihr vorgesehenes Target zu binden. Es versteht sich natürlich, dass die Art, in der ein spezifisches Bindungsglied an ein fluoreszentes Polymer gebunden wird, sich nicht auf die hierin beschriebenen Verfahren beschränken soll und dass andere im Fachgebiet bekannte Verfahren ebenfalls angewandt werden können.

[0043] Ein fluoreszentes Polymer kann an einen Antikörper gebunden werden durch Oxidation des Fc-Bereichs des Antikörpers und anschließendes Reagieren des oxidierten Antikörpers mit einem Polymer von der hierin beschriebenen Art. Der Antikörper wird vorzugsweise bei einer Konzentration von zwischen ungefähr 1,0 mg/ml und ungefähr 20,0 mg/ml, mehr bevorzugt zwischen ungefähr 1,0 mg/ml und ungefähr 10,0 mg/ml und am meisten bevorzugt zwischen ungefähr 2,0 mg/ml und ungefähr 5,0 mg/ml oxidiert. Falls der Antikörper in Konzentrationen außerhalb dieser Bandbreiten gewonnen wird, kann er mit Mitteln, die Personen mit grundlegenden Fachkenntnissen vertraut sind, konzentriert oder mit einem geeigneten Puffer verdünnt werden. Der Antikörper wird vorzugsweise in einem geeigneten Puffer mit einem pH zwischen ungefähr 6,5 und ungefähr 8,0, mehr bevorzugt zwischen ungefähr 7,0 und ungefähr 8,0 und am meisten bevorzugt zwischen ungefähr 7,5 und ungefähr 8,0 oxidiert. Die Oxidation des Fc-Bereichs des Antikörpers kann mit einem Oxidationsmittel, das dem Fachmann gut bekannt ist, durchgeführt werden. Solche Oxidationsmittel schließen Folgendes ein,

sind aber nicht darauf beschränkt: Natriumtetroxoiodat(VIII), Chromdioxid, Kaliumpermanganat, Mangandioxid, Brom u. Ä. Die Oxidationsmittellösung hat typischerweise eine Konzentration von zwischen ungefähr 100 mM und ungefähr 250 mM, vorzugsweise zwischen ungefähr 150 mM und ungefähr 200 mM und am meisten bevorzugt zwischen ungefähr 175 mM und ungefähr 200 mM. Die Oxidation des Antikörpers kann bei einer Temperatur von zwischen ungefähr 2°C und ungefähr 30°C stattfinden; vorzugsweise findet sie statt bei einer Temperatur zwischen ungefähr 2°C und ungefähr 8°C über einen Zeitraum zwischen ungefähr 15 Minuten und ungefähr 5 Stunden, vorzugsweise zwischen ungefähr 1 Stunde und 2 Stunden. Nachdem der Antikörper oxidiert wurde, kann er er gereinigt werden durch Verfahren, die im Fachgebiet bekannt sind, und in einen geeigneten Puffer platziert werden, der einen pH im Bereich von ungefähr 3 und ungefähr 6, vorzugsweise im Bereich von ungefähr 4 und ungefähr 5, hat. Der oxidierte Antikörper kann dann an das fluoreszente Polymer gekuppelt werden. Es versteht sich natürlich, dass die Art, in der ein Antikörper oxidiert wird, nicht auf die hierin beschriebenen Verfahren beschränkt sein soll und dass andere im Fachgebiet bekannte Verfahren ebenfalls eingesetzt werden können.

[0044] Wenn zum Beispiel ein oxidierter Antikörper mit einem fluoreszenten Polymer zur Reaktion gebracht wird, kann die Konzentration des Polymers im Bereich von ungefähr 1,0 mg/ml und ungefähr 20,0 mg/ml, vorzugsweise im Bereich von ungefähr 2,0 mg/ml und ungefähr 5,0 mg/ml liegen, in einem geeigneten Puffer mit einem pH im Bereich von ungefähr 4,0 und ungefähr 7,0, vorzugsweise im Bereich von ungefähr 4,0 und ungefähr 5,0. Obwohl viele Puffer geeignet sind, ist der bevorzugte Puffer ein Natriumacetatpuffer mit zwischen ungefähr 50 mM und 200 mM Natriumacetat und zwischen ungefähr 75 mM und 150 mM Natriumchlorid. Die Menge an Polymer, die zum oxidierten Antikörper gegeben wird, kann im Bereich von ungefähr 1,0 und ungefähr 20 Äquivalenten von Polymer zu Antikörper auf der Grundlage des Molekulargewichts des Antikörpers und des geschätzten Molekulargewichts des fluoreszenten Polymers liegen. Die Reaktion zwischen dem oxidierten Antikörper und dem fluoreszenten Polymer kann bei einer Temperatur zwischen ungefähr 2°C und ungefähr 30°C, vorzugsweise zwischen ungefähr 2°C und ungefähr 8°C, in einem leichten dichten Behälter stattfinden. Die Reaktion kann zwischen ungefähr 2 und ungefähr 48 Stunden lang, vorzugsweise zwischen ungefähr 12 und ungefähr 15 Stunden lang, ablaufen. Nach Abschluss der Reaktion kann das Konjugat mit Reinigungsmethoden, die dem Fachmann bekannt sind, von den nicht umgesetzten Bestandteilen des Reaktionsgemischs gereinigt werden.

[0045] In Fällen, in denen primäre oder sekundäre aminfunktionelle fluoreszente Polymere kovalent an ein spezifisches Bindungsglied gebunden werden, wird ein zusätzlicher Schritt bevorzugt. Spezifisch wird als Ergebnis der ersten Reaktion zwischen dem Antikörper und dem Polymer eine Schiffsche Base gebildet, und die Reduktion der Schiffschen Base kann erreicht werden durch Verfahren, die im Fachgebiet gut bekannt sind, wie z. B. die Verwendung eines geeigneten Reduktionsmittels, wie z. B. $NaCNBH_3$, in einer Konzentration im Bereich von zwischen ungefähr 0,25 mg/ml und 2,0 mg/ml. Das reduzierte Konjugat kann dann mit Reinigungsverfahren, die im Fachgebiet bekannt und oben erwähnt sind, von überschüssigen Reaktantien gereinigt werden. Es versteht sich natürlich, dass die Art, in der eine Schiffsche Base reduziert wird, nicht auf die hierin beschriebenen Verfahren beschränkt werden soll und dass andere Verfahren ebenfalls eingesetzt werden können.

[0046] Wie zuvor erwähnt, kann Cyclodextrin verwendet werden, um die Fluoreszenz des hierin bereitgestellten Konjugats zu erhöhen. Eine Möglichkeit, wie die Fluoreszenz des Konjugats verbessert werden kann, besteht im Hinzufügen von Cyclodextrin zu einem vereinigten Konjugat (d. h. einem spezifischen Bindungsglied, das kovalent an ein hochgradig fluoreszentes Polymer gebunden ist). Cyclodextrin, das in dieser Weise verwendet wird, erfordert keine Modifikation des Cyclodextrinmoleküls oder des Konjugats. Obwohl das genaue Bindungsverfahren nicht bekannt ist, wird angenommen, dass das Cyclodextrin sich an die Signal erzeugenden Gruppen an der Polymerhauptkette bindet, indem es die gebundenen Signal erzeugenden Gruppen in seinem hydrophoben Zentrum aufnimmt. Wenn Cyclodextrin so verwendet wird, wird es vorzugsweise in Konzentrationen im Bereich von zwischen ungefähr 5 mM und 200 mM, vorzugsweise im Bereich von zwischen ungefähr 10 mM und 20 mM, eingesetzt.

[0047] Eine Verstärkung des Signals, das vom hierin beschriebenen Konjugat erzeugt wird, kann auch erzielt werden durch direkte Bindung von Cyclodextrin an die Polymerhauptkette des Konjugats. Das Cyclodextrin kann kovalent an die Polymerhauptkette gebunden werden, an die Signal erzeugende Gruppen kovalent gebunden sind, oder es kann alleine kovalent an das Hauptkettenpolymer gebunden werden. In letzterem Fall können die Signal erzeugenden Gruppen über eine Einschlussverbindung mit den kovalent gebundenen polymeren Cyclodextrinmolekülen an das fluoreszente Polymer gebunden werden. Nachdem diese Verbindung hergestellt wurde, kann das Polymer durch Verfahren, die im Fachgebiet bekannt sind, von den restlichen nicht eingeschlossenen Signal erzeugenden Gruppen gereinigt werden. Um diese Einschlussverbindung zu ermög-

lichen, sollte das Cyclodextrinmolekül auf eine Art gebunden werden, die es dem sekundären Rand des Cyclodextrinmoleküls ermöglicht, unbehindert und somit offen zu bleiben, um eine Signal erzeugende Gruppe in den hydrophoben Hohlraum aufzunehmen.

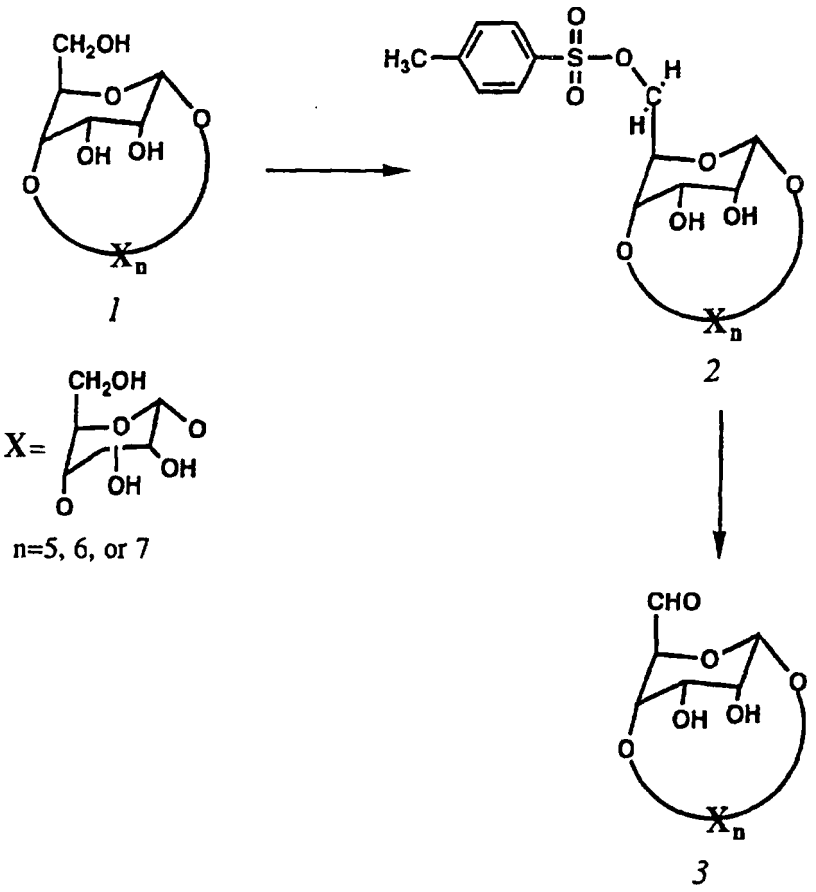
[0048] Durch selektives Hinzufügen einer einzelnen reaktiven Gruppe zum primären Rand des Cyclodextrinmoleküls kann das Cyclodextrin über seinen primären Rand an das Hauptkettenpolymer gebunden werden. Somit wird der sekundäre Rand unbehindert und der hydrophobe Hohlraum für Gastmoleküle zugänglich sein.

[0049] Die kovalente Bindung des primären Randes eines Cyclodextrinmoleküls an ein aminfunktionelles Polymer kann durchgeführt werden durch Hinzufügen einer einzelnen Aldehydgruppe zum primären Rand des Cyclodextrinmoleküls. Sobald das einzelne Aldehyd zum Cyclodextrinmolekül hinzugefügt wurde, kann es direkt mit einer Amingruppe am aminfunktionellen Polymer zur Reaktion gebracht werden, wodurch das Cyclodextrin über eine kovalente Einfachbindung mit dem primären Rand des Cyclodextrins an das Polymer gebunden wird. Somit wird das Cyclodextrin so an das Polymer gebunden, dass der sekundäre Rand unbehindert und daher für Gastmoleküle zugänglich bleibt.

[0050] Wie zuvor erwähnt, kann das Hinzufügen einer einzelnen Aldehydgruppe zum primären Rand eines Cyclodextrinmoleküls mit Methoden durchgeführt werden, die im Fachgebiet bekannt sind. Diese Verfahren beinhalten jedoch die Herstellung von Intermediaten, die potentiell gefährlich sind. Zum Beispiel kann ein Aldehyd unter Verwendung des Dess-Martin-Periodonan-Reagens zum primären Rand von Cyclodextrin hinzugefügt werden. D. B. Dess u. a., J. Org. Chem., 48, 4155-4156 (1983). Diese Reaktion kann in einem heterogenen System durchgeführt werden, das stöchiometrische Mengen von Dess-Martin-Reagens und in Tetrahydrofuran (THF) aufgelöstem Cyclodextrin enthält. Obwohl 6-Cyclodextrinmonoaldehyd erzeugt wird, ist das Dess-Martin-Reagens potentiell explosiv und nicht mehr problemlos aus einer kommerziellen Quelle erhältlich. Andere Wege zur Herstellung des Monoaldehyds beinhalten drei bis vier Schritte, die toxische und potentiell explosive Azidintermediate erzeugen.

[0051] Alternativ wird ein Verfahren zur Herstellung von 6-Cyclodextrinmonoaldehyden beschrieben, das nicht die Produktion gefährlicher Intermediate beinhaltet und mit Materialien durchgeführt wird, die kommerziell leicht erhältlich sind. Im Allgemeinen ist das Verfahren ein Prozess in zwei Schritten, der durchgeführt werden kann wie unten in Schema I dargestellt.

Schema 1



[0052] Der erste Schritt des Verfahrens besteht in der Umwandlung eines Cyclodextrins mit der Formel 1 in sein Monotosylatderivat mit der Formel 2. Das Tosylatderivat mit der Formel 2 wird dann oxidiert, um das Cyclodextrinmonoaldehyd mit der Formel 3 zu ergeben.

[0053] Es gibt mehrere akzeptable Verfahren zur Umwandlung des Cyclodextrins mit der Formel 1 in sein Monotosylatderivat mit der Formel 2. Siehe L. D. Melton u. a., Carbohyd. Res., 18, 29-37 (1971) oder R. C. Petter u. a., J. Am. Chem. Soc. 112, 3360-3868 (1990). Nachdem das Monotosylat mit der Formel 2 gebildet wurde, kann es aus dem Reaktionsgemisch durch Verfahren isoliert werden, die dem Fachmann bekannt sind, vorzugsweise durch Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Das feste Monotosylat kann dann rückgewonnen werden durch Trocknung des Lösungsmittels aus dem aufgelösten Cyclodextrinmonotosylat mit Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind. Das feste Cyclodextrinmonoaldehyd ist dann zur Verwendung im zweiten Schritt des Verfahrens bereit.

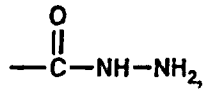
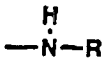
[0054] Der zweite oxidative Schritt der Umwandlung kann anhand mehrerer Verfahren durchgeführt werden. Im Allgemeinen ist der Oxidationsschritt eine Dimethylsulfoxid (DMSO)-vermittelte Reaktion, die durch das Hinzugeben einer Base katalysiert werden kann. Es wurde festgestellt, dass eine Erhitzung des Monotosylatderivats zwischen ungefähr 75°C und ungefähr 85°C in DMSO zur langsamen Umwandlung (ungefähr 1-3 Tage) des Tosylatderivats in das Monoaldehyd mit der Formel 3 führte.

[0055] Das Hinzufügen einer Base zur DMSO-vermittelten Reaktion beschleunigt die Geschwindigkeit der Umwandlung des Monotosylats in das Monoaldehyd mit der Formel 3. Zum Beispiel beschleunigte eine Spur von NaOH die Reaktion. Bevorzugte Basen zur Verwendung in diesem Schritt des Verfahrens schließen Folgendes ein: gehinderte Aminbasen, wie z. B. Diisopropylamin, N-Methylmorpholin, Triethylamin, Trimethylamin und dergleichen.

[0056] Diisopropylethylamin (a.k.a. Hunigs Base) ist eine besonders bevorzugte gehinderte Aminbase. Vorzugsweise wird die Umwandlung des Monotosylats in das Monoaldehyd durchgeführt, wenn das Monotosylat in Lösung bei einer Konzentration von zwischen ungefähr 0,5% und ungefähr 20%, stärker bevorzugt zwischen ungefähr 1% und ungefähr 15% und am stärksten bevorzugt zwischen ungefähr 2% und ungefähr 10% vorliegt. Die Menge an gehinderter Aminbase, die zur Umwandlung verwendet wird, kann zwischen ungefähr 0,1

und ungefähr 1,0 molaren Äquivalenten des Monotosylats in Lösung liegen, vorzugsweise zwischen ungefähr 0,3 und ungefähr 0,7 molaren Äquivalenten des Monotosylats in Lösung. Das solchermaßen gebildete Cyclodextrinmonoaldehyd kann aus eventuellem nicht umgesetztem Material durch Verfahren, die im Fachgebiet gut bekannt sind, gereinigt und mit einem aminfunktionellen Polymer zur Reaktion gebracht werden, oder das endgültige Reaktionsgemisch kann direkt mit einem aminfunktionellen Polymer zur Reaktion gebracht werden.

[0057] Unter Verwendung von Standardverfahren der kovalenten Chemie, die dem Fachmann bekannt sind, wird das hierin bereitgestellte Cyclodextrinmonoaldehyd leicht an Verbindungen mit Aminfunktionalitäten gebunden. Beispiele für solche Aminfunktionalitäten schließen Folgendes ein, sollen jedoch nicht darauf beschränkt sein:

limited to  und ,

worin R gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus C_1-C_3-Alkyl, 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 $-(CHOH)_4CH_2OH$. Beispiele für Verbindungen, die aminfunktionell mit diesen Gruppen sind, schließen aminfunktionelle Polymere ein, wie z. B. Polyacrylamidhydrazid, oder aminfunktionelle feste Phasen, wie z. B. aminierte Mikropartikel.

[0058] In Fällen, in denen primäre oder sekundäre aminfunktionelle Verbindungen kovalent mit Cyclodextrinmonoaldehyd zur Reaktion gebracht werden, wird ein zusätzlicher Schritt bevorzugt. Speziell wird nach der ursprünglichen Reaktion zwischen der Verbindung und dem Monoaldehyd eine Schiffsche Base gebildet, und die Reduktion der Schiffschen Base kann auf die oben beschriebene Art durchgeführt werden.

[0059] Das Cyclodextrinmonoaldehyd kann an aminfunktionelle Polymere oder aminfunktionelle Polymere, die optimal mit Signal erzeugenden Gruppen beladen sind, gebunden werden. Falls das Cyclodextrinmonoaldehyd an ein aminfunktionelles Polymer gebunden wird, kann das Polycyclodextrinpolymer anschließend mit Signal erzeugenden Gruppen fluoreszent gemacht werden. Eine Möglichkeit, wie das Polycyclodextrinpolymer fluoreszent gemacht werden kann, besteht in der kovalenten Bindung der Signal erzeugenden Gruppen an das aminfunktionelle Polymer. Wenn das Polymer auf diese Art fluoreszent gemacht wird, versteht es sich, dass einige der aminfunktionellen Gruppen des Polymers für eine Reaktion zur Verfügung stehen müssen.

[0060] Eine andere Möglichkeit, wie das Polycyclodextrin fluoreszent gemacht werden kann, besteht im Hinzugeben Signal erzeugender Gruppen zu einer Lösung, die das Polycyclodextrinpolymer enthält, oder zu einer Lösung, die das Polycyclodextrin, gebunden an ein spezifisches Bindungsglied, enthält. Bei diesem Verfahren der Derivatisierung wird die Einschlussfähigkeit des Cyclodextrins genutzt wie oben ausgeführt. Zusätzlich können, nachdem die Einschlussfähigkeit ausgenutzt wurde, überschüssige Signal erzeugende Gruppen entfernt werden wie oben ausgeführt.

[0061] Nachdem ein Polycyclodextrin/Polysignal erzeugenden Gruppe Polymer hergestellt wurde, kann es an ein spezifisches Bindungsglied gebunden werden wie oben beschrieben.

[0062] Wie zuvor erwähnt, gibt es für das vervollständigte Konjugat eine Vielzahl von Nutzungsmöglichkeiten. Das bevorzugte Verfahren zur Verwendung des Konjugats der vorliegenden Erfindung ist in einer Flusszytometrie-Anwendung, die ein fluoreszierendes Konjugat oder mehrere fluoreszierende Konjugate benutzt, um Zellen nachzuweisen, die in einer Untersuchungsprobe enthalten sind. Ein Beispiel für ein Flusszytometer schließt den Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS II) ein, hergestellt von Becton, Dickinson & Co, Franklin Lakes, NJ. Im Allgemeinen enthält ein Abbildungssystem eine Anregungsquelle und ein Nachweisgerät. Die Anregungsquelle regt die Signal erzeugende Gruppe an, die an das Konjugat gebunden ist, und das Nachweisgerät erfasst das Signal, das von der angeregten Signal erzeugenden Gruppe abgegeben wird.

[0063] In einer typischen Abbildungssystemanalyse wird eine Untersuchungsprobe mit einem fluoreszenten Konjugat inkubiert, das sich spezifisch an bestimmte Zellen bindet, die in der Untersuchungsprobe vorhanden sein können. Die Inkubation findet über einen Zeitraum und bei einer Temperatur statt, die für die Bindung des Konjugats an spezifische Zellpopulationen, die in der Probe enthalten sind, förderlich sind. Die an das Konjugat gebundenen Zellen werden allgemein als gefärbt bezeichnet, und der Färbungsvorgang kann mehrmals, sequentiell oder gleichzeitig, mit mehreren Konjugaten durchgeführt werden, die Signale mit verschiedenen Wellenlängen aussenden. Nach Abschluss des Färbungsvorgangs kann die Probe mit einem Flusszytometer analysiert werden.

[0064] In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird eine Untersuchungsprobe mit einer Lösung eines primären Reagens inkubiert, das sich spezifisch an bestimmte Zellen bindet, die in der Untersuchungsprobe vorhanden sein können, um primäre Komplexe zu bilden. Das ungebundene Reagens, falls vorhanden, kann aus der Probe gewaschen werden, und ein fluoreszentes Konjugat, das für das gebundene primäre Reagens spezifisch ist, wird dann mit den primären Komplexen inkubiert. Das ungebundene Konjugat, falls vorhanden, kann dann von den primären Komplexen entfernt werden, und die Fluoreszenz im Zusammenhang mit den Zellen kann dann wie oben bestimmt werden. Es versteht sich, dass der Färbungsvorgang mehrmals mit primären Reagenzien wiederholt werden kann, die für verschiedene Zellmarker spezifisch sind, und mit Konjugaten, die bei denselben oder bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren. Es versteht sich natürlich auch, dass der Färbungsvorgang sequentiell oder in Chargenmanier durchgeführt werden kann, worin alle für die Zellfärbung erforderlichen Komponenten zu der Probe gegeben werden, bevor die Fluoreszenz im Zusammenhang mit den Zellen bestimmt wird.

[0065] In einer anderen alternativen Ausführungsform können das Konjugat und das Verfahren der vorliegenden Erfindung für die Verwendung in herkömmlichen Festphasen-Immunoassays, wie z.B. einem Sandwich-Assay, angepasst werden. Ein Sandwich-Immunoassay beinhaltet typischerweise das In-Kontakt-Bringen einer Untersuchungsprobe, von der vermutet wird, dass sie einen Analyten enthält, mit einem im Wesentlichen festen inerten Kunststoff-, Latex- oder Glaskügelchen oder -mikropartikel oder anderem Trägermaterial, das mit einem spezifischen Bindungsglied beschichtet wurde, das ein Bindungspaar mit dem Analyten bildet. Das mit dem Bindungsglied beschichtete Trägermaterial wird allgemein als "Erfassungsreagens" bezeichnet. Nach Bindung des Analyten an das Trägermaterial wird die restliche Untersuchungsprobe vom Träger entfernt, und das an den Analyten gebundene Trägermaterial wird mit einem Konjugat behandelt, das allgemein ein zweites Bindungsglied umfasst, welches mit einer Signal erzeugenden Gruppe markiert ist. Das Konjugat wird an den Analyten gebunden, der an den Träger gebunden ist, und der feste Träger, an den das erste Bindungsglied, der Analyt und das Konjugat gebunden sind, wird von eventuellem ungebundenem Konjugat getrennt, typischerweise mit einem oder mehreren Waschschritten. Das von der Signal erzeugenden Gruppe durch entsprechende Anregung erzeugte Signal kann dann visuell oder stärker bevorzugt mit einem Instrument beobachtet werden, um das Vorhandensein oder die Menge eines Analyten in einer Untersuchungsprobe anzuzeigen. Es versteht sich natürlich, dass die Reihenfolge und Anzahl der Schritte, die durchgeführt werden, um solche Assays vorzunehmen, die hierin bereitgestellte Erfindung nicht einschränken sollen.

[0066] Automatisierte Systeme, die zur Durchführung von Sandwichassays, wie z. B. Microparticle Enzyme ImmunoAssays (MEIAs), geeignet sind, sind im Fachgebiet gut bekannt. Ein besonders bevorzugtes und handelsübliches automatisiertes Instrument, das eingesetzt werden kann, um das hierin bereitgestellte Verfahren durchzuführen, ist das IMx®-System, das bei Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, erhältlich ist. Protokolle für MEIAs, wie z. B. diejenigen, die vom Abbott IMx®-Instrument durchgeführt werden, sind im Fachgebiet bekannt und wurden in Fiore, M., u. a., Clin. Chem., 34/9:1726-1732 (1988) beschrieben. Ein exemplarisches Protokoll ist wie im Folgenden beschrieben. 100 µl einer Untersuchungsprobe werden in die Probenvertiefung einer IMx®-Reaktionskammer pipettiert. 30-50 µl der Probe und eine Anti-Analyt-beschichtete Mikropartikelsuspension werden dann in die Inkubationsvertiefung der Reaktionskammer pipettiert. Es folgt eine angemessene Inkubationszeit, welche die Bildung von Mikropartikel/Analyt-Komplexen ermöglicht. Die Komplexe werden dann auf die Glasfaser-Erfassungsmatrix der Reaktionskammer pipettiert, und das Konjugat, das einen Anti-Analyt-Antikörper, markiert mit einer Signal erzeugenden Gruppe, wie z. B. einem Fluorophor, umfasst, wird ebenfalls auf die Glasfasermatrix der Reaktionskammer pipettiert.

[0067] Mikropartikel/Analyt/Konjugat-Komplexe werden so gebildet und von der Glasfasermatrix eingefangen. Durch entsprechende Mittel kann die Signal erzeugende Gruppe angeregt und eine eventuell resultierende Fluoreszenz gemessen werden. Der Grad einer solchen Fluoreszenz hängt direkt mit der Menge an Analyt in der Untersuchungsprobe zusammen.

[0068] Die folgenden Beispiele werden bereitgestellt, um bei der Erläuterung der Erfindung zu helfen, und dienen nicht zur Einschränkung der Erfindung. Alle Reagenzien und Ausrüstungsgegenstände, die zur Durchführung der Beispiele notwendig sind, sind im Handel erhältlich und dem Fachmann gut bekannt.

Beispiel 1

Bestimmung einer optimalen Beladungskonzentration für Fluorescein auf Polyacrylamidhydrazidpolymer

[0069] Polyacrylamidhydrazidpolymer (180.000 MW, 160 Hydrazide/Polymer) wurde von der Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., bezogen. Sieben Lösungen des Polymers wurden hergestellt, die alle 10 mg Polymer

($5{,}55 \times 10^{-5}$ mmol, $8{,}89 \times 10^{-3}$ mmol Hydrazide) enthielten, aufgelöst in 2,0 ml von PBS (0,1N Natriumphosphat, 0,1N NaCl) mit pH 7,0. Eine 6,0 mg/ml-Stammlösung von 5',6'-Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimidaktivem Ester (Signal erzeugende Gruppe – erhältlich bei Molecular Probes, Eugene, Oregon) in DMF wurde hergestellt und in folgenden Konzentrationen zu den Polymerlösungen gegeben: 5%, 10%, 15%, 25%, 35%, 75% und 90% der gesamten molaren Menge reaktiver Hydrazide am Polyacrylamidhydrazidpolymer. Die Mengen an Fluorescein und DMF, die verwendet wurden, um das Fluorescein aufzulösen, sind unten in Tabelle 1 dargestellt.

[0070] Jede Aliquote der Signal erzeugenden Gruppe wurde dann zu einer Polymerlösung gegeben. Währenddessen wurden die Polymerlösungen gerührt, und die resultierenden Lösungen wurden bei Raumtemperatur im Dunkeln ungefähr 12 Stunden lang gerührt.

[0071] Nach der Mischungsphase wurde jede der sieben Lösungen mit Sephadex® 100-300 µ Maschen-Gel (erhältlich bei Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) in einer Säule von 1,8 cm × 30cm gereinigt. Die Polyfluoresceinpolymere wurden aus der Säule mit destilliertem Wasser eluiert, und Fraktionen von 4,0 ml wurden währenddessen aufgefangen.

[0072] Die Reinheit jeder Fraktion aus jeder Lösung wurde durch Normalphasen-Dünnschichtchromatographie (DC) unter Verwendung von 90/10 $CHCl_3/CH_3OH$ als Eluent ermittelt. Die DC zeigte, dass die ersten gesammelten Fraktionen Verbindungen mit geringem Molekulargewicht enthielten, gefolgt von Fraktionen, die Verbindungen mit hohem Molekulargewicht enthielten. Die Fraktionen, die Verbindungen mit hohem Molekulargewicht enthielten, wurden kombiniert, bis die Fraktionen begannen, einen R_f-Wert von mehr als 0,05-0,1 aufzuweisen (wie durch eine tragbare UV-Lampe mit hoher Wellenlänge gezeigt wurde).

[0073] Die kombinierten Fraktionen wurden mit einem Amicon® Centiprep-30-Eindickapparat (Amicon Inc., Danvers, Ma.), ausgestattet mit einer 30.000 Molekulargewicht cut-off-Membran, auf 4,87 mg/ml konzentriert. Der Eindickapparat rotierte 3 Stunden lang mit 3000 U/min.

[0074] Die konzentrierten Fraktionen wurden dann mit Sephadex® G-25-Gel in einer Säule von 1,8 cm × 30 cm erneut gereinigt und wie oben eluiert. Die resultierenden Fraktionen wurden auf Reinheit überprüft, kombiniert und konzentriert wie oben beschrieben.

[0075] Das Verfahren ergab sieben Lösungen von gereinigtem Polyfluoresceinpolymer, die mit verschiedenen Konzentrationen der Signal erzeugenden Gruppe beladen worden waren. Diese polymeren Lösungen wurden dann auf ihre Fähigkeit zu fluoreszieren mit einem Fluoreszenz-Spektralphotometer getestet. Die Ergebnisse der Fluoreszenztests sind in der Tabelle 1 dargestellt, welche die angestrebte Beladungskonzentration und die dazugehörigen Fluoreszenzwerte zeigt. Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, steigt die Fluoreszenz an, bis die Beladungskonzentration von 90% erreicht ist. Bei einer angestrebten Beladung von 90% beginnt eine Löschung aufzutreten, und der Fluoreszenzwert fällt ab. Somit ist eine angestrebte Beladung von 75% optimal und wurde verwendet, um eine präparative Menge von Polyacrylamidhydrazidpolyfluorescein herzustellen.

Tabelle 1

Angestrebte Beladung (%)	Fluoreszein (mg)	DMF (µl)	Relative Fluoreszenz
5	0,20	34	40
10	0,41	68	157
15	0,61	102	300
25	1,02	169	417
35	1,42	237	529
75	3,05	470	650
90	3,67	610	640

Beispiel 2

Synthese von optimalem Polyacrylamidhydrazidpolyfluoresceinpolymer

[0076] Polyacrylamidhydrazidpolymer (180.000 MW, 160 Hydrazide/Polymer) wurde von der Sigma Chemical Company bezogen. Das Polymer (50, 0 mg, 2, 8×10^{-4} mmol Polymer, 4, 4×10^{-2} mmol Hydrazide) wurde durch magnetisch induziertes Rühren über ungefähr 7 Stunden in 10,0 ml PBS mit pH 7,0 aufgelöst. Dann wurden 15,2 mg ($3{,}3 \times 10^{-2}$ mmol) von 5',6'-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimid-aktivem Ester (erhältlich bei Molecular Probes), der in 500 µl DMF aufgelöst worden war, zu der gerührten Lösung des Polymers gegeben. Die resultierende Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln ungefähr 12 Stunden lang gerührt.

[0077] Nach dem Mischen wurde die Reaktionslösung über eine Sephadex® G-25-Säule (2,5 cm × 50 cm) mit einer Maschengröße von 100-300 µ platziert und mit destilliertem/deionisiertem Wasser eluiert. Während das Reaktionsgemisch mit 2,0 ml/Minute durch die Säule lief, wurden Fraktionen von ungefähr 400 Tropfen (oder ungefähr 14 ml) aufgefangen. Die Reinheit jeder Fraktion wurde durch Normalphasen-DC unter Verwendung von 90/10 $CHCl_3/CH_3OH$ als Eluent getestet. Die DC zeigte, dass die ersten aufgefangenen Fraktionen Verbindungen mit hohem Molekulargewicht enthielten und dass spätere Fraktionen Verbindungen mit niedrigerem Molekulargewicht enthielten. Die Fraktionen, die Verbindungen mit hohem Molekulargewicht enthielten, wurden kombiniert, bis sie begannen, einen R_f-Wert von mehr als 0,05-0,1 aufzuweisen. Die kombinierten Fraktionen wurden mit Hilfe eines Centiprep-30-Eindickapparates mit einem Molekulargewicht-Cut Off von 30.000 auf ein Volumen von 10,0 ml konzentriert. Der Centiprep-30-Eindickapparat, der die kombinierten Fraktionen enthielt, wurde mit einer Geschwindigkeit von 3.000 U/min ungefähr 3 Stunden lang bei einer Temperatur von zwischen 15-30°C zentrifugiert.

[0078] Die konzentrierten Fraktionen wurden dann mit einer Sephadex® G-25-Säule (2,5 cm × 50 cm) wie oben erneut gereinigt. Die resultierenden Fraktionen wurden auf Reinheit getestet und auf der Grundlage der DC-Ergebnisse und der Tests mit der tragbaren UV-Lampe mit hoher Wellenlänge wie oben angegeben kombiniert. Akzeptable Fraktionen wurden kombiniert, und das Polymermaterial wurde mit einem Amicon® Centiprep-30-Eindickapparat wie oben beschrieben aufgesättigt.

[0079] Ein Test, um die Konzentration des Polymermaterials zu bestimmen, wurde durchgeführt durch Entfernen von fünf 2 ml-Proben und Entfernen des Lösungsmittels aus jeder Probe in vacuo mit Hilfe eines Rotationsverdampfers. Restliches Wasser wurde aus jeder Probe mit Hilfe eines Hochvakuumsystems entfernt, das mit einem Trockeneis/Isopropanol-Sammelgefäß ausgestattet war. Die resultierenden Proben von rotem Pulver wurden dann zur Bestimmung der Konzentration des Polymers in mg/ml gewogen.

[0080] Um eine Schätzung zu erhalten, wie viele Fluoresceine tatsächlich auf das Polymer geladen wurden, wurden Standardkurven für das Carboxyfluoresceinpolymer und einen Carboxyfluoresceinstandard (von denen jedes in einem PBS mit pH 8,0 vorlag) erstellt. Die Kurven wurden erstellt durch Bestimmung der Absorption (bei 1 = 490 nm) des Standards und des Polymers bei mehreren verschiedenen Konzentrationen. Da die Neigungen (ε) solcher Kurven für den molaren Absorptionskoeffizienten einer einzelnen Molekülspezies (d.h. eines freien Cumarins oder eines einzelnen fluoreszenten Polymers) steht, wurde das Verhältnis der Neigungen benutzt, um die Anzahl an das Polymer gebundener Cumarine zu bestimmen. Unter gleichen Bedingungen wurde ein e von 1.459.000 mol^{-1} für das Polymer bestimmt, und ein e von 36.500 mol^{-1} wurde für das freie Carboxyfluorescein bestimmt. So wurde ermittelt, dass die Substitution von Carboxyfluorescein am Polymer 40/Polymer betrug.

[0081] Fluoreszenzäquivalenz wurde ebenfalls für das Polymer bestimmt durch Vergleichen der Fluoreszenzemission des Polymers mit der Fluoreszenzemission des freien Fluoresceins. Es wurde festgestellt, dass die Fluoreszenzäquivalenz des Polymers 14 Carboxyfluoresceine/Polymer betrug, basierend auf einer Anregung 1 von 490 nm und einer Emission 1 von 520 nm.

Beispiel 3

Synthese von Polyacrylamid-Hydrazid-Polycascadeblue-Polymer

[0082] Der optimale Prozentsatz zur Beladung von Polyacrylamidhydrazid mit Cascade blue wurde bestimmt wie in Beispiel 1 beschrieben. Es wurde festgestellt, dass der optimale angestrebte Beladungsprozentsatz 72% der verfügbaren Hydrazide betrug. Um mit Hilfe von Cascade blue ein optimales fluoreszentes Polymer zu erzeugen, wurde Cascade blue-Acylazid (erhältlich bei Molecular Probes) durch das folgende Verfahren mit

Polyacrylamidhydrazid zur Reaktion gebracht.

[0083] Polyacrylamidhydrazidpolymer (180.000 MW, 160 Hydrazide/Polymer) wurde von der Sigma Chemical Company bezogen. Das Polymer (20, 0 mg, 1, 1×10^{-9} mmol Polymer, 1, 8×10^{-2} mmol Hydrazide) wurde durch magnetisch induziertes Rühren über einen Zeitraum von ungefähr 7 Stunden in 4,0 ml PBS mit pH 7,0 aufgelöst. Dann wurden 12,0 mg ($1,3 \times 10^{-2}$ mmol) Cascade blue-Acylazid (erhältlich bei Molecular Probes, Eugene, Oregon) in 400 µl DMSO aufgelöst, bevor sie zur gerührten Lösung des Polymers gegeben wurden. Die resultierende Lösung wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln 12 Stunden lang gerührt.

[0084] Nach dem Mischen wurde die Reaktionslösung über eine Sephadex®-G-25-Säule (2,5 cm × 50 cm) mit einer Maschengröße von 100-300 µ platziert und mit destilliertem/deionisiertem Wasser eluiert. Während das Reaktionsgemisch mit 2,0 ml/Minute durch die Säule lief, wurden Fraktionen von ungefähr 400 Tropfen (oder ungefähr 14 ml) aufgefangen. Die Reinheit jeder Fraktion wurde durch Normalphasen-DC unter Verwendung von 90/10 $CHCl_3/CH_3OH$ als Eluent bewertet. Wie in Beispiel 2 wurden die Fraktionen, die hochmolekulargewichtige Verbindungen enthielten, kombiniert, bis die Fraktionen einen R_f-Wert von mehr als 0,05-0,1 aufzuweisen begannen. Die kombinierten Fraktionen wurden mit einem Amicon® Centriprep-30-Eindickapparat, der einen Cutoff von 30.000 hatte, auf ein Volumen von l0,0 ml konzentriert. Der Eindickapparat, der die kombinierten Fraktionen enthielt, wurde mit einer Geschwindigkeit von 3.000 U/min ungefähr 3 Stunden lang bei einer Temperatur von zwischen ungefähr 15-30°C zentrifugiert.

[0085] Die konzentrierten Fraktionen wurden dann mit einer Sephadex® G-25-Säule (2,5 cm × 50 cm) wie oben erneut gereinigt. Die resultierenden Fraktionen wurden auf Reinheit getestet und auf der Grundlage der Ergebnisse der DC und der Tests mit der tragbaren UV-Lampe mit hoher Wellenlänge wie oben angegeben kombiniert. Akzeptable Fraktionen wurden kombiniert, und das Polymermaterial wurde dann mit einem Amicon® Centriprep-30-Eindickapparat wie oben beschrieben auf gesättigt.

[0086] Ein Test zur Konzentration des Polymermaterials wurde durchgeführt durch Entfernen von fünf 2 ml-Proben und Entfernen des Lösungsmittels aus jeder Probe in vacuo mit Hilfe eines Rotationsverdampfers. Restliches Wasser wurde aus jeder Probe mit einem Hochvakuumsystem entfernt, das mit einem Trockeneis/Isopropanol-Sammelgefäß ausgestattet war. Die resultierenden Proben von blauem Pulver wurden dann gewogen, um die Konzentration des Polymers in mg/ml zu bestimmen.

[0087] Auf dieselbe Art wie in Beispiel 2 ausgeführt wurde die geschätzte Anzahl von Cascade blue-Molekülen, mit denen das Polymer beladen wurde, bestimmt. Da jedoch Cascade blue bei 1=365 nm absorbiert, wurden die Standardkurven mit einem 1=365 nm erstellt. Unter identischen Bedingungen wurde ein e von 460.000 mol^{-1} für das fluoreszente Polymer bestimmt, und ein e von 19.200 mol^{-1} wurde für den Cascade blue-Standard bestimmt. So wurde ermittelt, dass die Anzahl von Farbstoffen, mit denen das Polymer beladen wurde, 24 pro Polymer betrug.

Beispiel 4

Synthese von Polyacrylamidhydrazidpolyaminomethylcumarin

[0088] Das folgende Verfahren wurde angewandt, um ein fluoreszentes Polymer mit einer Äquivalentfluoreszenz von ungefähr 22 Aminomethylcumarinen pro Polymer herzustellen.

[0089] Das in diesem Beispiel verwendete Polyacrylamidhydrazidpolymer (180.000 MW, 160 Hydrazide/Polymer) wurde von der Sigma Chemical Co. bezogen, und der 7-Amino-4-methylcumarin-3-Essigsäure, succinimidylester wurde von Molecular Probes bezogen.

[0090] Das Polymer (100 mg, 5, 6×10^{-4} mmol, 8, 8×10^{-2} mmol Hydrazide) wurde durch magnetisch induziertes Rühren über ungefähr 7 Stunden in 10,0 ml PBS mit pH 7,0 aufgelöst. Das Aminomethylcumarin-N-hydroxysuccinimid (14,68 mg oder $7,1 \times 10^{-2}$ mmol, aufgelöst in 600 µl DMF) wurde zu der gerührten Lösung von aufgelöstem Polymer gegeben, und die resultierende Lösung wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln 12 Stunden lang gerührt.

[0091] Eine erste Reinigung wurde durchgeführt durch Beladen einer Sephadex® G-25-Säule (2,5 cm × 50 cm) mit 100-300 µ Maschengröße mit der obigen Lösung und Eluieren des Polymers mit destilliertem/deionisiertem Wasser. Fraktionen von ungefähr 14 ml wurden gesammelt und durch Normalphasen-DC unter Verwendung von 90/10 $CHCl_3/CH_3OH$ als Eluent auf Reinheit getestet. Wie in den obigen Beispielen wurden die

ersten Farbreagens-Fraktionen mit hohem Molekulargewicht kombiniert, bis die Fraktionen begannen, bei Untersuchung mit einer tragbaren UV-Lampe mit hoher Wellenlänge einen R_f-Wert von mehr als 0,05-0,1 aufzuweisen. Die kombinierten Fraktionen wurden auf ein Volumen von 20,0 ml konzentriert, indem sie in einen Centiprep-30-Eindickapparat (Amicon®) gegeben wurden, der einen 30.000 Molekulargewicht Cutoff hatte, und indem er bei 3.000 U/min 3 Stunden lang geschleudert wurde.

[0092] Die konzentrierten Fraktionen wurden mit einer Sephadex® G-25-Säule (2,5 cm × 50 cm) erneut gereinigt, und die resultierenden Fraktionen wurden mit DC wie oben beschrieben auf Reinheit getestet. Die akzeptablen Fraktionen wurden kombiniert, und die kombinierten Fraktionen wurden aufgesättigt wie oben angegeben.

[0093] Die Konzentration der konzentrierten Fraktionen wurde dann ermittelt, und ein Test wurde durchgeführt, um die Anzahl an das Polymer gebundener Aminomethylcumarine zu bestimmen. Um die Konzentration der konzentrierten Fraktionen zu ermitteln, wurden Proben (4 × 2 ml) der konzentrierten Fraktionen entnommen, und das Lösungsmittel wurde aus ihnen in vacuo mit einem Rotationsverdampfer entfernt. Das restliche Wasser wurde mit einem Hochvakuumsystem entfernt, das mit einem Trockeneis/Isopropanol-Sammelgefäß ausgestattet war. Die getrockneten Proben wurden dann gewogen, und die Konzentration (mg/ml) des Polymers wurde bestimmt.

[0094] Unter Anwendung des in Beispiel 2 beschriebenen Verfahrens wurde die geschätzte Anzahl an Aminomethylcumarinmolekülen, mit denen das Polymer beladen wurde, ermittelt. Weil jedoch Aminomethylcumarin bei 1=325 nm absorbiert, wurden die Standardkurven mit einem 1=325 nm erstellt. Unter identischen Bedingungen wurde ein e von 91,882 mol^{-1} für das fluoreszente Polymer bestimmt, und ein e von 803,5 mol^{-1} wurde für den Aminomethylcumarin-Standard bestimmt. So wurde ermittelt, dass die Anzahl auf das Polymer geladener Farbstoffe 114 pro Polymer betrug.

[0095] Fluoreszenzäquivalenz wurde ebenfalls für das Polymer ermittelt durch einen Vergleich der Fluoreszenzemission des Polymers mit der Fluoreszenzemission des freien Cumarins. Es wurde ermittelt, dass die Fluoreszenzäquivalenz des Polymers 22,4 Aminomethylcumarine/Polymer betrug, basierend auf einer Anregung 1 von 325 und einer Emission 1 von 450.

Beispiel 5

Synthese von Polyacrylamidhydrazidpolyhydroxymethylcumarin

[0096] Das folgende Verfahren wurde angewandt, um ein fluoreszentes Polymer mit einer äquivalenten Fluoreszenz von ungefähr 40 Hydroxycumarinen pro Polymer herzustellen.

[0097] Das in diesem Beispiel verwendete Polyacrylamidhydrazidpolymer (180.000 MW, 160 Hydrazide pro Polymer) wurde von der Sigma Chemical Co. bezogen, und der 7-Hydroxy-4-methylcumarin-3-essigsäure, succinimidylester wurde von Molecular Probes bezogen.

[0098] Das Polymer (50 mg, 2, 8 × 10^{-4} mmol, 4, 4 × 10^{-2} mmol Hydrazide) wurde durch magnetisch induziertes Rühren über einen Zeitraum von ungefähr 7 Stunden in 10,0 ml PBS mit pH 7,0 aufgelöst. Das Hydroxycumarin-N-hydroxysuccinimid (6,9 mg oder 2,1 × 10^{-2} mmol, aufgelöst in 500 µ1 DMF) wurde zu der Rührlösung aus aufgelöstem Polymer gegeben, und die resultierende Lösung wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln 12 Stunden lang gerührt.

[0099] Eine erste Reinigung wurde durchgeführt durch Beladen einer Sephadex® G-25-Säule (2,5 cm × 50 cm) mit 100-300 µ Maschengröße mit der obigen Lösung und Eluieren des Polymers mit destilliertem/deionisiertem Wasser. Fraktionen von ungefähr 14 ml wurden aufgefangen und durch Normalphasen-DC unter Verwendung von 90/10 $CHCl_3/CH_3OH$ als Eluent auf Reinheit getestet. Wie in den obigen Beispielen wurden die ersten Farbreagens-Fraktionen mit hohem Molekulargewicht kombiniert, bis sie bei der Untersuchung mit einer tragbaren UV-Lampe mit hoher Wellenlänge begannen, einen R_f-Wert von mehr als 0,05-0,1 aufzuweisen. Die kombinierten Fraktionen wurden auf ein Volumen von 20,0 ml konzentriert, indem sie in einen Centiprep-30-Eindickapparat (Amicon®) gegeben wurden, der einen 30.000 Molekulargewicht Cutoff hatte, und indem er bei 3.000 U/min 3 Stunden lang geschleudert wurde.

[0100] Die konzentrierten Fraktionen wurden unter Verwendung einer Sephadex® G-25-Säule (2,5 cm × 50 cm) erneut gereinigt, und die resultierenden Fraktionen wurden mit DC wie oben auf Reinheit überprüft. Die

akzeptablen Fraktionen wurden kombiniert, und die kombinierten Fraktionen wurden wie oben aufgesättigt.

[0101] Dann wurde die Konzentration der konzentrierten Fraktionen bestimmt, und ein Test wurde durchgeführt, um die Anzahl an das Polymer gebundener Aminomethylcumarine zu bestimmen. Um die Konzentration der konzentrierten Fraktionen zu ermitteln, wurden Proben (4 × 2 ml) der konzentrierten Fraktionen entnommen, und das Lösungsmittel wurde aus ihnen mit einem Rotationsverdampfer in vacuo entfernt. Das restliche Wasser wurde durch ein Hochvakuumsystem entfernt, das mit einem Trockeneis/Isopropanol-Sammelgefäß ausgestattet war. Die getrockneten Proben wurden dann gewogen, und die Konzentration (mg/ml) des Polymers wurde bestimmt.

[0102] Unter Anwendung des in Beispiel 4 angeführten Verfahrens wurde die geschätzte Anzahl von Aminomethylcumarinmolekülen, mit denen das Polymer beladen wurde, bestimmt. Unter identischen Bedingungen wurde ein e von 209,820 mol^{-1} für das fluoreszente Polymer ermittelt, und ein e von 2158 mol^{-1} wurde für den Hydroxymethylcumarin-Standard ermittelt. So wurde ermittelt, dass die Anzahl auf das Polymer geladener Farbstoffe 100 pro Polymer betrug.

[0103] Fluoreszenzäquivalenz wurde ebenfalls für das Polymer bestimmt durch einen Vergleich der Fluoreszenzemission des Polymers mit der Fluoreszenzemission des freien Cumarins. Es wurde ermittelt, dass die Fluoreszenzäquivalenz des Polymers 40 Hydroxymethylcumarine/Polymer betrug, basierend auf einer Anregung 1 von 325 und einer Emission 1 von 450.

Beispiel 6

Bindung von Polyacrylamidhydrazidpolyfluorescein an IgG

[0104] Als Erstes wurde der Kohlenhydratbereich eines monoklonalen Maus-Antikörpers unter Anwendung des folgenden Verfahrens mit Natriumperiodat oxidiert.

[0105] Anti-Dansyl-Antikörper (2,05 mg in 1,0 ml TEA-Puffer, 50 mM Triethanolamin, 160 mM NaCl, pH 8,0) wurde in eine bernsteinfarbene Phiole platziert. Dann wurde Natriumperiodat (100 µl einer 200 mM-Lösung in TEA-Puffer) in die Phiole gegeben, und die resultierende Mischung wurde bei 2-8°C l Stunde lang statisch inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit einer Fließrate von 1-2 ml pro Minute über eine Sephadex® G-25-Säule (1 cm × 45 cm, Maschengröße 100-300 µ) gegeben und mit einem Acetatpuffer (0,1 M Natriumacetat, 0,1M NaCl) mit pH 5,5 eluiert. Während die Säule eluiert wurde, wurde der Eluent von der Säule bei A_{280} überwacht, und Fraktionen von 1ml wurden aufgefangen. Das Elutionsprofil wies zwei Spitzen auf, und die Fraktionen von der ersten Spitze, die einen A_{280} von mehr als 0,3 hatten, wurden kombiniert. Die kombinierten Fraktionen wurden dann mit einem Amicon® Centricon-30-Mikrokonzentrator, ausgestattet mit einer 30.000 Molekulargewicht Cutoff-Membran, auf 2,35 mg/ml (0,8 ml) konzentriert, um 1,88 mg des gereinigten oxidierten Antikörpers zu ergeben. Der gereinigte Antikörper wurde bei 2-8°C gehalten und direkt nach der Oxidation verwendet.

[0106] Die Menge an Polymer, die zur Konjugation des Antikörpers verwendet wurde, wurde berechnet aus den Molekulargewichten des Antikörpers (180.000) und des Polymers (geschätzt auf 218.000 auf der Grundlage eines UV-Tests zur Fluorescein-Substitution am Polymer). In diesem Beispiel wurden 4,5 mg des fluoreszenten Polymers aus Beispiel 2 in 1,0 ml Acetatpuffer (0,1 M Natriumacetat, 0,1 M NaCl) mit pH 4,5 zur ursprünglichen Konzentration verdünnt, um eine 4,5mg/ml-Lösung aus Polyacrylamidhydrazidpolyfluorescein zu bilden. Diese Lösung wurde dann zu 0, 8 ml der 2, 35 mg/ml-Lösung aus oxidiertem Anti-Dansyl-Antikörper gegeben, um eine Konjugationsmischung zu bilden, die über Nacht bei einer Temperatur von zwischen ungefähr 2-8°C leicht geschüttelt wurde.

[0107] Nachdem die Konjugation des Antikörpers mit dem fluoreszenten Polymer abgeschlossen war, wurde die Konjugationsmischung über eine Säule aus Sephacryl® 5-300-Gel (Pharmacia LKB, Sollentuna, Schweden) mit einer Größe von 1cm × 45 cm gegeben. Der konjugierte Antikörper wurde aus der Säule mit PBS mit einem pH von 8,0 bei einer Fließrate von 1-2 ml pro Minute eluiert. Der Eluent aus der Säule wurde in Fraktionen von 3ml aufgefangen. Der Eluent wurde auch bei A_{280} überwacht, und das Elutionsprofil zeigte, dass zwei Spitzen aus der Säule eluiert wurden. Fraktionen von der ersten Spitze, die einen A_{280} von mehr als 0,3 hatten, wurden gesammelt und in einen Pool getan.

Beispiel 7

Synthese von 6-β-Cyclodextrinmonoaldehyd aus Cyclodextrin

[0108] Das Monotosylatderivat von β-Cyclodextrin wurde hergestellt gemäß dem Verfahren von Petter, R. C., u. a., J. Am. Chem. Soc., 112, 3360-3868, 1990. Das Monotosylatderivat wurde gereinigt durch präparative RP-HPLC unter Anwendung einer Gradienttrennung bei 40,0 ml/min auf einer radial komprimierbaren Rainin Dynamax™-Säule. Der Gradient, der für diese Trennung verwendet wurde, war wie folgt: ein linearer Gradient von 90/10 H_2O/CH_3OH bis 30 Minuten, gefolgt von einem Anstieg auf 0/100 H_2O/CH_3OH in 35 Minuten gesamter abgelaufener Zeit. Das Monotosylat eluierte mit diesem Gradienten bei 20,7 Minuten mit UV-Nachweis bei einem λ von 230 nm. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, und das restliche Wasser wurde aus dem Feststoff entfernt, indem er über Nacht unter Hochvakuum getan wurde.

[0109] Das resultierende Monotosylat (1,0 g, 0,77 mmol) wurde dann in 20,0 ml DMSO aufgelöst. Dann wurde Hunigs Base (Diisopropylethylamin, 0,5 Äquivalente des Monotosylats, 0,060 g, 0,38 mmol) zu der Lösung aus Monotosylat und DMSO gegeben, und das resultierende Reaktionsgemisch wurde ungefähr 72 Stunden lang bei einer Temperatur von zwischen 70-80°C erhitzt. Während der Erhitzung wurde das Reaktionsgemisch unter Stickstoff getan. Nach der Erhitzung wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur gekühlt, und das Rohprodukt wurde mit 200 ml Aceton ausgefällt. Das Reaktionsgemisch wurde dann auf 0°C gekühlt und der resultierende Feststoff durch Vakuumfiltration isoliert.

[0110] Der isolierte Feststoff wurde in einer Menge von Aceton mit Raumtemperatur erneut suspendiert, die zur Rekristallisation beim Abkühlen auf 0°C geeignet war. Der resultierende Niederschlag wurde erneut durch Vakuumfiltration rückgewonnen. Der Resuspensions- und Rückgewinnungsvorgang wurde zweimal wiederholt.

[0111] Das endgültige 6-β-Cyclodextrinmonoaldehydprodukt hatte folgende Eigenschaften: PDMS Obs. 1155,5 Kalk. 1155,9 ($M+ Na^+$); ESIMS Obs. 1133, 9 Kalk. 1134, 0 ($M+H^+$); ^1H NMR (300 MHz) d_6-DMSO δ 9,7 (s, 1H), 5,75 (breit m, 14H), 4,85 (m, 7H), 4,48 (m, 6H), 3,6 (m, 14H), 3,4 (breit m, 7H); 13C NMR (125,6 MHz) rohes Reaktionsgemisch in d_6-DMSO, ausgenommen Tosylat-Peaks. d_6-DMSO δ 198,2, 1201,9, 87,5, 82,5, 81,7, 81,5, 73,072,7, 72,4 68,9, 59,9, 59,6; TLC (1/1 Gemisch aus 10:8:3 n-Butanol/Ethanol/Wasser und 12:3:4 Butanon/Methanol/Essigsäure); R_f 0,5; IR (cm^{-1}).

Beispiel 8

Synthese von Polyacrylamidhydrazidpolycyclodextrinpolymer

[0112] 6-β-Cyclodextrinmonoaldehyd wurde synthetisch hergestellt wie oben in Beispiel 5 beschrieben. Polyacrylamidhydrazidpolymer (MW 180.000, 160 Hydrazide/Polymer) wurde von der Sigma Chemical Company bezogen. Das Polymer (5,0 mg, $2,28 \times 10^{-5}$ mmol Polymer, $3,65 \times 10^{-3}$ mmol Hydrazide) wurde in 1,0 ml PBS mit pH 7,0 aufgelöst. Eine andere Lösung, die 5,0 mg 6-β-Cyclodextrinmonoaldehyd ($4,44 \times 10^{-3}$ mmol) umfasste, aufgelöst in 150 ml DMSO, wurde dann zu der gerührten Polymerlösung gegeben. Die resultierende Lösung wurde dann 2 Stunden lang auf 70°C erhitzt. Nach dem Erhitzen wurde die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen gelassen, bevor sie über eine Sephadex® G-25-Gelfiltrationssäule gegeben wurde. PBS (pH 7,0) wurde verwendet, um das Polycyclodextrinpolyacrylamidhydrazidpolymer aus der Säule zu eluieren. Während das Polymer aus der Säule eluiert wurde, wurden Fraktionen von 1,0 ml aufgefangen und mit dem Phenol/Schwefelsäure-Verfahren, das in Analytical Chemistry, Vol 28, 350-386 (März 1956) offenbart ist, auf den Kohlenhydratgehalt analysiert. Mit Hilfe der gewonnenen Daten wurde ein Gelfiltrationsprofil für die resultierenden Fraktionen von polymerem β-Cyclodextrin erstellt. Dieses Gelfiltrationsprofil wurde dann mit einem Gelfiltrationsprofil für monomeres β-Cyclodextrin verglichen. Der Vergleich zeigte, dass der größte Teil des polymeren β-Cyclodextrins in den Fraktionen 7-11 eluiert worden war, während der größte Teil des monomeren β-Cyclodextrins in den Fraktionen 9-16 eluiert worden war. Die Fraktionen 7-10 wurden kombiniert und mit Hilfe eines Amicon®-Mikrokonzentrators, ausgestattet mit einem 30.000 MW-Filter, konzentriert. Das Konzentrat wurde mit PBS mit einem pH von 7,0 verdünnt und dreimal aufgesättigt, um monomeres β-Cyclodextrinmonoaldehyd zu entfernen. Das Fehlen von monomerem β-Cyclodextrinmonoaldehyd im Filtrat wurde durch das Phenol/Schwefelsäure-Verfahren der Kohlenhydratanalyse festgestellt.

Beispiel 9

Synthese von Polylysinpolycyclodextrinpolymer

[0113] 6-β-Cyclodextrinmonoaldehyd wurde synthetisiert wie oben in Beispiel 5 beschrieben. Das Polylysinpolymer (138.000 MW, 1000 Lysine/Polymer, 5, 0 mg, 3, 6×10^{-5} mmol Polymer, 3, 6×10^{-2} mmol Amin) wird in 2,0 ml PBS mit einem pH von 7,0 aufgelöst. Eine andere Lösung, die 40,8 mg (3,6 × 10^{-2} mmol) 6-β-Cyclodextrinmonoaldehyd, aufgelöst in 500 ml DMSO, umfasst, wird dann zu der gerührten Polymerlösung gegeben. Die resultierende Lösung wird dann 3 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Mischungszeit von 3 Stunden wird eine Lösung aus $NaCNBH_3$ (3,6 mmol), aufgelöst in 1,0 ml PBS mit einem pH von 7,0, zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Nach zweistündigem Mischen bei Raumtemperatur wird die Mischung über eine Sephadex® G-25-Gelfiltrationssäule gegeben. PBS (pH 7,0) wird verwendet, um die Säule zu eluieren, und Fraktionen von 1,0 ml werden aufgefangen. Die Fraktionen werden mit dem Phenol/Schwefelsäure-Verfahren auf den Kohlenhydratgehalt hin analysiert. Anhand der gewonnenen Daten wird ein Gelfiltrationsprofil für das resultierende polymere β-Cyclodextrin erstellt. Dieses Gelfiltrationsprofil wird dann mit einem Gelfiltrationsprofil für monomeres β-Cyclodextrin verglichen. Diejenigen Fraktionen, die polymeres β-Cyclodextrin enthalten, werden mit Hilfe eines Amicon®-Mikrokonzentrators, ausgestattet mit einer 30.000 MW-Filtermembran, konzentriert. Das Konzentrat wird verdünnt (mit pH 7,0, 0,1 N Natriumphosphat, 0,1 N NaCl) und erneut konzentriert, und zwar dreimal oder bis kein monomeres β-Cyclodextrin im Filtrat zu beobachten ist, wie durch das Phenol/Schwefelsäure-Verfahren der Kohlenhydratanalyse angezeigt.

Beispiel 10

Bindung von Cyclodextrinmonoaldehyden an aminierte feste Phasen

[0114] Durch stöchiometrische Modifikationen von Beispiel 7 können Cyclodextrinmonoaldehyde an aminierte feste Phasen gebunden werden. Zusätzlich wird beim Derivatisieren fester Phasen Beispiel 7 weiter modifiziert durch Trennen des monomeren Cyclodextrinmonoaldehyds von der derivatisierten festen Phase durch Dekantieren, Waschen oder Zentrifugieren, im Gegensatz zur Ausschlusstrennung, die in Beispiel 7 angewandt wird.

Beispiel 11

Bindung von Polyacrylamidhydrazidpolycyclodextrin an Antikörper

[0115] Das Polyacrylamidhydrazidpolycyclodextrinpolymer wird mit demselben Protokoll, das in Beispiel 4 angewandt wird, an einen Antikörper gebunden.

Beispiel 12

Einführen Signal erzeugender Gruppen in die hydrophoben Hohlräume von Polycyclodextrinpolymeren, die an ein spezifisches Bindungsglied gebunden sind

[0116] Polyacrylamidhydrazidpolycyclodextrin wird hergestellt wie in Beispiel 6 beschrieben. Eine 10^{-10} M- bis 10^{-6} M-Lösung aus Fluorescein in PBS mit einem pH von 7,0 wird zu einer 10^{-10} M- bis 10^{-6} M-Lösung des in Beispiel 6 gewonnenen Polymers gegeben. Diese Lösung wird dann ungefähr 2 Stunden lang bei Umgebungstemperatur gemischt. Nach dem Mischen wird die Lösung über eine Sephadex® G-25-Gelfiltrationssäule gegeben, unter Verwendung von PBS mit einem pH von 7,0, um das fluoreszente Konjugat mit einer Fließrate von zwischen 1-2 ml/min aus der Säule zu eluieren. Während das Konjugat aus der Säule eluiert wird, werden Fraktionen von zwischen 1-4 ml aufgefangen. Zusätzlich wird der A_{280} des Eluenten genommen, wenn das Konjugat aus der Säule eluiert wird, und Fraktionen aus der ersten Spitze (Peak), die aus der Säule eluiert wurde, die einen A_{280}-Wert von mehr als 0,3 haben, werden kombiniert.

Beispiel 13

Vergleich zwischen handelsüblichem fluoreszentem Konjugat und Polyacrylamidhydrazidpolyfluorescein-Konjugat

[0117] In diesem Beispiel wurde ein Flusszytometrie-Format verwendet, um einen Vergleich zwischen den Signalen, die von zurzeit erhältlichen handelsüblichen Konjugaten erzeugt werden, und dem hierin bereitgestell-

ten Konjugat durchzuführen. Der Vergleich wurde zwischen Konjugaten vorgenommen, die spezifisch für die Lymphozyten-Oberflächenmarker CD2, CD3 und LEU4 sind. Die handelsüblichen Konjugate waren FITC-Konjugate, die entweder direkt spezifisch für die Zelloberflächenmarker waren, oder AVIDIN FITC-Konjugate, die spezifisch für BIOTIN primäre Reagenzien waren, welche spezifisch für einen der Zelloberflächenmarker waren. Alle der BIOTIN primären Reagenzien und das CD2-FITC sind kommerziell bei Coulter Inc. (Hialeah, Fla.) erhältlich, während die AVIDIN FITC-Konjugate bei Becton-Dickinson Inc. erhältlich sind. Die Polyacrylamidhydrazidpolyfluorescein-Konjugate (PAH-F) wurden hergestellt gemäß den Verfahren, die in Beispiel 2 und Beispiel 6 beschrieben sind. Weitere Reagenzien, die in diesem Beispiel verwendet wurden, schlossen PBS mit einem pH von 7,0 ein, bei dem 0,1% Natriumazid und 1,0% Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) zu der obigen Formulierung gegeben wurden, und Ammoniumchlorid-Lysierlösung. Die Lysierlösung wurde hergestellt wie folgt:

Bestandteil	Menge (g)
NH_4Cl	8,26
$KHCO_3$	1,0
NaEDTA	0,037

[0118] Die oben aufgeführten Bestandteile wurden in 1,0 Liter destilliertem Wasser aufgelöst, und die resultierende Lösung wurde mit Hepes-Puffer, der im Handel bei Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., erhältlich ist, auf einen pH von 7,3 eingestellt. Vor der Verwendung wurde die Lysierlösung auf 41°C erwärmt.

Protokoll

[0119] Die Röhrchen 1-5, gezeigt unten in Tabelle 2, dienten als Kontrollröhrchen für dieses Beispiel und enthielten, außer Röhrchen 1, welches ausschließlich modifiziertes PBS enthielt, das angeführte primäre oder sekundäre Reagens in modifiziertem PBS-Puffer. Die primären Reagenzien oder, in dem Fall, in dem ein Konjugat direkt für einen Zelloberflächenmarker spezifisch war (Röhrchen 6), die sekundären Reagenzien, wurden in den Mengen, die unten in Tabelle 2 dargestellt sind, in die Röhrchen 6-15 gegeben. 200µl frisches Vollblut wurden dann in jedes der Röhrchen, markiert mit 6-15, gegeben, bevor die Inhalte jedes Röhrchens leicht verwirbelt und bei Raumtemperatur im Dunkeln 15 Minuten lang inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden alle Röhrchen außer Röhrchen 6 einmal in 3 ml des modifizierten PBS gewaschen. Die gewaschenen Röhrchen wurden dann 3 Minuten lang bei 500 × Schwerkraft zentrifugiert; dann wurde der Überstand von diesen Röhrchen aspiriert, und das Zellenpellet wurde im modifizierten PBS erneut suspendiert.

[0120] Die sekundären Reagenzien (gezeigt in Tabelle 2) wurden in ihre jeweiligen Röhrchen gegeben, welche die erneut suspendierten Pellets enthielten, bevor sie wie oben verwirbelt und inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Röhrchen gemäß dem folgenden Protokoll mit der Ammoniumchlorid-Lysierlösung behandelt.

1. 3,0 ml der Lysierlösung wurden in jedes Röhrchen gegeben
2. Jedes Röhrchen wurde mit einer Einwegpipette gründlich durchmischt
3. Jedes Röhrchen wurde 7 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert
4. Die Röhrchen wurden 3 Minuten lang bei 2000 U/min zentrifugiert
5. Alle Überstände, ausgenommen 100 µl von jedem Röhrchen, wurden aspiriert
6. Die Röhrchen wurden verwirbelt, um die Pellets erneut zu suspendieren
7. 3,0 ml PBS mit 0,1% Natriumazid und 1,0% BSA wurden dann zu den erneut suspendierten Pellets gegeben
8. Die Schritte 4-7 wurden wiederholt
9. 0,5 ml PBS mit 0,1% Natriumazid und 1,0% BSA wurden dann zu den erneut suspendierten Pellets gegeben

[0121] Das Röhrchen Nr. 6 wurde ebenfalls gemäß dem oben dargelegten Protokoll mit der Ammoniumchlorid-Lysierlösung behandelt.

[0122] Die Inhalte jedes Röhrchens wurden mit einem fluoreszenzaktivierten Facscan II-Zellsortierer, erhältlich bei Becton-Dickinson Inc., analysiert. Die Instrumenteneinstellungen wurden für die Visualisierung auf Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten auf vordere Gegenseite-Streuparameter (forward verse side scatter parameters) optimiert. "Quick Cal"-Kügelchen (erhältlich bei Flow Cytometry Standards Corporation, Durham, N.C.) wurden nach Anweisung des dazugehörigen Software-Programms zur Erstellung einer Eichkurve angewandt. Der Prozentsatz fluoreszenter Ereignisse im Histogramm wurde für jedes Röhrchen mit Hilfe der

drei Lichtstreuungsschlitze (light scatter gates) ermittelt. Die MESF-Werte wurden mit der von der "Quick Cal"-Software erzeugten Gleichung berechnet.

Ergebnisse

[0123] Die bei den Röhrchen 6-15 erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Zunächst ist, da das Molekulargewicht eines PAH-F-IgG-Konjugats ungefähr 300.000 beträgt und das Molekulargewicht eines FITC-IgG-Konjugats ungefähr 150.000 beträgt, 1 µg des PAH-F-Konjugats auf Molekulargewichtsbasis gleich ungefähr 2 µg des FITC-Konjugats. Wie durch die Daten in Tabelle 3 verdeutlicht wird, kann das hochgradig fluoreszente Konjugat der vorliegenden Erfindung ein Signal aussenden, das ungefähr 35-mal stärker ist als bei handelsüblichen Konjugaten. Zusätzlich ist die Bindungsspezifität des PAH-F-Konjugats mit derjenigen des FITC-Konjugats vergleichbar. Die Signale im Zusammenhang mit den Granulozyten und Monozyten für die FITC-Konjugate und die PAH-F-Konjugate sind relativ gleichwertig und dienen somit als Beweis, dass das PAH-F-Konjugat mindestens so spezifisch ist wie das FITC-Konjugat.

Tabelle 2

Tube #	Primäres Reagens	Sekundäres Reagens
1	modifiziertes PBS	---
2	5 ug Polybiotin	---
3	---	2µg Avidin-FITC
4	---	4µg Avidin-FITC
5	---	4µg antibiotin-PAH-F
6	---	2.5µg CD2-FITC
7	5ug CD2-BIOTIN	2µg AVIDIN-FITC
8	5ug CD2-BIOTIN	4µg AVIDIN-FITC
9	5ug CD2-BIOTIN	4µg ANTIBIO-PAH-F
10	5ug CD2-BIOTIN(T11)	6µg mono anti-BIO-PAH-F
11	5 ug CD2-BIOTIN(T11)	4µg mono anti-BIO-PAH-F
12	5 ug CD2-BIOTIN(T11)	2µg mono anti-BIO-PAH-F
13	5ug LEU4-BIOTIN	4µg Avidin-FITC
14	5ug LEU4-BIOTIN	6µg mono-anti-BIO-PAH-F
15	5ug LEU4-BIOTIN	6µg poly-anti-BIO-PAH-F

Beispiel 14

Fluoreszenzverstärkung bei polymerem Fluorescein durch β-Cyclodextrin

[0124] Zwei Mengen (Lots) von Polyacrylamidhydrazidpolyfluorescein wurden durch das in Beispiel 2 erläuterte Verfahren hergestellt. Bei der ersten Charge wurde Polyacrylamidhydrazidpolymer (180.000 MW, 160 Hydrazide/Polymer) mit 5',6'-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimid-aktivem Ester bei einem angestrebten Beladungsprozentsatz von 10% beladen. Bei der zweiten Menge wurde Polyacrylamidhydrazidpolymer (180.000 MW, 160 Hydrazide/Polymer) mit 5',6'-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimid-aktivem Ester bei einem angestrebten Beladungsprozentsatz von 75% beladen.

[0125] Die tatsächliche Anzahl von Fluoresceinen, mit denen die zwei Mengen (Lots) beladen worden waren, wurde dann ermittelt durch einen Vergleich der Fluoreszenz der Polymere mit der Fluoreszenz von Carboxy-

fluorescein wie oben. Die beobachtete Anzahl an Fluoresceinen wurde dann durch UV-Spektroskopie wie in Beispiel 2 bestimmt. Aus diesen Daten wurde der Löschungsgrad für jedes Polymer ermittelt. Zum Beispiel wurde ermittelt, dass bei Lot 1 die Anzahl der Fluoresceine pro Polymer 11 betrug, und die beobachtete Anzahl an Fluoresceinen betrug 5,5. Somit wurden die Fluoresceine an dem Polymer-Lot 1 zu ungefähr 50% gelöscht.

[0126] β-Cyclodextrin wurde dann zu den Polymerlösungen gegeben, so dass es in einer Konzentration von 0,01 M vorhanden war. Nach der Zugabe von Cyclodextrin wurde der Anzahl der Fluoresceine, die an den Polymeren beobachtet wurden, erneut bestimmt. Durch das Hinzufügen von β-Cyclodextrin zu den zwei Lots von fluoreszentem Polymer erhöhte sich die beobachtete Anzahl an Fluoresceinen. Die Ergebnisse dieses Beispiels sind in Tabelle 4 dargestellt, worin A der molare Absorptionskoeffizient ist, B die Anzahl von Fluoresceinen pro Polymer ist, C die beobachtete Anzahl von Fluoresceinen ist, D die Anzahl von Fluoresceinen ist, die nach der Zugabe von β-Cyclodextrin beobachtet wurden, und E der Grad der vom 0,01M β-Cyclodextrin gelieferten Verstärkung ist.

Tabelle 3

Probe	A	B	C	D	E
Carboxy-fluoreszein-hydrazid	36.000	---	---	---	---
Lot 1	400.000	11	5,5	8,8	1,5
Lot 2	1.490.000	40	14	28,8	1,95

Beispiel 15

Vergleich von Polyfluorescein und Polyfluorescein-β-Cyclodextrinaldehydcopolymer

[0127] Polyacrylamidhydrazidpolyfluorescein wurde synthetisiert wie in Beispiel 2. Eine 3,0 ml-Portion des optimierten Polyacrylamidhydrazidpolyfluorescein-Polymermaterials wurde mit 0,1 N Phosphatpuffer bei pH 5,5 mit 0,1 N NaCl auf 0,7mg/ml verdünnt. 3,0 ml des verdünnten Polymers wurden entfernt, um später als Kontrolle zu dienen, und 3,0 mg β-Cyclodextrinaldehyd, hergestellt wie in Beispiel 7, wurden zu der restlichen verdünnten Polymerlösung gegeben. Das feste β-Cyclodextrinaldehyd wurde in der Polymerlösung aufgelöst, bevor die neu gebildete Lösung über Nacht bei Umgebungstemperatur inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurden die Kontroll- und Polymer/β-Cyclodextrin-Lösungen auf separaten Sephadex® G-25-Ausschlusssäulen gereinigt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 45 Tropfen pro Röhrchen unter Verwendung von pH 7,0, 0,1 N Phosphat, 0,1 N NaCl-Puffer als Elutionspuffer. Die Anfangs-Polymerkonzentrationen wurden auf 0,26 mg/ml geschätzt. Auf der Grundlage von genauen Volumenablesungen und Verdünnungen von 1 zu 10 der Kontroll- und Polymer/β-Cyclodextrin-Röhrchen wurden Polymerkonzentrationen von 0,026 mg/ml oder $1{,}44 \times 10^{-7}$ M erzielt.

[0128] Anschließend wurde ein Vergleich zwischen den Fluoreszenzintensitäten der Kontrollprobe (nicht-Cyclodextrinderivatisiertes Polyacrylamidhydrazidpolyfluorescein) und der Untersuchungsprobe (Cyclodextrinaldehyd-derivatisiertes Polyacrylamidhydrazidpolyfluorescein) durchgeführt. Im Speziellen wurden die zwei Lösungen bei 488 nm angeregt, und die Fluoreszenz wurde bei 525 nm abgelesen. Die Fluoreszenz-Ergebnisse für die beiden Lösungen sind unten in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4

Polymer	Fluoreszenz
Polyacrylamidhydrazidpolyfluoreszein	108
Polyacrylamidhydrazidpolyfluoreszein-polyβ-cyclodextrin	138

[0129] Es wurde ein Fluoreszenzverhältnis von 138:108 in relativer Fluoreszenzintensität für die Untersu-

chungsprobe gegenüber der Kontrolle beobachtet. Somit betrug die Fluoreszenz des Experimenten-Polymers 1,3-mal mehr als diejenige des Kontrollpolymers. Dies entspricht einer 30%-igen Verstärkung des Signals für das Experimenten-Polymer, was einer Äquivalente von 20 Fluoresceinen pro Polymer gegenüber einer Äquivalente von 15 Fluoresceinen pro Polymer entspricht (wie zuvor in TABELLE 4, LOT 2, Spalte C dargestellt). Die Verstärkung ist in diesem Fall auf das kovalent gebundene β-Cyclodextrin und nicht auf das nicht kovalent gebundene β-Cyclodextrin zurückzuführen.

Patentansprüche

1. Ein fluoreszierendes Konjugat, das folgendes umfasst: ein spezifisches Bindungsglied, das kovalent an mindestens ein fluoreszierendes Polymer gebunden ist, worin das fluoreszierende Polymer Folgendes umfasst: ein Hauptketten-Polymer, Cyclodextrine gewählt aus der Gruppe bestehend aus α-Cyclodextrin, β-Cyclodextrin, γ-Cyclodextrin und Kombinationen davon, und fluoreszierende Gruppen, worin die Cyclodextrine kovalent an das Hauptketten-Polymer gebunden sind, und die fluoreszierenden Gruppen kovalent an das Hauptketten-Polymer gebunden oder in den Cyclodextrinen aufgenommen sind, oder worin die fluoreszierenden Gruppen kovalent an das Hauptketten-Polymer gebunden sind und die Cyclodextrine einen Komplex mit den fluoreszierenden Gruppen bilden und worin die fluoreszierenden Gruppen entlang des Polymers beabstandet sind, um ein von den fluoreszierenden Gruppen erzeugtes Signal zu maximieren und einen Löschungseffekt zu minimieren.

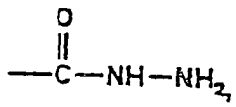
2. Das Konjugat von Anspruch 1, worin das Hauptketten-Polymer den Rest eines funktionellen Aminpolymers umfasst.

3. Ein Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins und/oder der Menge eines Analyten in einer Testprobe, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:
a. Bilden von Konjugat/Analyt-Komplexen durch In-Kontakt-Bringen der Testprobe mit einem fluoreszierenden Konjugat gemäß Anspruch 1, um eine Mischung zu bilden.
b. Trennen der Konjugat/Analyt-Komplexe von der Mischung und
c. Detektieren eines messbaren fluoreszierenden Signals, worin das Vorhandensein und/oder die Menge des fluoreszierenden Signals mit der Menge des Analyten in der Testprobe in Relation steht.

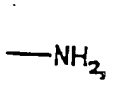
4. Das Verfahren von Anspruch 3, worin das Hauptketten-Polymer den Rest eines funktionellen Aminpolymers umfasst.

5. Das Verfahren von Anspruch 4, worin das funktionelle Aminpolymer Reste von Amin-Funktionalitäten trägt, die gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:

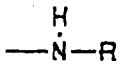
a)



b)



c)



worin R gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
C_1-C_3-Alkyl, 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 $(CHOH)_4CH_2OH$ und
(d) Kombinationen davon.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

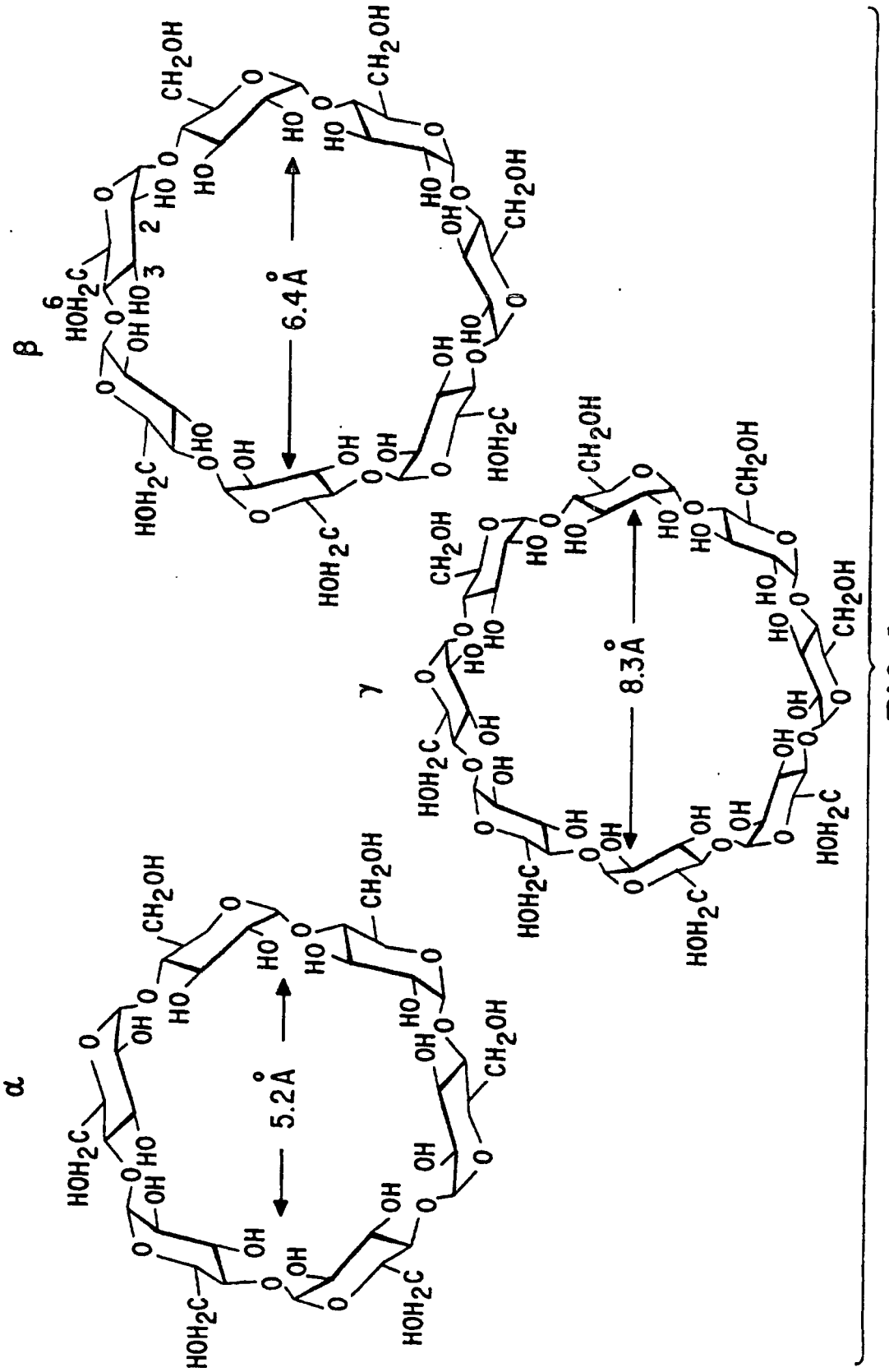


FIG. 1