



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 37 298 T2** 2007.06.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 961 783 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 298.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/13803**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 937 122.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/007744**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.08.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **18.02.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.12.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **24.01.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.06.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C08B 37/00 (2006.01)**

C08B 37/02 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(73) Patentinhaber:

Dade Behring Marburg GmbH, 35041 Marburg, DE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, ES, FR, GB, IT

(74) Vertreter:

**Zounek, Plate, Schweitzer Patentanwaltskanzlei,
65203 Wiesbaden**

(72) Erfinder:

**MEHTA, Harshvardhan, Fremont, CA 94555, US;
SINGH, Rajendra, San Jose, CA 95135, US**

(54) Bezeichnung: **KONJUGATE VON POLYSACCHARIDEN UND BIOMOLEKÜLEN**

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

Gegenstand der Erfindung

[0001] In den Bereichen der Medizin und der klinischen Chemie werden viele Studien und Bestimmungen physiologisch reaktiver Spezies, wie beispielsweise Zellen, Proteine, Enzyme, Kofaktoren, Nukleinsäuren, Substrate, Antigene, Antikörper, usw., ausgeführt durch Konjugate, welche spezifische Bindungspaarglieder oder Labels oder ähnliches umfassen. Verschiedene Assaytechniken, die das Verbinden der spezifischen Bindungspaarglieder umfassen, sind bekannt. Diese Assaytechniken umfassen gewöhnlich auch ein Label, welches im Erkennungsteil des Assays benutzt wird.

[0002] Polysaccharide, insbesondere Dextran, wurden an spezifische Bindungspaarglieder angebunden, um die Stabilität des spezifischen Bindungspaargliedes zu erhöhen. Das Anbinden dieser Glieder an Polysaccharide erhöht ebenfalls die Sperrigkeit dieser Moleküle, was deren Effektivität in Assays, die spezifische Bindungspaarglieder umfassen, steigern kann, indem mit einer Bindung an komplementäre spezifische Bindungspaarglieder eingegriffen wird. Des weiteren ermöglichen diese Konjugate, wenn sie auf einer Oberfläche vorhanden sind, spezifische Bindung eines komplementären spezifischen Bindungspaargliedes an die Oberfläche mit höchst reduzierter nicht-spezifischer Bindung.

[0003] Aminodextran oder Carboxymethyldextran wurden üblicherweise benutzt, um Konjugate an spezifische Bindungspaarglieder herzustellen. Die Anbindung des Dextrans beispielsweise an ein Protein kann dann durch die Bildung eines Amids ausgeführt werden. Jedoch haben Aminodextrane und Carboxymethyldextrane eine Ladung, die oft neutralisiert werden muss, um nicht-spezifische Bindung zu kontrollieren. Eine solche Neutralisation ist ohne die gleichzeitige Derivatisierung des Konjugatbiomoleküls schwer durchzuführen.

[0004] Ein alternatives Verfahren des Anbindens beinhaltet zuerst das partielle Oxidieren des Polysaccharids mit Perjodat um Aldehydgruppen einzuführen. Die Anbindung an aminhaltige Liganden und Rezeptoren kann dann durch reduktive Aminierung durchgeführt werden. Obwohl Dextrane, die partiell oxidiert sind, nicht geladen sind, ist die Oxidierung nur schwer genau zu kontrollieren und die Produkte weisen eine wesentlich reduzierte Hydrolysestabilität auf. Ein Verfahren zur Einführung von Aldehydgruppen auf Polysaccharide, das die Stabilität nicht beeinträchtigt, das leichter ausgeführt werden kann, und welches leichtes Anbinden erlaubt, wird daher benötigt.

Beschreibung des Standes der Technik

[0005] Lauritzen, et al., diskutieren die dot-Immunbindung und Immunblotting von Pikogramm- und Nanogrammengen kleiner Peptide auf aktivierter Nitrozellulose in Journal of Immunological Methods (1990) 131:257–267.

[0006] Wirksame Immunadsorbentien basierend auf Agarose-Polyaldehyd-Mikrokugeln: Synthese und Affinitätschromatographie werden in Margel, et al., Analytical Biochemistry (1983) 128:342–350 offenbart.

[0007] U.S. Patent Nr. 4,264,766 (Fischer) offenbart immunologische Diagnosereagenzien.

[0008] U.S. Patent Nr. 4,801,504 (Burdick, et al.) diskutiert Fluoreszenzlabels, die eine Polysaccharidbindung an polymerische Partikel haben.

[0009] Polysaccharidmodifizierte Immunglobuline, die ein reduziertes Immunpotential oder verbesserte Pharmakokinetik haben, werden in dem Europäischen Patent Nr. 0 315 456 B1 diskutiert.

[0010] Wang, et al., beschreiben eine einfache Synthese eines aldehydischen Analogons eines Plättchenaktivierungsfaktors und dessen Verwendung in der Herstellung von spezifischen Antikörpern in Chemistry and Physics of Lipids (1990) 55:265–273.

[0011] Das Dokument "A new approach to aldehydic dextrans" E. Dellacherie et al, Polymer Bulletin, Vol. 31, Nr. 2, 2. Aug. 1993, DE, S.145–149, XP000385692 offenbart Dextrane, deren Hydroxylgruppen im Wesentlichen durch eine Gruppe ersetzt werden, die eine Verknüpfungsgruppe und eine entständige Aldehydgruppe enthält (Strukturen III–V auf Seite 146). Das aldehydmodifizierte Dextran ist mit Proteinen, Antikörpern und Enzymen verknüpft, aber es ist kein Alkylierungssagens erwähnt, welches mit einem Polysaccharid reagiert, wodurch das Alkylierungssagens eine Olefingruppe hat und als Funktionalität ein Epoxid oder eine Alkygruppe,

welche eine Abgangsgruppe umfasst.

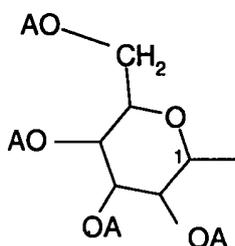
[0012] Das Dokument "A new approach to dextran derivatives with pendent aldehyde groups" D. Callant et al, Reactive Polymers, Vol. 8, 1988, Amsterdam, S.129–136, XP002048123 beschreibt lösliche Dextranderivate, die Aldehydseitengruppen (aldehyde side groups) enthalten, welche erhalten wurden durch Umsetzung eines Dextran-4-Nitrophenylcarbonatesters mit 2,3-Dihydroxypropylamin und anschließender selektiver Perjodatoxidation der anhängenden Diolgruppen. Das modifizierte Dextran kann zur Immobilisierung von Enzymen, z. B. Polypeptiden, verwendet werden. Dieses Dokument offenbart kein Verfahren zur Anbindung eines Polysaccharids an ein Polypeptid durch Umsetzung des Polysaccharids mit einem Alkylierungsmittel, welches eine Olefingruppe hat, das Umwandeln der Olefingruppe zu einer aminreaktiven Funktionalität, welche mit einer Aminfunktionalität auf dem Polypeptid reagiert, um ein an das Polypeptid gebundenes Polysaccharid herzustellen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anbindung eines Polysaccharids an ein Polypeptid, umfassend:

- (a) die Umsetzung des Polysaccharids mit einem Alkylierungsmittel, welches eine Funktionalität hat, die mit einer Hydroxygruppe des Polysaccharids reagiert, wodurch ein alkyliertes Polysaccharid geformt wird, worin das Alkylierungsmittel eine Olefingruppe hat und worin das Alkylierungsmittel als Funktionalität ein Epoxid oder eine Alkylgruppe hat, welche eine Abgangsgruppe umfasst,
- (b) das Behandeln des alkylierten Polysaccharids, um die Olefingruppe zu einer aminreaktiven Funktionalität umzuwandeln und
- (c) die Umsetzung der aminreaktiven Funktionalität mit einer Aminfunktionalität am Polypeptid, um ein an das Polypeptid gebundenes Polysaccharid herzustellen.

[0014] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren, worin das Polysaccharid eine Verbindung ist, die ein Polymer umfasst, welches eine Folge von Monosaccharidwiederholungseinheiten hat, von denen jede unabhängig ausgewählt wird aus Monosaccharideinheiten der Formel:



worin eines der As eine Bindung an den C1 glykosidischen Kohlenstoff einer anderen der Einheiten ist und die anderen As unabhängig aus der Gruppe bestehend aus H und QL ausgewählt werden, worin L eine Verknüpfungsgruppe ist, die O und Q verknüpft, und Q ist C(Z)=D, worin D gleich CR¹R² ist, worin R¹ und R² unabhängig voneinander H, Alkyl oder Aryl sind, und Z ist H oder C(Y)=O, worin Y gleich R³, OR³ oder NR³R⁴ ist, worin R³ und R⁴ unabhängig voneinander H, Alkyl oder Aryl sind, und worin ein jedes von L, R¹, R², R³ und R⁴ zusammengefasst werden kann, um einen Ring zu formen, mit der Maßgabe, dass mindestens zwei der As im Polymer QL sind. Ebenso inbegriffen sind Verbindungen, die durch das Reagieren des oben genannten Polymers mit einem Bimolekül, wie beispielsweise einem Polypeptid, hergestellt werden.

BESCHREIBUNG DER SPEZIFISCHEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0015] Die vorliegende Erfindung bietet ein einfaches, kostengünstiges Verfahren zur Anbindung eines Makromoleküls an ein Polysaccharid zur Verwendung in einem Immunoassay. Aminfunktionalitäten, wie beispielsweise ein Aldehyd, werden in das Polysaccharid zur Verknüpfung an das Makromolekül eingeführt. Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass, im Gegensatz zu früheren Verfahren, die Anzahl der aminreaktiven Funktionalitäten, die in das Polysaccharid eingeführt werden, kontrolliert werden kann.

[0016] Vor der weiteren Beschreibung der spezifischen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden einige Begriffe definiert.

[0017] Monosaccharid – ein Kohlenhydrat, das nicht in einfachere Verbindungen, wie beispielsweise ein Aldehydalkohol oder ein Ketonalkohol hydrolysiert werden kann, z.B. eine Hexose oder eine Pentose.

[0018] Polysaccharid – ein Kohlenhydrat, das drei oder mehr Monosaccharideinheiten enthält; das Polysaccharid kann in die einfacheren Monosaccharideinheiten hydrolysiert werden. Beispiele für Polysaccharide zur Veranschaulichung, nicht aber im Sinne einer Beschränkung, sind Dextran, Stärke, Glycogen, Polyribose.

[0019] Dextran – ein Polysaccharid, welches aus linearen 1–6 verknüpften (98%) Glukoseeinheiten besteht; eine polymerisierte Glukose.

[0020] Alkyl – eine einwertige verzweigte oder unverzweigte Gruppe, welche von einem aliphatischen Kohlenwasserstoff durch das Entfernen eines H-Atoms abgeleitet wird ist; beinhaltet sowohl niederes wie höheres Alkyl.

[0021] Niederes Alkyl – Alkyl, welches 1 bis 5 Kohlenstoffatome enthält, wie beispielsweise Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Isopropyl, Isobutyl, Pentyl, Isopentyl usw..

[0022] Höheres Alkyl – Alkyl, welches mehr als 6 Kohlenstoffatome enthält, normalerweise 6 bis 20 Kohlenstoffatome, wie beispielsweise Hexyl, Heptyl, Oktyl usw..

[0023] Alkyliden – eine zweiwertige organische Gruppe, welche aus einem aliphatischen Kohlenwasserstoff, abgeleitet wurde, wie beispielsweise Ethyliden, wobei 2 Wasserstoffatome vom gleichen Kohlenstoffatom abgespalten sind.

[0024] Aryl – eine organische Gruppe, welche aus einem aromatischen Kohlenwasserstoff abgeleitet ist, indem ein Atom entfernt wird und die einen oder mehrere aromatische Ringe, normalerweise einen bis zu vier aromatische Ringe, enthält, wie beispielsweise Phenyl (aus Benzol), Naphthyl (aus Naphthalin) usw., beispielsweise Phenyl, Naphthyl, Phenanthryl.

[0025] Aralkyl – eine organische Gruppe, welche eine Alkylgruppe hat, an die eine Arylgruppe gebunden ist, beispielsweise Benzyl, Phenethyl, 3-Phenylpropyl, 1-Naphthylethyl usw..

[0026] Alkoxy – eine Alkylgruppe, welche durch ein Sauerstoffatom an einen Molekülrest gebunden ist, beispielsweise Methoxy, Ethoxy usw..

[0027] Aryloxy – eine Arylgruppe, welche durch ein Sauerstoffatom an einen Molekülrest gebunden, beispielsweise Phenoxy, Naphthoxy usw., z.B. m-Methoxyphenyl Aralkoxy-eine Aralkylgruppe, welche durch ein Sauerstoffatom an einen Molekülrest gebunden ist, beispielsweise Benzoxo, 1-Naphthylethoxy usw..

[0028] Amin-reaktive Funktionalität – eine Funktionalität, welche mit einer Aminfunktionalität reaktiv ist, normalerweise aufgrund von Nukleophilie oder Basizität des Amins, wie beispielsweise ein Aldehyd, eine Alpha-Keto-Karbonsäure.

[0029] Ein Alkylierungsgagens, welches eine Funktionalität hat, die mit einer Hydroxylgruppe reagiert – eine Verbindung, die eine Funktionalität hat, welche mit einer Hydroxylgruppe reagiert, normalerweise aufgrund von Nukleophilie der neutralen oder ionisierten Hydroxylgruppe, wie beispielsweise eine Oxiranylgruppe, eine Alkylgruppe, die eine Abgangsgruppe umfasst, wie beispielsweise Halogenid (Bromid, Chlorid, Jodid); Arylsulfonate; Alkylsulfonate; Arylsulfate; Alkylsulfate; Tosylate; Acrylsäurederivate wie beispielsweise Akrylamid; Vinylsulfone.

[0030] Biomolekül – ein Polypeptid, wie beispielsweise Avidin, Streptavidin, Protein A, Protein G, Antikörper usw..

[0031] Konjugat – ein Molekül, umfassend zwei oder mehr Unterstrukturen, die aneinander gebunden sind, normalerweise durch eine Verknüpfungsgruppe, um eine einzige Struktur zu bilden.

[0032] Verknüpfungsgruppe – ein Teil einer Struktur, der zwei oder mehr Unterstrukturen verbindet. Die Verknüpfungsgruppe kann von einer Bindung bis zu einer Kette von 1 bis 30 oder mehr Atomen reichen, normalerweise von ca. 1 bis 20 Atomen, bevorzugt 1 bis 10 Atomen, jedes unabhängig ausgewählt aus der Gruppe, die normalerweise aus Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff und Phosphor besteht, normalerweise aus Kohlenstoff und Sauerstoff. Die Anzahl der Heteroatome in der Verbindungsgruppe reicht normalerweise von ca. 0 bis 8, gewöhnlich von ca. 1 bis 6, vorzugsweise 2 bis 4. Die Anzahl der Atome in der Kette wird durch das Zählen der Anzahl der Atome bestimmt, die nicht Wasserstoff oder andere einwertige Atome sind, entlang der

kürzesten Strecke zwischen den Unterstrukturen, die verbunden sind. Die Atome der Verknüpfungsgruppe können ersetzt werden durch Atome, die nicht Wasserstoff sind, wie beispielsweise Kohlenstoff, Sauerstoff und so weiter in der Form z. B. von Alkyl, Aryl, Aralkyl, Hydroxyl, Alkoxy, Aryloxy, Aralkoxy. In der Regel kann die Länge einer bestimmten Verknüpfungsgruppe beliebig ausgewählt werden, um die Synthese einfach zu gestalten, mit der Maßgabe, dass durch die Verknüpfungsgruppe eine möglichst geringe Beeinträchtigung der Fähigkeit der vorhandenen Polymere, an das Biomolekül anzubinden, verursacht wird.

[0033] Die Verknüpfungsgruppe kann aliphatisch oder aromatisch sein. Wenn Heteroatome vorhanden sind, ist Sauerstoff normalerweise als Oxy oder Oxo vorhanden, gebunden an Kohlenstoff, Schwefel, Stickstoff oder Phosphor; Schwefel ist als Thioether oder Thiono vorhanden; Stickstoff ist normalerweise vorhanden als Nitro, Nitroso oder Amino, normalerweise gebunden an Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel oder Phosphor; Phosphor wird an Kohlenstoff, Schwefel, Sauerstoff oder Stickstoff, gewöhnlich als Phosphonat und Phosphatmono- oder -diester, gebunden. Funktionalitäten, die in der Verknüpfungsgruppe vorhanden sind, können Ester, Thioester, Amide, Thioamide, Ether, Harnstoffe, Thioharnstoffe, Guanidine, Azo-Gruppen, Thioether, Karboxylate und so weiter beinhalten.

[0034] Beispiele, zur Veranschaulichung, nicht aber im Sinne einer Beschränkung, für verschiedenen Verknüpfungsgruppen, die in der vorliegenden Erfindung Anwendung finden, können in U.S. Patent Nr. 3,817,837 gefunden werden, insbesondere in Spalte 30, Zeile 69, bis Spalte 36, Zeile 10.

[0035] Bevorzugte Verknüpfungsgruppen beinhalten Alkylen, z. B. $(\text{CH}_2)_p$, worin p eine ganze Zahl im Bereich von 1 bis 10, bevorzugt 1 bis 5, ist, worin einer oder mehrere Wasserstoffe, gewöhnlich ein Wasserstoff, an einem oder mehreren der Kohlenstoffe, gewöhnlich einem, der Alkylene ersetzt werden kann durch OR^9 , worin R^9 H, Alkyl oder Aryl ist, z. B. Methylen, Ethylen, Propylen, Butylen, Pentylen, Hexylen, Phenylen, p-Benzylen und so weiter; Alkylenoxyalkylen, z. B. $(\text{CH}_2)_q\text{X}(\text{CH}_2)_r$, worin q und r gleich oder verschieden sind und ganze Zahlen im Bereich von 1 bis 5, bevorzugt 1 bis 3, sind und worin ein oder mehrere Wasserstoffe, gewöhnlich ein Wasserstoff, an einem oder beiden, gewöhnlich einem, der Alkylene ersetzt werden können durch OR^9 , worin R^9 H, Alkyl oder Aryl ist, bevorzugt H, z. B. Methylenoxymethylen, Methylenoxyethylen, Ethylenoxyethylen, 1-Methylenoxy-2-Hydroxyethylen und so weiter, und X unabhängig davon O oder S, bevorzugt O.

[0036] Glied eines spezifischen Bindungspaares ("SBP-Glied") – eines von zwei verschiedenen Molekülen, welches einen Bereich auf der Oberfläche oder in einer Vertiefung hat, das sich spezifisch anbindet und dadurch als komplementär mit einer bestimmten räumlichen und polaren Orientierung des anderen Moleküls definiert wird. Die Glieder des spezifischen Bindungspaares werden als Ligand und Rezeptor (Antiligand) bezeichnet. Diese werden gewöhnlich Glieder eines immunologischen Paares, wie beispielsweise Antigen-Antikörper, sein, obwohl andere spezifische Bindungspaare, wie beispielsweise Biotin-Avidin, Hormone-Hormonrezeptoren, Nukleinsäureduplexe, IgG-Protein A, Polynukleotidpaare, wie beispielsweise DNA-DNA, DNA-RNA, keine immunologischen Paare sind, aber in der Definition von SBP-Glied zum Zwecke der Beschreibung dieser Erfindung eingeschlossen sind.

[0037] Analyt – die Verbindung oder Zusammensetzung, die nachgewiesen werden soll. Der Analyt kann aus einem Glied eines spezifischen Bindungspaares (SBP) zusammengesetzt sein und kann ein Ligand sein, welcher gewöhnlich einwertig (monoepitopisch) ist, gewöhnlich haptisch, und ist eine einzelne Verbindung oder eine Vielzahl von Verbindungen, welche mindestens eine gemeinsames Epitop oder eine bestimmbar Stelle teilen.

[0038] Die monoepitopischen Ligand-Analyten haben gewöhnlich ein Molekulargewicht von ca. 100 bis 2000, häufiger ein Molekulargewicht von 125 bis 1000. Die Analyten schließen Wirkstoffe, Metabolite, Pestizide, Schadstoffe ein. Stellvertretende Analyte, als Beispiel, nicht aber im Sinne einer Beschränkung, umfassen (i) Alkaloide, wie beispielsweise Morphin-Alkaloide, welche Morphin, Kodein, Heroin, Dextromethorphan, deren Derivate und Metabolite einschließen; Kokainalkaloide, welche Kokain und Benzyl-Ecgonin, deren Derivate und Metabolite einschließen; Ergot-Alkaloide, welche die Diethylamide von Lysergsäure einschließen; Steroid-Alkaloide; Iminazoyl-Alkaloide; Chinazolin-Alkaloide; Isochinolin-Alkaloide; Chinolin-Alkaloide, welche Chinin und Chinidin einschließen; Diterpen-Alkaloide, deren Derivate und Metabolite; (ii) Steroide, beinhaltend Östrogene, Androgene, Andreokortikalisches Steroide, Gallensäure, herzstärkende Glykoside und Aglykone, welche Digoxin und Digoxigenin, Saponine und Sapogenine, deren Derivate und Metabolite einschließen; Steroidnachahmende Substanzen, wie beispielsweise Diethylstilbestrol; (iii) Laktame, die von 5 bis 6 ringförmige Glieder haben, welche die Barbiturate, z. B. Phenobarbital und Sekobarbital, Diphenylhydantoin, Primidon, Ethosuximid und deren Metabolite einschließen; (iv) Aminoalkylbenzole, mit Alkyl mit von 2 bis 3 Kohlenstoffatomen, welche die Amphetamine einschließen; Katecholamine, welche Ephedrin, L-Dopa, Epinephrin ein-

schließen; Narzein; Papaverin; und Metabolite der oben aufgeführten Substanzen; (v) Benzheterozyklen, welche Oxazepam, Chlorpromazin, Tegretol, deren Derivative und Metabolite einschließen, wobei die heterozyklischen Ringe, Azepine, Diazepine und Phenothiazine sind; (vi) Purine, welche Theophyllin, Koffein, deren Metabolite und Derivate einschließen; (vii) Wirkstoffe, die aus Marihuana abgeleitet sind, welche Cannabinol und Tetrahydrocannabinol einschließen; (viii) Hormone, wie beispielsweise Thyroxin, Cortisol, Trijodthyronin, Testosteron, Estradiol, Estron, Progesteron, Polypeptide, wie beispielsweise Angiotensin, LHRH und Immununterdrücker wie beispielsweise Zyklosporin, FK506, Mykophenolsäure (MPS) und so weiter; (ix) Vitamine, wie beispielsweise A, B, z. B. B12, C, D, E und K, Folsäure, Thiamin; (x) Prostaglandine, welche sich durch den Grad und die Lage der Hydroxylierung und Doppelbindung unterscheiden; (xi) Trizyklische Antidepressiva, welche Imipramin, Dismethylimipramin, Amitriptylin, Nortriptylin, Protriptylin, Trimipramin, Chlomipramin, Doxepin und Desmethyldoxepin einschließen; (xii) Anti-Neoplasmen, welche Methotrexat einschließen; (xiii) Antibiotika, welche Penizillin, Chloromycetin, Aktinomycetin, Tetrazyklin, Terramycin, die Metabolite und Derivate einschließen; (xiv) Nukleoside und Nukleotide, welche ATP, NAD, FMN, Adenosin, Guanosin, Thymidin und Zytidin mit deren entsprechenden Zucker- und Phosphatsubstituenten einschließen; (xv) diverse einzelne Wirkstoffe, welche Methadon, Meprobamat, Serotonin, Meperidin, Lidokain, Prokainamid, Acetylprokainamid, Propranolol, Griseofulvin, Valproinsäure, Butyrophenone, Antihistamine, Chloramphenicol, anticholinergische Wirkstoffe, wie beispielsweise Atropin, deren Metabolite und Derivate einschließen; (xvi) Metabolite in Bezug auf erkrankte Stadien schließen Spermin, Galaktose, Phenylpyruvinsäure und Porphyrin Typ 1 ein; (xvii) Aminoglykoside, wie beispielsweise Gentamizin, Kanamizin, Tobramycin und Amikazin; und (xviii) Pestizide, wie beispielsweise polyhalogenierte Biphenyle, Phosphatester, Thiophosphate, Karbamate, polyhalogenierte Sulfenamide, deren Metabolite und Derivate.

[0039] Polyvalente Analyte sind normalerweise Poly(Aminosäuren), z. B. Polypeptide und Proteine, Polysaccharide, Nukleinsäuren und Kombinationen davon. Solche Kombinationen schließen Bakterien, Viren, Chromosomen, Genen, Mitochondrien, Zellkernen, Zellmembranen ein. Größtenteils besitzen die polypeptischen Ligand-Analyten ein Molekulargewicht von mindestens ca. 5000, häufiger mindestens ca. 10000. In der Poly(Aminosäuren)-Kategorie haben die zu betrachtenden Poly(Aminosäuren) generell ein Molekulargewicht von ca. 5000 bis 5000000, häufiger von ca. 20000 bis 1000000; unter den in Frage kommenden Hormonen reichen die Molekulargewichte gewöhnlich von ca. 5000 bis 60000.

[0040] Eine große Auswahl an Proteinen kann als Familie der Proteine, die ähnliche strukturelle Eigenschaften haben, Proteine, die besondere biologische Funktionen haben, Proteine mit Bezug zu spezifischen Mikroorganismen, insbesondere krankheitserregende Mikroorganismen etc. in Betracht kommen. Solche Proteine schließen zum Beispiel Immunglobuline, Zytokine, Enzyme, Hormone, Krebsantigene, Nährstoffmarker, gewebespezifische Antigene, etc. ein. Solche Proteine schließen, zur Veranschaulichung, nicht aber im Sinne einer Beschränkung, Protamine, Histone, Albumine, Globuline, Skleroproteine, Phosphoproteine, Mukoproteine, Chromoproteine, Lipoproteine Nukleoproteine, Glykoproteine, T-Zellenrezeptoren, Proteoglykane, HLA, nicht klassifizierte Proteine, z. B. Somatotropin, Prolaktin, Insulin, Pepsin, Proteine, die in menschlichem Plasma vorkommen, Blutgerinnungsfaktoren, Proteinhormone, wie beispielsweise follicelstimulierendes Hormon, luteinisierendes Hormon, Luteotropin, Prolaktin, chorionisches Gonadotropin, Gewebeshormone, Zytokine, Krebsantigene, wie beispielsweise PSA, CEA, a-Fetoprotein, Säurephosphatase, CA19.9 und CA125, gewebespezifische Antigene, wie beispielsweise basische Phosphatase, Myoglobin, CPK-MB und Calcitonin, und Peptidhormone ein.

[0041] Andere in Frage kommende polymerische Materialien sind Mucopolysaccharide und Polysaccharide.

[0042] Bei den Rezeptoranalyten reichen die Molekulargewichte generell von 10000 bis 2×10^6 , häufiger von 10000 bis 10^6 . Bei Immunglobulinen, IgA, IgG, IgE und IgM reichen die Molekulargewichte generell von ca. 160000 bis ca. 10^6 . Enzyme reichen normalerweise von einem Molekulargewicht von ca. 10000 bis 1000000. Natürliche Rezeptoren haben eine große Variationsbreite, generell haben sie ein Molekulargewicht von mindestens ca. 25000 und können 10^6 oder ein höheres Molekulargewicht haben, einschließlich solche Materialien wie Avidin, DNA, RNA, thyroxinbindendes Globulin, thyroxinbindendes Prealbumin, Transkordin usw..

[0043] Der Begriff Analyt schließt des weiteren Oligonukleotid- und Polynukleotidanalyten, wie beispielsweise m-RNA, r-RNA, t-RNA, DNA, DNA-RNA-Duplexe usw. ein.

[0044] Der Analyt kann ein Molekül sein, das unmittelbar in einer Probe, wie beispielsweise biologischem Gewebe, einschließlich Körperflüssigkeiten, eines Wirts vorkommt. Die Probe kann unmittelbar untersucht werden oder kann vorbehandelt werden durch das Entfernen unerwünschter Materialien, um den Analyt leichter nachweisbar zu machen. Die Probe kann vorbehandelt werden, um Zellen abzutrennen oder zu lysieren; um

Proteine auszufällen, zu hydrolisieren oder zu denaturieren; um Lipide zu hydrolisieren; um den Analyten aufzulösen; oder ähnliches. Eine solche Vorbehandlung kann, ohne Beschränkung, einschließen: Zentrifugieren; Behandeln der Probe mit einem organischen Lösungsmittel, z. B. einem Alkohol, wie beispielsweise Methanol; und Behandlung mit Detergenzien. Die Probe kann in jedem geeigneten Medium angesetzt werden, das den Assay nicht beeinflusst. Ein wässriges Medium wird bevorzugt.

[0045] Der zu betrachtende Analyt kann durch das Ermitteln eines Agens bestimmt werden, das als Nachweis für den zu betrachtenden Analyt dient, wie beispielsweise ein spezifisches Bindungspaarglied komplementär zum zu betrachtenden Analyt, dessen Gegenwart nur dann ermittelt wird, wenn der betreffende Analyt in der Probe vorhanden ist. Folglich wird das Agens, das als Nachweis für den Analyt dient, zum Analyt, der in einem Assay ermittelt wird.

[0046] Das biologische Gewebe schließt Gewebeproben aus einem Organ oder anderem Körperteil eines Wirts, und Körperflüssigkeiten, zum Beispiel Urin, Vollblut, Plasma, Serum, Speichel, Sperma, Stuhl, Sputum, Hirn-Rückenmarksflüssigkeit, Tränen, Schleim ein. Die Probe ist vorzugsweise Plasma oder Serum.

[0047] Polynukleotid – eine Verbindung oder Zusammensetzung, die ein polymerisches Nukleotid ist, welches im natürlichen Zustand ca. 50 bis 500000 oder mehr Nukleotide hat und welches im isolierten Zustand ca. 15 bis 50000 oder mehr Nukleotide hat, gewöhnlich ca. 15 bis 20000 Nukleotide, häufiger 15 bis 10000 Nukleotide. Polynukleotid schließt Nukleinsäuren aus jeder Quelle ein, in gereinigter oder ungereinigter Form, natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte, was DNA (dsDNA und ssDNA) und RNA, gewöhnlich DNA, einschließt, und kann t-RNA, m-RNA, r-RNA, mitochondriale DNA und RNA, Chloroplast-DNA und -RNA, DNA-RNA-Hybride oder Mischungen daraus, Gene, Chromosomen, Plasmide, die Genome biologischen Materials, wie beispielsweise Mikroorganismen, z. B. Bakterien, Hefen, Viren, Viroide, Schimmel, Pilze, Pflanzen, Tiere, Menschen und deren Fragmente sein.

[0048] Ligand – jede organische Verbindung, für die ein Rezeptor natürlich existiert oder hergestellt werden kann.

[0049] Hapten – eine Verbindung, die in der Lage ist, sich spezifisch an korrespondierende Antikörper zu binden, die aber nicht selbst als Immunogen (oder Antigen) zur Herstellung der Antikörper wirkt. Antikörper, die ein Hapten erkennen, können gegen Verbindungen, die das Hapten beinhalten, welches an einen immunogenen (oder antigenen) Träger gebunden ist, hergestellt werden. Haptene sind eine Untermenge von Liganden.

[0050] Ligandanalogue – ein modifizierter Ligand, eine organische Gruppe oder Analytanalogue, gewöhnlich mit einem Molekulargewicht größer als 100, welches mit dem analogen Ligand um einen Rezeptor konkurriert, wobei die Modifizierung Mittel zur Verfügung stellt, die ein Ligandanalogue mit einem anderen Molekül verbinden. Das Ligandanalogue unterscheidet sich vom Liganden gewöhnlich durch mehr als Ersetzen eines Wasserstoffs durch eine Bindung, welche das Ligandanalogue mit einem Knotenpunkt oder Label verknüpft, muss aber nicht. Das Ligandanalogue kann sich in einer ähnlichen Weise wie der Ligand an den Rezeptor binden. Das Analogue kann zum Beispiel ein Antikörper sein, der gegen den Ideotyp eines Antikörpers des Liganden gerichtet ist.

[0051] Rezeptor ("Antiligand") – jede Verbindung oder Zusammensetzung, die in der Lage ist, eine spezielle räumliche oder polare Orientierung eines Moleküls, z. B. ein Epitop oder eine bestimmbare Stelle, zu erkennen. Beispielhafte Rezeptoren schließen natürlich vorkommende Rezeptoren, z. B. thyroxinbindendes Globulin, Antikörper, Enzyme, Fab-Fragmente, Lektine, Nukleinsäuren, Protein A, komplementäre Komponente C1q ein.

[0052] Spezifische Bindung – die spezifische gegenseitige Erkennung eines von zwei verschiedenen Molekülen im Gegensatz zu wesentlich geringerer Erkennung anderer Moleküle. Generell haben die Moleküle Bereiche auf ihren Oberflächen oder in Vertiefungen, die auch als "Bindungsstellen" bezeichnet werden, die spezifische Erkennung zwischen den beiden Molekülen ermöglichen. Beispielhaft für spezifische Bindung sind Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen, Enzym-Substrat-Wechselwirkungen, Polynukleotid-Wechselwirkungen und so weiter.

[0053] Nicht-spezifische Bindung – nicht-kovalente Bindung zwischen Molekülen, die relativ unabhängig von spezifischen Oberflächenstrukturen ist. Nicht-spezifische Bindung kann seine Ursache in mehreren Faktoren haben, einschließlich hydrophober Wechselwirkungen zwischen Molekülen.

[0054] Antikörper – ein Immunglobulin, welches sich spezifisch anbindet und dadurch als komplementär zu

einer bestimmten räumlichen oder polaren Orientierung eines anderen Moleküls definiert wird. Der Antikörper kann monoklonal oder polyklonal sein und kann durch Techniken hergestellt werden, die im Stand der Technik bekannt sind, wie beispielsweise Immunisierung eines Wirts und das Sammeln von Sera (polyklonal) oder durch das Herstellen von zusammenhängenden Hybridzelllinien und das Sammeln des gebildeten Proteins (monoklonal), oder durch Klonen und Exprimieren von Nukleotidsequenzen oder mutierter Versionen davon, die mindestens für die Aminosäuresequenzen kodieren, die für die spezifische Bindung natürlicher Antikörper benötigt werden. Antikörper können ein komplettes Immunglobulin oder ein Fragment davon einschließen, wobei Immunglobuline die verschiedenen Klassen und Isotypen, wie beispielsweise IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3, IgM etc. einschließen. Fragmente davon können Fab, Fv und F(ab')₂, Fab' einschließen. Zusätzlich können Aggregate, Polymere und Konjugate von Immunglobulinen oder deren Fragmente benutzt werden, wo es angebracht ist, solange die Bindungsaffinität für ein bestimmtes Molekül erhalten bleibt.

[0055] Substituiert – bedeutet, dass ein Wasserstoffatom eines Moleküls durch ein anderes Atom, das ein einzelnes Atom sein kann, wie beispielsweise Halogen etc., oder Teil einer Gruppe von Atomen, die eine wie oben beschriebene Funktionalität bildet, ersetzt wurde. Ein solcher Substituent kann eine Gruppe oder Funktionalität sein, die Hydrophilie oder Lipophilie verleiht. Hydrophilie kann durch eine funktionale Gruppe, die ein oder mehr Atome, wie beispielsweise Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel, Phosphor und so weiter hat, erreicht werden; solche Gruppen schließen Sulfonat, Sulfat, Phosphat, Amidin, Phosphonat, Karboxylat, Hydroxyl, besonders Polyole, Amin, Ether, Amid ein. Beispielhafte funktionelle Gruppen sind Karboxyalkyl, Sulfonoxylalkyl, CONHOCH₂COOH, CO-(Glukosamin), Zucker, Dextran, Zyklodextrin, SO₂NHCH₂COOH, SO₃H, CONHCH₂CH₂SO₃H, PO₃H₂, OPO₃H₂, Hydroxyl, Karboxyl, Keton und Kombinationen daraus. Lipophilie kann durch eine funktionelle Gruppe, wie beispielsweise Kohlenstoffatome ersetzt durch Wasserstoff oder Halogen, erreicht werden und kann Alkyl, Alkyliden, Aryl und Aralkyl einschließen. Die lipophile Gruppe oder Funktionalität besitzt normalerweise eine bis sechs geradkettig oder verzweigte aliphatische Gruppen von mindestens 6 Kohlenstoffatomen, häufiger mindestens 10 Kohlenstoffatomen, und bevorzugt mindestens 12 Kohlenstoffatomen, gewöhnlich nicht mehr als 30 Kohlenstoffatomen.

[0056] Träger oder Oberfläche – eine feste Phase, üblicherweise ein Träger oder eine Oberfläche, welche ein poröses oder nicht-poröses wasserunlösliches Material ist, das jede mögliche Form, wie beispielsweise Streifen, Stäbchen, Platte, Mikrotiterplatte, Partikel oder Kügelchen haben kann. Eine große Auswahl an verwendbaren Trägern wird in Ullman, *of al.* U.S. Patent Nr. 5,185,243, Spalten 10–11. Kurn, et al., U.S. Patent Nr. 4,868,104, Spalte 6, Zeilen 21–42 und Milburn, et al., U.S. Patent Nr. 4,959,303, Spalte 6, Zeilen 14–31, offenbart.

[0057] Die Oberfläche kann hydrophil oder in der Lage sein, hydrophil gemacht zu werden, und schließt anorganische Pulver, wie beispielsweise Siliziumdioxid, Magnesium, Sulfat und Aluminiumoxid; natürliche polymere Materialien, insbesondere zellulose Materialien und Materialien, die aus Zellulose abgeleitet sind, wie beispielsweise Fasern enthaltende Papiere, z. B. Filterpapier, Chromatographiepapier, etc.; synthetische oder modifizierte natürlich vorkommende Polymere, wie beispielsweise Nitrozellulose, Zelluloseacetat, Poly(Vinylchlorid), Polyakrylamid, vernetztes Dextran, Agarose, Polyakrylat, Polyethylen, Polypropylen, Poly(4-Methylbuten), Polystyrol, Polymethakrylat, Poly(Ethylenterephthalat), Nylon, Poly(Vinylbutyrat), etc; entweder verwertet als solches oder in Verbindung mit anderen Materialien; Glas erhältlich als Bioglas, Keramik, Metalle ein. Natürliche oder synthetische Zusammensetzungen, wie beispielsweise Liposome, phospholipide Vesikel und Zellen können ebenfalls zum Einsatz kommen.

[0058] Das Binden von SBP-Gliedern an einen Träger oder eine Oberfläche kann, außer durch den Gebrauch der Verbindungen der vorliegenden Erfindung, durch bekannte Techniken erreicht werden, die in der Literatur allgemein zugänglich sind. Siehe zum Beispiel "Immobilized Enzymes", Ichiro Chibata, Halsted Press, New York (1978) und Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.*, 245:3059 (1970).

[0059] Signalerzeugende Systeme ("SES") – eine oder mehrere Komponenten, mindestens eine Komponente ist ein nachweisbares Label, welche ein nachweisbares Signal erzeugen, das der Menge des gebundenem und/oder ungebundenem Label, z. B. die Menge an Label, die an die nachzuweisende Verbindung gebunden oder nicht gebunden ist. Das Label ist jedes Molekül, das ein Signal produziert oder veranlasst werden kann, ein Signal zu produzieren, und kann zum Beispiel ein Fluoreszenzmarker, Radioaktiv-Label, Enzym, Chemilumineszenzlabel oder Photolabel sein. Daher wird das Signal durch das Ermitteln von Enzymaktivität, Lumineszenz, Lichtabsorption oder Radioaktivität, je nach dem, ermittelt und/oder gemessen. Geeignete Labels schließen, zur Veranschaulichung, nicht aber im Sinne einer Beschränkung, ein: Enzyme, wie beispielsweise basische Phosphatase, Glukose-6-Phosphatdehydrogenase ("G6PDH") und Meerrettich-Peroxidase; Ribozym; ein Substrat zur Replikase, wie beispielsweise QB-Replikase; Promotoren; Farbstoffe; fluoreszierende Verbindungen.

dungen, wie beispielsweise Fluoreszein, Isothiozyanat, Rhodaminverbindungen, Phycoerythrin, Phycozyanin, Allophykozyanin, o-Phthaldehyd und Fluoreszamine; chemilumineszierende Verbindungen, wie beispielsweise Isoluminol; Sensitizer; Koenzyme; Enzymsubstrate; Radiolabels, wie beispielsweise ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , ^3H , ^{57}Co und ^{75}Se ; Partikel, wie beispielsweise Latex oder Kohlenstoffpartikel; Metallsol, Kristallit; Liposome; Zellen, etc., welche des weiteren mit einem Farbstoff, einem Katalysator oder einer anderen nachweisbaren Gruppe markiert werden können. Passende Enzyme und Koenzyme sind in Litman, et al., U.S. Patent Nr. 4,275,149, Spalten 19–28 und Boguslaki, et al., U.S. Patent Nr. 4,318,980, Spalten 10–14 offenbart; passende fluoreszierende Verbindungen und chemilumineszierende Verbindungen werden in Litman, et al., U.S. Patent Nr. 4,275,149 in den Spalten 30 und 31, offenbart.

[0060] Es gibt zahlreiche Verfahren mit denen das Label ein Signal generieren kann, das durch externe Mittel nachgewiesen werden kann, wünschenswerterweise durch visuelle Untersuchung, zum Beispiel durch elektromagnetische Strahlung, Wärme und chemische Reagenzien. Das Label oder andere SES-Glieder können ebenso an ein SBP-Glied, ein anderes Molekül oder einen Träger gebunden werden.

[0061] Labels schließen Gruppen, die durch elektromagnetische Strahlung oder durch elektrochemischen Nachweis, einschließlich Farbstoffe, fluoreszierende Verbindungen, chemilumineszierende Verbindungen und radioaktive Isotope, nachgewiesen werden, ein.

[0062] Das Label kann ein Signal unmittelbar generieren, weshalb zusätzliche Komponenten nicht benötigt werden, um ein Signal zu generieren. Zahlreiche organische Moleküle, zum Beispiel fluoreszierende Verbindungen, sind in der Lage, ultraviolettes und sichtbares Licht zu absorbieren, wobei die Lichtabsorption Energie auf diese Molekülen überträgt und sie auf einen angeregten Energiezustand. Diese absorbierte Energie wird durch Lichtemission bei einer zweiten Wellenlänge wieder abgegeben. Andere Labels, die unmittelbar ein Signal erzeugen, schließen radioaktive Isotope und Farbstoffe ein.

[0063] Ebenso gut kann das Label andere Komponenten benötigen, um ein Signal zu erzeugen, und das signalerzeugende System würde dann all die Komponenten einschließen, die benötigt werden, um ein messbares Signal zu erzeugen, was Substrate, Koenzyme, Verstärker, zusätzliche Enzyme, Substanzen, die mit enzymischen Produkten reagieren, Katalysatoren, Aktivatoren, Kofaktoren, Inhibitoren, Radikalfänger, Metallionen, und spezifische Bindungssubstanz, die zur Bindung von signalgenerierenden Substanzen benötigt wird, einschließen kann. Eine detaillierte Diskussion zu geeigneten signalerzeugenden Systemen kann in Ullman, et al. U.S. Patent Nr. 5,185,243, Spalten 11–13, gefunden werden.

[0064] Das Label und/oder andere SES-Glied kann unter Verwendung der Verbindungen und Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung an ein SBP-Glied oder an einen Träger gebunden werden. Alternativ kann das Label kovalent an ein SBP-Glied, wie beispielsweise einen Antikörper; einen Rezeptor für einen Antikörper, einen Rezeptor, der in der Lage ist, sich an ein kleines Molekül, welches an einen Antikörper angebonden ist, zu binden, oder ein Ligandanalogon gebunden werden. Die Bindung des Labels an das SBP-Glied kann durch chemische Reaktionen, die zum Ersetzen eines Wasserstoffatoms des Labels durch eine Bindung an das SBP-Glied führt, durchgeführt werden, oder kann eine Verknüpfungsgruppe zwischen dem Label und dem SBP-Glied einschließen. Andere SES-Glieder können auch kovalent an SBP-Glieder gebunden werden. Zum Beispiel können zwei SES-Glieder, wie beispielsweise eine fluoreszierende Verbindung und ein Quencher, jeweils an einen anderen Antikörper gebunden werden, der einen spezifischen Komplex mit dem Analyten bildet. Die Bildung des Komplexes bringt die fluoreszierende Verbindung und den Quencher nahe zusammen, wodurch es dem Quencher ermöglicht wird, mit der fluoreszierenden Verbindung zu interagieren, um ein Signal zu generieren. Verfahren zur Anbindung sind im Stand der Technik bekannt. Siehe zum Beispiel Rubenstein, et al., U.S. Patent Nr. 3,817,837.

[0065] Assay – Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins oder der Menge eines Analyts.

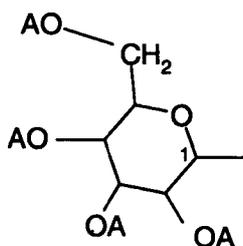
[0066] Messen der Menge eines Analyts – quantitative, halbquantitative und qualitative Verfahren, sowie andere Verfahren zur Bestimmung eines Analyts gelten als Verfahren zur Messung der Menge eines Analyts. Zum Beispiel gilt ein Verfahren, welches lediglich das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines Analyts in einer Probe, von der man annimmt, dass sie den Analyt enthält, ermittelt, als innerhalb des Rahmens der vorliegenden Erfindung liegend. Die Begriffe "ermitteln" und "bestimmen", sowie andere übliche Synonyme für messen sind im Umfang der vorliegenden Erfindung enthalten.

[0067] Hilfsmaterialien – Verschiedene Hilfsmaterialien werden oft in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung im Assay zum Einsatz kommen. Zum Beispiel sind Puffer normalerweise im Assaymedium vorhan-

den, sowie Stabilisatoren für das Assaymedium und die Assaykomponenten. Oftmals können zusätzlich zu diesen Additiven Proteine vorhanden sein, wie beispielsweise Albumine; organische Lösungsmittel, wie beispielsweise Formamid; quaternäre Ammoniumsalze; Polyanionen, wie beispielsweise Dextransulfat; Tenside, insbesondere nicht-ionische Tenside; Bindungsverstärker, z. B. Polyalkylenglykole; oder ähnliche.

[0068] Ganz oder teilweise sequentiell – Wenn verschiedene Agenzien anders als gleichzeitig (simultan) kombiniert werden, können ein oder mehrere mit einem oder mehreren der verbleibenden Agenzien kombiniert werden, um eine Unterkombination zu bilden.

[0069] In einer Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Polymere, die eine Sequenz von Monosaccharidwiederholungseinheiten umfassen, von denen eine jede unabhängig aus Monosaccharideinheiten der Formel:



ausgewählt wird, worin eines der As eine Bindung an den C1 glykosidischen Kohlenstoff (wie in der Formel oben angegeben) einer anderen der Einheiten ist und die anderen As unabhängig aus der Gruppe bestehend aus H und QL ausgewählt werden, worin L eine Verknüpfungsgruppe ist, die O und Q verknüpft, und Q ist $C(Z)=D$, worin D gleich CR^1R^2 ist, worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander H, Alkyl oder Aryl sind, und Z ist H oder $C(Y)=O$, worin Y gleich R^3 , OR^3 oder NR^3R^4 ist, worin R^3 und R^4 unabhängig voneinander H, Alkyl oder Aryl sind, und worin ein jedes von L, R^1 , R^2 , R^3 und R^4 zusammengenommen werden kann, um einen Ring zu formen, mit der Maßgabe, dass mindestens zwei der As im Polymer QL sind. Gewöhnlich ist ein Ring, falls vorhanden, ein drei- bis achtgliedriger Ring, bevorzugt ein fünf- bis siebengliedriger Ring, der eine oder mehrere Doppelbindungen haben kann. Der Ring kann Aryl oder Aralkyl sein. Ein oder mehrere der Atome des Rings können durch einen anderen Substituenten als Wasserstoff ersetzt werden, um eine oder mehrere Funktionalitäten zu bilden. Die Atome des Rings, die nicht Wasserstoff sind, sind gewöhnlich Kohlenstoff, können aber auch Sauerstoff, Schwefel, Bor, Silizium und/oder Stickstoff einschließen. Beispiele solcher Ringe sind Benzol, Naphthalen, Anthrazen, Phenanthren, Pyridin, Pyrimidinofuran, Inden, Indan, Pyrrol, Thiophen, Imidazol.

[0070] Das oben erwähnte Polymer hat gewöhnlich von ca. 3 bis 50000, bevorzugt 25 bis 10000, besonders bevorzugt 50 bis 1000 Monosaccharidwiederholungseinheiten. Bevorzugt sind mindestens zwei As in QL in mindestens einer der Monosaccharideinheiten je 20, besonders bevorzugt je 10 Monosaccharideinheiten des Polymers.

[0071] Es folgen Beispiele zur Veranschaulichung, nicht aber im Sinne einer Beschränkung von Polymeren gemäß der vorliegenden Erfindung.

L ist Alkylen, z. B. Methylen ($-CH_2-$), Ethylen ($-CH_2CH_2-$), etc.; oder Alkylenoxyhydroxyalkylen, z. B. 1-Methylenoxy-2-Hydroxyethylen ($-CH_2-O-CH_2-C(OH)H-$) usw..

Q ist (i) $-CH=CR^1R^2$, (ii) $(R^1R^2)C=C-C(O)-R^3$, (iii) $(R^1R^2)C=C-C(O)-OR^3$ und (iv) $(R^1R^2)C=C-C(O)-NR^3R^4$.

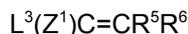
[0072] R^3 und R^4 sind Niederalkyl, bevorzugt Methyl.

[0073] Besonders bevorzugte Polymere gemäß der vorliegenden Erfindung sind diejenigen, worin das Polymer ein modifiziertes Dextran ist, in welchem das A am Methylenoxysauerstoff einer der Einheiten des Polymers eine Bindung zu dem C1 glykosidischen Kohlenstoff einer der anderen Einheiten des Polymers ist, und QL $HC(O)CH_2-$ oder $HC(O)CH_2OCH_2C(OH)HCH_2-$ ist.

[0074] Die Polymere der Erfindung können auf verschiedene Arten hergestellt werden. Die folgende Diskussion eines Beispiels zur Herstellung der oben erwähnten Polymere dient der Veranschaulichung und nicht der Beschränkung. Das unten beschriebene Verfahren kann leicht ausgeführt werden und beeinträchtigt nicht die Stabilität des Polysaccharids. Das Verfahren umfasst das Reagieren des Polysaccharids mit einem Alkylierungsmittel, welches eine Funktionalität hat, die mit einer Hydroxylgruppe des Polysaccharids reagiert, wobei ein alkyliertes Polysaccharid gebildet wird, worin das Alkylierungsmittel eine Olefingruppe aufweist, und dann

das Reagieren des alkylierten Polysaccharids, um die Olefingruppe zu einer amin-reaktiven Funktionalität umzuwandeln.

[0075] Das Alkylierungsmittel kann die Struktur



umfassen, worin L^3 eine Gruppe ist, die eine Funktionalität umfasst, die mit einer Hydroxylgruppe des Polysaccharids reaktiv ist, R^5 und R^6 sind unabhängig voneinander H, Alkyl, Aryl, oder können miteinander oder mit L^3 zusammengenommen werden, um einen Ring zu formen, und Z^1 ist H oder $C(W)=O$, worin W gleich R^7 , OR^7 , oder NR^7R^8 ist, worin R^7 und R^8 unabhängig voneinander H, Alkyl oder Aryl sind. Gewöhnlich ist ein Ring, falls vorhanden, ein drei- bis achtgliedriger Ring, bevorzugt ein fünf- bis siebengliedriger Ring, der eine oder mehrere Doppelbindungen haben kann. Der Ring kann Aryl oder Alkyl sein. Ein oder mehrere der Atome des Rings können durch einen anderen Substituenten als Wasserstoff ersetzt werden, um eine oder mehrere Funktionalitäten zu bilden. Die Atome des Rings, die nicht Wasserstoff sind, sind gewöhnlich Kohlenstoff, können aber auch Sauerstoff, Schwefel, Bor, Silizium und/oder Stickstoff einschließen. Beispielhaft für solche Ringe sind Benzen, Naphthalen, Anthracen, Phenanthren, Pyridin, Pyrimidin, Inden, Indan, Pyrrole, Thiophen, Imidazol.

[0076] Das gewünschte Polymer wird das besondere Alkylierungsmittel, das verwendet werden soll, bestimmen. Um zum Beispiel das oben beschriebene Polymer zu machen, worin QL gleich $HC(O)CH_2-$ ist, verwendet man ein Alkylierungsmittel, worin L^3 ein Methylen ist, das eine Abgangsgruppe wie beispielsweise Bromid hat, Z^1 , R^5 und R^6 gleich H sind. Um das oben beschriebene Polymer zu machen, worin QL gleich $HC(O)CH_2OCH_2C(OH)HCH_2-$ ist, verwendet man ein Alkylierungsmittel, worin L^3 gleich $CH_2OCH_2(C_2H_3O)$ ist, worin (C_2H_3O) eine Oxiranylgruppe ist. Letzteres Alkylierungsmittel ist bevorzugt, wenn ein wasserlösliches Polymer gewünscht ist. Das Aufrechterhalten der Wasserlöslichkeit des Dextrans kann generell durch Aufnahme einer Gruppe, die während der Einführung der Aldehydgruppe dem Dextran hydrophilische Eigenschaften verleiht, erreicht werden. Dementsprechend ist ein bevorzugtes Alkylierungsmittel $CH_2=CHCH_2OCH_2(C_2H_3O)$, welches zur Einführung eines QL, das zusätzliche Sauerstoffatome enthält, z. B. $HC(O)CH_2OCH_2C(OH)HCH_2-$, führt.

[0077] Zum Beispiel wird Dextran mit Allylglyzidylether ($CH_2=CHCH_2OCH_2(C_2H_3O)$) in einem sauren wässrigen Medium behandelt. Eine säurekatalysierte Öffnung des Epoxidrings kommt zum Einsatz, was zum Hinzufügen einer Hydroxylgruppe an einem der Kohlenstoffatome des Dextrans an eines der zwei Kohlenstoffatome des Epoxidrings führt, wobei Allyloxydextran erhalten wird. Für diesen Schritt ist der pH des Mediums ca. 1 bis 4, bevorzugt 1,5 bis 2,5. Gewöhnlich ist es wünschenswert, die Reaktion in Anwesenheit einer Lewisäure, wie zum Beispiel $Zn(BF_4)_2$, H_2SO_4 , $SnCl_2$, durchzuführen. Dementsprechend sollte der pH für die Reaktion nicht so niedrig oder so hoch sein, dass er Bindungen im Dextranmolekül beeinflusst, oder andere schädliche Wirkungen am Dextranmolekül verursacht. Wo eine Lewisäure eingesetzt wird, sollte der pH nicht so hoch sein, dass er zu einer schädlichen Wirkung an der Lewisäure führt, wie beispielsweise das Verursachen von Ausfällung unerwünschter Reaktionsmaterialien. Die Menge der eingesetzten Lewisäure beträgt ca. 10–30 (Gewicht/Gewicht) an Dextran. Die Kontrolle des pH erlaubt die Kontrolle der Anzahl an Aldehydgruppen, die in das Dextran eingebracht werden; daher ist pH-Kontrolle wichtig.

[0078] Die Zeitspanne für die Reaktion ist gewöhnlich 6 bis 18, bevorzugt 10 bis 15 Stunden. Bevorzugterweise wird die Reaktion in einer Inertgasatmosphäre, zum Beispiel Argon, Neon, Stickstoff, durchgeführt. Die Temperatur der Reaktionsmischung beträgt generell ca. 70 bis 90°C, gewöhnlich ca. 75 bis 85°C, bevorzugt ca. 80°C.

[0079] Die Reihenfolge der Hinzugabe der Reagenzien umfasst gewöhnlich das Auflösen des Dextrans, der Lewisäure und des Alkylierungsmittels, wie beispielsweise Allylglyzidylether, in Wasser bei einer Erwärmung von ca. 60 bis 80°C, bevorzugt ca. 68 bis 72°C. Nach der gewünschten Zeitspanne wird die Reaktionsmischung abgekühlt und das entstandene Allyloxydextranprodukt wird, zum Beispiel durch Filtration, Ultrafiltration oder ähnliches, gereinigt.

[0080] Das oben aufgeführte Verfahren führt durchschnittlich ca. eine Allyloxygruppe pro 5 bis 20, gewöhnlich 7 bis 12, bevorzugt 8 bis 10 Polysaccharideinheiten des Dextranmoleküls ein. Gewöhnlich wird nur eine Allyloxygruppe in eine Polysaccharideinheit, die alkyliert ist, eingeführt, generell an der Hydroxylgruppe an der 2-, 3- oder 4-Position.

[0081] Das Allyloxydextran wird weiter umgesetzt, um eine Aldehydfunktionalität einzuführen. Zu diesem Zweck wird die Doppelbindung durch geeignete Mittel oxidiert, um die Doppelbindung zu spalten und eine entständige Aldehydgruppe einzuführen. Die Oxidation kann durch jedes Mittel, das eine entständige Aldehydgruppe produziert, nicht aber andere Teile des Dextranmoleküls beeinflusst, ausgeführt werden. Eine bequeme Art die Doppelbindung des Allyloxydextrans zu oxidieren ist, das Allyloxydextran der Ozonolyse, gefolgt von reduktiver Aufarbeitung, wie mit Dimethylsulfid, zu unterwerfen. Zu diesem Zweck wird in der Reaktionsmischung bei einer Temperatur von ca. 15 bis 30°C, gewöhnlich ca. 20 bis 28°C, bevorzugt ca. 24 bis 27°C Ozon erzeugt. Für diesen Schritt ist der pH des Mediums ca. 5 bis 8, bevorzugt 6 bis 7. Die Menge an verwendetem Ozon entspricht generell derjenigen Menge, die ausreichend ist, um alle Allylgruppen zu Aldehyden zu oxidieren. Die Zeitspanne für die Reaktion ist gewöhnlich ca. 5 bis 10 Stunden, bevorzugt ca. 5 bis 7 Stunden. Bevorzugterweise wird die Reaktion in Inertgasatmosphäre durchgeführt. Nach der gewünschten Zeitspanne wird die Reaktionsmischung abgekühlt und Ozonid wird, zum Beispiel durch das Hinzufügen eines Reduktionsmittels, wie zum Beispiel ein Sulfid, thiosubstituiertes Phosphin oder ähnliches, reduziert. Das entstandene Dextranaldehydprodukt wird durch Ausfällung mit einem organischen Lösungsmittel, durch Dialyse oder ähnliches gereinigt.

[0082] Als Alternative zum oben erwähnten Verfahren zum Herstellen der vorliegenden Polymere kann das oben erwähnte Alkylierungsgagens durch $\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O})$ ersetzt werden. Das entstandene Produkt aus diesem Alkylierungsgagens ist das gewünschte Dextranaldehyd. Dementsprechend kann der gewünschte Dextranaldehyd durch direkte Alkylierung erhalten werden, obwohl das zuvor erwähnte Alkylierungsgagens bevorzugt wird, weil das freie Aldehyd unter sauren Bedingungen Nebenreaktionen ausgesetzt wird.

[0083] In einer alternativen Ausführungsform ist die eingeführte amin-reaktive Funktionalität eine Alpha-Keto-Karbonsäurefunktionalität. Abermals legt das gewünschte Polymer das bestimmte, zu benutzende Alkylierungsgagens fest. Um zum Beispiel das oben beschriebene Polymer herzustellen, worin QL gleich $\text{HC}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}(\text{OH})\text{HCH}_2$ ist, kann man ein Alkylierungsgagens verwenden, worin L³ gleich $\text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O})$ ist, worin (C₂H₃O) eine Oxiranylgruppe ist, und Z¹ gleich C(O)OH ist. Zum Beispiel wird Dextran mit einem Alkylierungsgagens der Formel $\text{CH}_2=\text{C}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O})$ in einem sauren wässrigen Medium behandelt. Wie oben beschrieben wird eine säurekatalysierte Öffnung des Epoxidrings durchgeführt, was in der Aufnahme einer Hydroxylgruppe des Dextrans an ein Kohlenstoffatom des Epoxidrings resultiert, um Allyloxydextran zu ergeben. Für diesen Schritt ist der pH des Mediums ca. 1 bis 4, bevorzugt 1,5 bis 2,5. Gewöhnlich ist es wünschenswert, die Reaktion in Anwesenheit einer Lewissäure unter ähnlichen Bedingungen wie oben beschrieben durchzuführen. Nach der beschriebenen Zeitspanne wird die Reaktionsmischung abgekühlt und das entstandene Produkt wird durch Filtration, Ultrafiltration oder ähnliches gereinigt. Das Produkt wird weiter umgesetzt, um eine Aldehydfunktionalität einzuführen. Zu diesem Zweck wird die Doppelbindung durch geeignete Mittel oxidiert, um die Doppelbindung zu spalten und eine Oxofunktionalität einzuführen, welches in einem Alpha-Keto-Säureprodukt resultiert. Die Oxidation kann durch jedes Mittel, das eine Oxofunktionalität produziert, nicht aber andere Teile des Moleküls beeinflusst, durchgeführt werden. Eine günstige Art die Doppelbindung dieses Produktes zu oxidieren, um eine Oxofunktionalität einzuführen, ist, das Produkt der Ozonolyse zu unterziehen, wie oben beschrieben. Das entstandene Alpha-Keto-Säureprodukt wird durch Filtration, Ultrafiltration oder ähnliches gereinigt.

[0084] Als Alternative zum oben erwähnten Verfahren zur Herstellung der vorliegenden Polymere kann das oben erwähnte Alkylierungsgagens durch $\text{C}(\text{O})(\text{COOH})\text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O})$ ersetzt werden. Das unmittelbare Produkt dieses Alkylierungsgagens ist das Alpha-Keto-Säure-substituierte Dextran.

[0085] In einem weiteren beispielhaften, erfindungsgemäßen Ansatz kann ein Dextranaldehydpolymer erhalten werden, worin QL gleich $\text{HC}(\text{O})\text{CH}_2$ ist. In diesem Ansatz wird ein Alkylierungsgagens, das eine Abgangsgruppe, wie beispielsweise Allylbromid, enthält, eingesetzt. Die Reaktion umfasst den Austausch des Bromids des Alkylierungsgagens durch ein Sauerstoffatom einer Polysaccharideinheit des Dextrans in Anwesenheit einer Base wie beispielsweise Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, oder ähnliches. Dextran wird in einem wässrigen Medium in einer Inertgasatmosphäre in Anwesenheit einer ausreichenden Menge einer Base mit Allylbromid kombiniert, um den oben erwähnten Austausch zu erreichen. Für diesen Schritt ist der pH des Mediums ca. 10 bis 14, bevorzugt 11 bis 14. Der pH für die Reaktion sollte nicht so niedrig oder so hoch sein, dass er Bindungen im Dextranmolekül beeinflusst, oder andere schädliche Wirkungen am Dextranmolekül verursacht. Die Kontrolle des pH erlaubt die Kontrolle der Anzahl an Aldehydgruppen, die in das Dextran eingebracht werden; daher ist pH-Kontrolle wichtig.

[0086] Die Zeitspanne für die Reaktion ist gewöhnlich ca. 2 bis 8 Stunden, bevorzugt 3 bis 5 Stunden. Bevorzugterweise wird die Reaktion in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt.

[0087] Die Reihenfolge der Zugabe der Reagenzien ist nicht kritisch. Bevorzugt wird das Dextran bei einer Erwärmung von ca. 50 bis 80°C, bevorzugt ca. 60 bis 70°C, in Wasser aufgelöst. Dann wird der pH des Mediums auf den gewünschten Level angepasst. Als nächstes wird das Allylbromid zur Reaktionsmischung hinzugefügt und die Temperatur wird auf die gewünschte Reaktionstemperatur erhöht, falls nötig. Nach der gewünschten Zeitspanne wird die Reaktionsmischung abgekühlt und das entstandene Allyloxydextranprodukt wird durch Ausfällung mit einem organischen Lösungsmittel, Ultrafiltration oder ähnlichem gereinigt.

[0088] Das oben aufgeführte Verfahren führt durchschnittlich ca. eine Allylgruppe pro 3 bis 20, gewöhnlich 7 bis 15, bevorzugt 8 bis 12 Polysaccharideinheiten des Dextranmoleküls ein.

[0089] Das Allyldextran wird weiter reagiert, um eine Aldehydfunktionalität wie oben für das Allyloxydextran beschrieben, einzuführen. Das entstandene Dextranaldehydprodukt wird durch Ausfällung mit einem organischen Lösungsmittel, Ultrafiltration oder ähnlichem gereinigt, wie zuvor beschrieben.

[0090] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Anbindung des anwendenden Polymers an ein Biomolekül wie beispielsweise ein Polypeptid. Ein Polysaccharid wird mit einem Alkylierungsagens umgesetzt, das eine Funktionalität besitzt, die mit einer Hydroxygruppe des Polysaccharids reagiert, wobei ein alkyliertes Polysaccharid, wie oben beschrieben, gebildet wird. Das alkylierte Polysaccharid wird weiter umgesetzt, um eine amin-reaktive Funktionalität, wie oben beschrieben, zu erhalten. Das Polysaccharid, das eine amin-reaktive Funktionalität hat, wird mit einer Aminfunktionalität am Biomolekül umgesetzt, um Polymer zu erhalten, welches an das Biomolekül angebunden ist. Die Reaktionsbedingungen zum Durchführung dieser Reaktion sind teilweise von der Art der amin-reaktiven Funktionalität abhängig. Zum Beispiel wird ein Polysaccharid, das eine Aldehydfunktionalität hat, mit einem Amin des Biomoleküls umgesetzt. Generell wird diese Reaktion unter leicht sauren Bedingungen in Gegenwart eines Reduktionsmittels, wie beispielsweise Zyanborhydrid oder ähnlichem, durchgeführt. Der pH des Reaktionsmediums, das die Reaktionspartner enthält, sollte niedrig genug sein, um einer nennenswerten Anzahl der Amingruppen zu ermöglichen, protoniert zu werden, sollte aber nicht so niedrig sein, dass es zu einer ungenügenden Menge freier Aminverbindungen führt. Der pH ist gewöhnlich ca. 4 bis 6, bevorzugt 5,0 bis 5,5. Die Zeitspanne für die Reaktion ist gewöhnlich ca. 10 bis 20 Stunden, bevorzugt ca. 14 bis 18. Die Temperatur der Reaktionsmischung ist generell ca. 15 bis 30°C, gewöhnlich ca. 20 bis 25°C. Oftmals ist es wünschenswert, jegliche Aldehydfunktionalitäten, die nicht mit dem Polypeptid reagiert haben, zu schützen. Zu diesem Zweck wird das oben produzierte Konjugat mit einer geeigneten Schutzgruppenreagenz umgesetzt, die mit den verbleibenden freien Aldehydgruppen ein stabiles Produkt bildet. Solch ein Schutzgruppenagens kann zum Beispiel Hydroxylamin, Semikarbazid, Phenylhydrazin, Hydrazin, Natriumcyanid sein, bevorzugt Hydroxylamin. Das entstandene Produkt wird durch konventionelle Mittel, wie zum Beispiel Ultrafiltration, Ausfällung, Dialyse und so weiter, gereinigt.

[0091] Die Polysaccharidverbindungen der vorliegenden Erfindung, die an ein Polypeptid angebunden sind, können in Analyt-Assays eingesetzt werden. Die Assayverfahren umfassen gewöhnlich eine Probe, von der angenommen wird, dass sie einen Analyt enthält, welche in einem Assaymedium mit Reagenzien kombiniert wird, um den Assay durchzuführen. Solche Reagenzien können einen Bindungspartner für den Analyt, Analytanalogons, feste Oberflächen, an die eine der oben genannten Reagenzien gebunden ist, Bindungspartner für SBP-Glieder einschließen. Eine oder mehrere der Reagenzien können markiert sein. Die Reagenzien werden so ausgewählt, dass ein Signal von einem Label in Abhängigkeit von der Anwesenheit oder Menge von Analyt in der Probe erhalten wird. Der Assay kann entweder ohne Trennung (homogen) oder mit Trennung (heterogen) von einem der übrigen Assaybestandteile oder -produkten durchgeführt werden.

[0092] Homogene Immunassays werden durch die EMIT[®] Assayprodukte (Syva Company, San Jose, CA) beispielhaft erläutert, offenbart in Rubenstein, et al., U.S. Patent Nr. 3,817,837, Spalte 3, Zeile 6 bis Spalte 6, Zeile 64; Immunfluoreszenzverfahren, wie die, die in Ullman, et al., U.S. Patent Nr. 3,996,345, Spalte 17, Zeile 59 bis Spalte 23, Zeile 25 offenbart werden; "Enzymechannelling"-Techniken, wie die, die in Maggio, et al., U.S. Patent Nr. 4,233,402, Spalte 6, Zeile 25 bis Spalte 9, Zeile 63 offenbart werden; und andere Enzymimmunassays, wie beispielsweise der Enzymgebundene Immunsorbant-Assay ("ELISA") werden in Maggio, E.T., infra diskutiert. Beispielhaft für heterogene Assays sind der Radioimmunassay, offenbart in Yalow, et al, J. Clin. Invest. 39:1157 (1960). Ein weiteres Verfahren, worin die vorliegende Erfindung Anwendung findet, wird in Ullman, et al., U.S. Patent Nr. 4,857,453, Spalte 11, Zeile 21 bis Spalte 14, Zeile 42 und Spalte 18, Zeile 21 bis Spalte 21, Zeile 55, offenbart.

[0093] Heterogene Assays umfassen gewöhnlich eine oder mehrere Trennschritte und können kompetitiv oder nicht-kompetitiv sein. Eine Vielzahl kompetitiver und nicht-kompetitiver heterogener Assayformate werden in Davalian, et al., U.S. Patent Nr. 5,089,390, Spalte 14, Zeile 25 bis Spalte 15, Zeile 9 offenbart. In einem

typischen kompetitiven heterogenen Assay wird ein Träger, der einen Antikörper zur Analytbindung aufweist, mit einem Medium in Kontakt gebracht, das die Probe und das Analytanalogon, angebunden an ein nachweisbares Label, wie beispielsweise ein Enzym (das "Konjugat"), enthält. Analyt in der Probe konkurriert mit dem Konjugat um die Bindung an den Antikörper. Nach der Trennung von Träger und Medium wird die Labelaktivität des Trägers oder des Mediums durch konventionelle Techniken bestimmt und wird zur Menge an Analyt in der Probe in Bezug gesetzt.

[0094] Eine typischer nicht-kompetitiver Sandwichassay ist ein Assay, der in David, et al., U.S. Patent Nr. 4,486,530, Spalte 8, Zeile 6 bis Spalte 15, Zeile 63 offenbart wird. In diesem Verfahren wird ein Immunsandwichkomplex in einem Assaymedium gebildet. Der Komplex umfasst den Analyt, einen ersten Antikörper (monoklonal oder polyklonal), der an den Analyt bindet und einen zweiten Antikörper, der an den Analyt oder an einen Komplex aus dem Analyt und dem ersten Antikörper bindet. Anschließend wird der Immunsandwichkomplex bestimmt und wird zur Menge an Analyt der Probe in Bezug gesetzt. Der Immunsandwichkomplex wird aufgrund der Anwesenheit im Komplex eines Labels bestimmt, worin entweder einer oder beide, der erste Antikörper und der zweite Antikörper, Labels oder Substituenten enthalten, die in der Lage sind, mit Labels kombiniert zu werden.

[0095] Sandwichassays finden größtenteils in der Bestimmung von Antigenen und Rezeptoranalyten Verwendung. In dem Assay wird der Analyt durch zwei Antikörper gebunden, die für den Analyten spezifisch sind, und daher wird der Assay auch als Zweiseitiger Immunometrischer Assay bezeichnet. In einer Ausführungsform wird eine erste Inkubation eines unmarkierten Antikörpers, der an einen Träger gekoppelt ist, sonst bekannt als ungelöster (immobilisierter) Antikörper, mit einem Medium in Kontakt gebracht, das eine Probe enthält, von der man annimmt, dass sie den Analyt enthält. Nach einem Wasch- und Trennungsschritt wird der Träger mit einem Medium in Kontakt gebracht, das den zweiten Antikörper enthält, welcher üblicherweise ein Label enthält, für eine zweite Inkubationsperiode. Der Träger wird nochmals gewaschen und von dem Medium abgetrennt, und entweder das Medium oder der Träger wird auf die Anwesenheit eines Labels hin untersucht. Die Anwesenheit und Menge des Label steht in Bezug zur Anwesenheit oder Menge des Analyts. Eine detaillierte Diskussion dieser Ausführungsform findet sich in U.S. Patent Nr. Re 29,169 und 4,474,878.

[0096] In einer Variation des oben erwähnten Sandwichassays wird die Probe in einem geeigneten Medium mit markiertem Antikörper für den Analyt in Kontakt gebracht und wird eine Zeit lang inkubiert. Dann wird das Medium mit einem Träger, an den ein zweiter Antikörper für den Analyt gebunden ist, in Kontakt gebracht. Nach einer Inkubationszeit wird der Träger von dem Medium abgetrennt und gewaschen, um ungebundene Reagenzien zu entfernen. Der Träger oder das Medium werden auf die Anwesenheit des Labels hin untersucht, welche in Bezug zur Anwesenheit oder Menge des Analyts steht. Eine detaillierte Diskussion dieser Ausführungsform findet sich in U.S. Patent Nr. 4,098,876.

[0097] In einer weiteren Variation des oben Erwähnten werden die Probe, der erste Antikörper, der an einen Träger gebunden ist, und der markierte Antikörper in einem Medium kombiniert und in einem einzigen Inkubationsschritt inkubiert. Trennung, Waschschrötte und die Labelbestimmung sind wie oben beschrieben. Eine detaillierte Diskussion dieser Ausführungsform findet sich in U.S. Patent Nr. 4,244,940.

[0098] Die vorliegende Erfindung findet in allen oben aufgeführten Assays Anwendung. Ein bestimmtes Beispiel eines Assays gemäß der vorliegenden Erfindung wird im Folgenden zur Veranschaulichung, nicht aber im Sinne einer Beschränkung, beschrieben. Der Assay ist zur Ermittlung eines Antikörpers in einer Probe, von der man annimmt, dass sie einen solchen Antikörper enthält, und wird in U.S. Patentanmeldungs-Nr. 08/310,028, angemeldet am 21. September 1994, detaillierter beschrieben. In dem Verfahren wird ein wässriges Assaymedium gebildet, welches die Probe, ein Antigen, das den Antikörper bindet und daher einen Antigen:Antikörper-Komplex bildet, und ein erstes Bindungsagens, das den Komplex bindet und das Antigen nicht bindet, wenn das Antigen nicht Teil des Komplexes ist, enthält. Die Menge des Antigens, die dem Medium zugefügt wird ist gleich Z, worin Z im Bereich zwischen X und nX liegt und Z weniger ist als Y, worin n gleich 5–1000, bevorzugt 10–100 ist, X ist die minimale Menge an Antigenen, die zuverlässig bestimmt werden kann, wenn keine Antikörper in der Probe vorhanden sind, und Y ist die maximale erwartete Menge an Antikörpern in der Probe. Ein zweites Bindungsagens, das selektiv das Antigen bindet, welches in Bezug steht zur Bindung des Komplexes, wenn der Komplex an das erste Bindungsagens gebunden ist, wird mit dem Assaymedium kombiniert. Das Antigen, das an das zweite Bindungsagens gebunden ist, wird bestimmt. Dessen Anwesenheit oder Menge steht im Bezug zur Anwesenheit oder Menge der Antikörper in der Probe.

[0099] Eine kritische Eigenschaft des oben erwähnten Verfahrens ist, dass das erste Bindungsagens den Antigen:Antikörper-Komplex in einer Weise binden kann, die die Bindung des zweiten Bindungsagens an den

Komplex verhindert. Die Bindungsagenzien sind SBP-Glieder und die Bindung des zweiten Bindungsagens an den ersten Bindungsagensbindungskomplex können besser verhindert werden, wenn das erste Bindungsagens an ein lösliches Polymer oder an eine suspendierbare Festphase gebunden ist. Dies bietet den zusätzlichen Vorteil, dass der erste Bindungsagensbindungskomplex vor dem Hinzufügen des zweiten Bindungsagens nicht vom Medium abgetrennt werden muss, weil der erste Bindungsagensbindungskomplex nicht mit der Messung des freien Antigens wechselwirkt.

[0100] Das SBP-Glied, das das erste Bindungsagens bildet, wird so ausgewählt, dass es den Antigen:Antikörper-Komplex bindet und nicht das Antigen bindet, wenn das Antigen nicht Teil des Komplexes ist, z. B. bindet das erste Bindungsagens nicht merklich an eventuell im Medium vorhandenem freien oder ungebundenem Antigen. Das SBP-Glied kann auch andere Substanzen, die in der Probe anwesend sind, binden, z. B. Nicht-Analyt-Antikörper. Dies ist zulässig, sofern das erste Bindungsagens Antigen nicht bindet, außer wenn das Antigen an den analyten Antikörper gebunden ist.

[0101] Geeignete SBP-Glieder für das erste Bindungsagens schließen, ohne Beschränkung, Antikörper gegen Immunglobuline; Komplementfaktor, C1 q; Rheumafaktor; Protein G und/oder Protein A ein. Einige dieser Substanzen binden nicht-selektiv an Immunglobuline, zum Beispiel Anti-Fab-Antikörper und Protein A, einige binden selektiv relativ spezifische Immunglobuline, wie beispielsweise Anti-Fc-Antikörper und Rheumafaktor, und einige binden selektiv Immunkomplexe, zum Beispiel C1q. Wie oben bemerkt, ist es, um das Binden des zweiten Bindungsagens an den Antigen:Antikörper-Komplex zu verhindern, bevorzugt, dass das erste Bindungsagens außerdem eine suspendierbare Festphase oder lösliches Polymer umfasst, z. B. wird das Bindungsagens an eine suspendierbare Festphase oder lösliches Polymer gebunden. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird eins der oben erwähnten ersten Bindungsagenzien, z. B. Protein A, an Dextranaldehyd wie oben beschrieben angebonden und das Konjugat kommt in dem Assay wie oben beschrieben zum Einsatz.

[0102] Das zweite Bindungsagens ist ein SBP-Glied, welches in der Lage ist, das Antigen zu binden. Es kann Antikörper sein, bevorzugt ein monoklonaler Antikörper, oder anderer Rezeptor für das Antigen; ein Ligand, an den sich das Antigen bindet, wie zum Beispiel ein Inhibitor, falls das Antigen ein Enzym ist; oder ein Glied eines SBP, wobei das andere Glied an das Antigen gebunden ist. Wenn das zweite Bindungsagens ein Polypeptid, z. B. ein Antikörper, ist, kann es mit dem Dextranaldehyd der vorliegenden Erfindung angebonden werden, um ein lösliches Polymer zu bilden.

[0103] Nach dem Hinzufügen des zweiten Bindungsagens wird das Antigen, das an das zweite Bindungsagens gebunden ist, bestimmt, dessen Anwesenheit oder Menge zur Anwesenheit oder Menge der Antikörper in der Probe in Bezug steht. Diese Beziehung ist umgekehrt proportional, da je höher die Konzentration an Antikörpern, die in der Probe anwesend sind, ist, umso niedriger ist die Menge an freiem Antigen, z. B. die Menge an Antigen, das an das zweite Bindungsagens gebunden wird. Die Bestimmung des freien Antigens kann auf viele Arten durchgeführt werden. In heterogenen Ausführungen wird das zweite Bindungsagens an einen abtrennbaren Träger gebunden, z. B. an eine suspendierbare oder nicht-suspendierbare Festphase. Zum Beispiel kann das zweite Bindungsagens ein Anti-Antigen-Antikörper oder ein Rezeptor wie beispielsweise Strep-tavidin sein, das an einen Ligand binden kann, der an das Antigen gebunden ist. In diesen Ausführungen werden die Probe und das Antigen zuerst kombiniert und dann wird das erste Bindungsagens hinzugefügt. Nach dem Hinzufügen des zweiten Bindungsagens, das an einen Träger gebunden ist, wird der Träger von der Mischung abgetrennt. Die Menge an Antigen, die an den zweiten Bindungsagens-Träger gebunden wurde, kann direkt oder indirekt gemessen werden. Wenn das Antigen ein Label an sich gebunden hat, kann die Anwesenheit des Labels auf dem Träger ermittelt werden. Mit bestimmten Trägern, insbesondere Indium, Siliziumdioxid und akustischen Vorrichtungen, kann sogar unmarkiertes Antigen direkt gemessen werden. Alternativ kann das Antigen indirekt gemessen werden, indem ein Reagens hinzugefügt wird, das das Antigen veranlasst, spezifisch markiert zu werden, z. B. durch das Hinzufügen eines Markierungsagens, wie beispielsweise ein markierter Antikörper zum Antigen. Das Label kann dann mit Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, bestimmt werden.

[0104] Die Bestimmung von Antikörpern ist ein nützliches Hilfsmittel in der Diagnose von Infektionskrankheiten. Die Bestimmung von Autoantikörpern ist ebenso nützlich in der Diagnose einer Autoimmunkrankheit. Das oben erwähnte Assayverfahren kann benutzt werden, um eine Vielzahl von Antikörpern, wie beispielsweise Antikörper des Menschlichen Immunschwäche-Virus ("HIV"), Röteln oder Herpes, und Autoantikörper wie beispielsweise Autoantikörper zu Insulin, zu Glutaminsäuredecarboxylase ("GAD"), jeweils das 65kd und das 67kd Isoforme, insbesondere aber GAD₆₅; und von anderen Inselzellantigenen zu bestimmen.

[0105] Es hat viele Forschungen bezüglich der Bestimmung von Autoantikörpern als einen Risikofaktor für Patienten, die die insulinpflichtige Diabetes Mellitus ("IDDM") entwickeln, gegeben. Es gibt mehrere Autoantikörper, von denen angenommen wird, dass sie IDDM anzeigen, auch bekannt als Typ I Diabetes oder Diabetes Juvenile. Diese schließen Autoantikörper von Bauchspeicheldrüsen-Inselzellantigenen wie beispielsweise Insulin und jüngst Antikörper gegen die 65kd Isoforme Glutaminsäuredecarboxylase ("GAD₆₅") und IA-2 ein. Autoantikörper von GAD₆₅ wurden vorgeschlagen als eines der frühesten Anzeichen für die Entwicklung von IDDM. Diese Autoantikörper sind einige Jahre vor dem klinischen Ausbruch von IDDM anwesend, zu einer Zeit, in der Eingriffsschritte unternommen werden könnten, um das Fortschreiten der Krankheit zu hindern.

[0106] Im Folgenden wird ein Assay, in dem das oben erwähnte Verfahren illustriert wird, beschrieben. Rekombinantes GAD₆₅ wird mit Biotin markiert, wobei bGAD gebildet wird. Dieses Konjugat wird dann mit Patientenserumproben inkubiert. Dann wird ein Konjugat von Protein-A und Dextranaldehyd gemäß der vorliegenden Erfindung hinzugefügt und die Inkubation wird fortgeführt. Die Suspension wird auf eine Mikrotiterplatte übertragen, die mit Streptavidin beschichtet ist. Nach der Inkubation, die freies bGAD binden soll, wird die Platte gewaschen und mit einem maus-monoklonalen Antikörper gegen GAD inkubiert, welcher entweder an ein Label wie beispielsweise Meerrettich-Peroxidase ("HRP") angebunden, oder unangebunden ist. Wenn unangebundene Antikörper verwendet werden, wird die Platte wieder gewaschen und dann mit markierten Anti-Maus IgG-Antikörpern inkubiert. In jedem Fall wird die Platte ein letztes mal gewaschen und mit jeglichen zusätzlichen SES-Gliedern inkubiert, nachdem die markierten Antikörper hinzugefügt wurden. Wenn das Label zum Beispiel HRP ist, könnte die letzte Inkubation eine Lösung einschließen, die Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin enthält und nach der Inkubation könnte eine Farbentwicklung erkannt werden.

[0107] In einem Assay, der unter dieser Ausführung der vorliegenden Erfindung ausgeführt wird, zeigten die Proben, die bekanntermaßen Anti-GAD₆₅ negativ waren, minimale Signalunterdrückung. Proben, die bekanntermaßen Anti-GAD₆₅ positiv waren, wiesen unterdrückte Farbentwicklung auf.

[0108] Die Erfindung wird durch die folgenden illustrativen Beispiele weitergehend veranschaulicht.

BEISPIELE

[0109] Anteile und Prozentangaben hierin sind gewichtsbezogen wenn nicht anders angegeben. Temperaturen sind in Grad Celsius (°C).

Beispiel 1

Herstellung eines Protein A-Dextran-Konjugats

Materialien und Ausrüstung

- Dextran T-500 von Pharmacia, Katalog # 17-0320-02.
- Allylglyzidylether von Aldrich, Katalog # A3, 260-8.
- Zinktetrafluorborat, Zn(BF₄)₂, 40 Gew.-%-Lösung von Aldrich, Katalog # 33,386-7
- Natriumhydroxid von Mallinckrodt AR (Charge 7707 KMRT) wurde verwendet, um 10M und 1.0M NaOH-Lösung in Wasser herzustellen.
- Dimethylsulfid, (CH₃)₂S, war von Aldrich, Katalog # M8, 163-2.
- 1-Heptanol wurde von Aldrich, Katalog # H280-5, bezogen.
- Wasser (entionisiert) wurde von einer Millipore Filtration Unit erhalten.
- UV-Vis-Spektren wurden auf einem Hewlett Packard 8452A Diodestrahl-Spektrophotometer aufgezeichnet.
- Verwendeter Ozonisator war Polyozone Modell T-816 Serie 3641 von Polymetrics, Colorado Springs, CO.
- Minikros Lab System (Microgon Inc. Kat. # SYLS 121 01 N) und Minikros Tangentialflussmodule (M25S 300 01 N, M25S 600 01 N, M21 M-300-01 N) waren ebenfalls von Microgon Inc. Laguna Hills, CA.
- Sauerstoff (extra trocken), der zur Erzeugung von Ozon verwendet wurde, wurde von Altair Gases and Equipment, San Ramon, CA., erhalten.
- Natriumcyanoborhydrid, NaCNBH₃ war von Aldrich Chemical Company (Kat. # 15,615-9)
- Hydroxylaminhydrochlorid, NH₂OH·HCl war von Mallinckrodt (AR-Grad, Charge # 5258 KVEN)
- Protein A war von Repligen Corporation (Produktcode 15001-10-00, Produktcharge RC7151) geliefert als 50mg/ml Lösung in Wasser
- Natriumacetat, NaOAc, war von Mallinckrodt (AR-Grad, Charge # 7364 KPNJ) Acetatpuffer, 0,1 M, pH 5,0
- ¹H-NMR und ¹³C-NMR Spektren wurden in D₂O (von Aldrich, 99,5 %) auf Bruker WP-250 MHz Spektro-

meter aufgenommen. Die ^1H chemischen Verschiebungen wurden mit Wasser als Bezugsspek bei 4,67 ppm aufgenommen. Aceton und Ethanol wurden als interne Referenz im ^{13}C NMR-Spektrum benutzt, der anomere Kohlenstoff bei 99,1 ppm wurde anschließend als Bezugsspek verwendet.

– Größenausschluss-Chromatographie wurde auf einem Pharmacia FPLC System ausgeführt, das aus einem LKB Controller LCC 500 Plus, zwei Pumpen P-500 und einem automatischen motorangetriebenen Ventil MV-7 besteht. Die verwendete Säule war Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia Katalog # 17-537-01). Das verwendete Aufnahmegerät war ein Pharmacia LKD Rec-102. Der Detektor war ein Waters Associates Differential Refraktometer R401.

– Lyophilisation wurde durchgeführt auf einem 8l VirTis Benchtop Freeze Dryer (Scientific Products).

1) Herstellung von Dextranaldehyd

[0110] Dextran (400 g, 500 kD) wurde in 1,5 l Wasser (Millipore) aufgelöst, in einem 4 l-Becherglas bei einer Erwärmung von 70°C unter Verwendung eines Stabrührers. Das Dextran wurde dem Wasser bei 70°C in 30–50g-Portionen zugefügt, dabei wurde jede Portion hinzugefügt, nachdem die erste Portion sich aufgelöst hatte. Der Stabrührer wurde auf 300–400 rpm eingestellt.

[0111] Die heiße Dextranlösung wurde durch einen Frittentrichter (grob) in einen Erlenmeyerkolben gefiltert und die gefilterte Lösung wurde in einen 3-Hals-Kolben geschüttet, der auf 70°C vorgeheizt war. Das Becherglas wurde mit 50 ml heißem Wasser, welches durch den Frittentrichter in den Erlenmeyer gefiltert wurde, ausgespült. Dieses Filtrat wurde der Reaktionsmischung hinzugefügt.

[0112] Der Trichter wurde vom Seitenhals des Kolbens entfernt und ein Zweifach-Claisen-Destillationsadapter wurde an seiner Stelle eingesetzt. Der Stabrührer wurde gestartet und auf 600–700 rpm gestellt und die Temperatur der Dextranlösung durfte 70°C erreichen. Die Temperatur des Ölbad wurde auf 72–75°C eingestellt. Die Reaktion wurde unter Argon durchgeführt. Die Lösung von $\text{Zn}(\text{BF}_4)_2$ (400 ml, 25 Gew.-% in H_2O , pH $1,8 \pm 0,2$) wurde unter Verwendung eines Trichters am Claisen-Adapter in den Kolben geschüttet, der die Dextranlösung enthielt. Der Trichter wurde vom Claisen-Adapter entfernt und durch einen Zugabetrichter (500 ml Kapazität) mit einem Druckausgleichsarm ersetzt.

[0113] Allylglyzidylether (500 ml der hinzuzufügenden 1,5 l) wurde in den Zugabetrichter hinzugefügt (in 3 × 500 ml-Portionen) bei 8–10 ml/min, während die Reaktionstemperatur bei $70 \pm 2^\circ\text{C}$ gehalten wurde. Das Hinzufügen des Allylglyzidyl wurde fortgesetzt, bis die ganzen 1,5 l hinzugefügt worden waren. Dann wurde die Temperatur der Reaktionslösung auf 80°C erhöht. Die Reaktion durfte für 12–13 h bei 80 °C unter Argon weiter verlaufen, wobei sie fortlaufend gerührt wurde (600–700 rpm).

[0114] Der Reaktionsbehälter wurde aus dem Ölbad entfernt und die Reaktionsmischung durfte auf 30°C abkühlen. Die abgekühlte Reaktionsmischung wurde dann in 6,0 l Wasser (Nalgenschale mit Hahn) geschüttet und manuell umgerührt. Die verdünnte Reaktionsmischung wurde durch Ultrafiltration unter Verwendung eines Microgon Tangentialfluss-Diafiltrationssystem gereinigt. Das Allyloxydextran wurde auf 1,0–1,5 l konzentriert.

[0115] Ein Aliquot (50 ml) des Filtrats wurde entfernt und zu analytischen Zwecken gefriergetrocknet. Die verbleibende Lösung des Allyloxydextrans in Wasser wurde bei 4°C gelagert und für den nächsten Schritt verwendet. Die ^1H und ^{13}C nuklearmagnetischen Resonanz-(NMR)-Spektren des oben erwähnten Allyloxydextrans standen im Einklang mit dem erwarteten Produkt.

[0116] Das Allyloxydextran wurde der Ozonolyse in einem 4,0 l-Becherglas, das mit einem Stabrührer ausgestattet war, unterzogen. Die Mischung wurde bei 300–350 rpm gerührt und durfte Raumtemperatur erlangen. Ozon wurde durch einen Ozonisator erzeugt und wurde mittels eines Gasperlators hinzugefügt, der in die Lösung des Allyloxydextrans eingetaucht war bei einem Druck von 9,0 psi und einer Fließgeschwindigkeit von 2,0 LPM (Liter pro Minute). 10 ml Heptanol wurden als Schaumverhinderer hinzugefügt. Die Reaktion wurde durch ^{13}C -NMR überwacht, das Verschwinden der olefinischen Resonanzen bei 118 und 134 ppm wurde als Hinweis auf die Beendigung der Reaktion benutzt. Die Ozonzugabe wurde für 5–6 h fortgeführt. Die Reaktionsmischung wurde auf rund 10°C abgekühlt. Hierzu wurden 50 ml Dimethylsulfid hinzugefügt, und das Rühren unter einer Argonatmosphäre wurde für 10 h fortgeführt. Die Reaktionsmischung durfte Raumtemperatur erlangen während sie diese Zeit lang gerührt (300–350 rpm) wurde. Das entstandene Dextranaldehyd wurde durch Microgon-Ultrafiltration gereinigt.

2) Anbindung von Protein A an Dextranaldehyd

[0117] Eine 2 mg/ml-Lösung des oben erwähnten Dextranaldehyd wurde in 0,1 M Acetatpuffer (pH $5 \pm 0,1$) mit einer Erwärmung von 65–70°C hergestellt. Die Dextranaldehydlösung wurde auf Außentemperatur (22–25°C) abgekühlt und 1 ml der Protein A-Lösung wurde unter Rühren zur Dextranaldehydlösung hinzugefügt. Der pH der Mischung wurde bei $5 \pm 0,1$ gehalten. Eine Lösung von Natriumcyanoborhydrid in Wasser (63 mg/ml) und 200 µl der Lösung wurden einer gerührten Lösung von Protein A und Dextranaldehyd hinzugefügt. Die Reaktion wurde über Nacht (16–18 h) gerührt. Eine 1,0M-Lösung von Hydroxylamin in Acetatpuffer wurde hergestellt (pH 5,0) und 1,0 ml dieser Lösung wurden zur oben ennrährten Reaktionsmischung hinzugefügt. Das Rühren wurde für 3–4 h bei Außentemperatur fortgeführt. Die Reaktionsmischung wurde in einem Amicon Centriprep-100 (MWCO 100kD) gereinigt. Die Filtrate wurden durch das Aufzeichnen des OD bei 280 nm auf Protein A hin untersucht. Der Rückstand nach dem ersten Zentrifugieren wurde mit Wasser verdünnt und die Gefäße wurden einer Zentrifugation bei 4 krpm für 30 Minuten ausgesetzt. Die Filtrate wurden erneut wie oben beschrieben untersucht. Die oben erwähnten Reinigungsschritte wurden zusätzliche acht mal wiederholt. Die Rückstände wurden zusammengelegt und Dextran wurde durch Rotation bestimmt und Protein A wurde durch Absorption bei A_{280} bestimmt.

[0118] Die Anbindung von Dextranaldehyd und Protein A wurde auch in einer Art ausgeführt, die der oben beschriebenen ähnelt, außer dass festes Protein A (500 mg Phiolen von Repligen Corporation) anstelle von kommerzieller Protein A-Lösung verwendet wurde. Das feste Protein A wurde in 10 ml entionisiertem Wasser aufgelöst. Die Reinigung des Protein A-Dextran-Konjugats wurde durch Ultrafiltration unter Verwendung des Minikros Lab System von Microgon, Inc. durchgeführt.

Beispiel 2

Assay in dem ein Protein A-Dextranaldehyd-Konjuaat verwendet wird

Abkürzungen

AET	2-Aminoethylisothiuroniumbromid
bGAD ₆₅	Biotinylisiertes GAD
BSA	Bovines Serumalbumin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgebundenes Immunosorbantassay
GAD ₆₅	Humane rekombinante Glutaminsäuredekarboxylase, Molekulargewicht 65300
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IDDM	insulinpflichtige Diabetes Mellitus
MAb	Monoklonaler Antikörper
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
RIA	Radioimmunassay
RT	Raumtemperatur
SAV	Streptavidin
SDS-PAGE	Natriumdodezylsulfatpolyacrylamidgel Elektrophorese
TCEP	Tris (Karboxyethyl)Phosphin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

Herstellung der Materialien

[0119] Streptavidinbeschichtete Platten wurden mit Standardtechniken hergestellt. Die HRP-markierten Anti-Maus-Antikörper waren Ziegenaffinitäts gereinigte Antikörper gegen Maus IgG (Gamma-Kettenspezifisch) (Kirkegaard & Perry Laboratories). Alle anderen Chemikalien hatten Reagenzgrad und sind von Sigma und Fisher Chemical kommerziell erhältlich. Alle Lösungen wurden in H₂O hergestellt und alle Reaktionen wurden unter Umgebungsbedingungen durchgeführt, sofern nicht anders angegeben.

Pufferzusammensetzung

[0120] Die Zusammensetzung des Reaktionspuffers war wie folgt: 20 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5% TRITON® X-100, 10 mM Benzamidin (15,7 mg/10 ml) Pefabloc (Pentapharm) bei 2,4 mg/10 ml, Aprotinin (Pentapharm, 229,500 KIU/ml) bei 50 µl/10 ml, und Pepstadin A (Sigma) bei 0,2 mg/10 ml.

Expression und Reiniung von Humaner Rekombinanter GAD₆₅

[0121] Baculoviruszellen, die rekombinante humane GAD₆₅ exprimieren, wurden in einem Fermenter gezüchtet und gewonnen. Die Pellets wurden unter Verwendung eines Glashomogenisierers lysiert. Nach der Zerstörung wurde das Zelllysatz zentrifugiert und gewaschen, und die gewaschenen Pellets wurden extrahiert, wobei man membrangebundene GAD₆₅ erhielt. Dieses Membranextrakt wurde dann auf eine Q Sepharosesäule geladen und mit einem KCl-Gradient eluiert. Enzymatisch aktive Fraktionen wurden zusammengefasst und auf eine Phenylsepharosesäule geladen. Die Eluierung wurde unter einem reversen Phosphatgradienten durchgeführt. Eluierte Fraktionen wurden auf enzymatische Aktivität hin untersucht und auf einer 10% SDS-PAGE auf Reinheit getestet. Fraktionen mit einer Reinheit annähernd 95%iger Proteinfärbung wurden zusammengefasst. Die zusammengefassten Fraktionen wurden unter Verwendung von Centriprep-30 (Amicon) konzentriert. Konzentrierte GAD₆₅ wurde zu 50% in Glycerin hergestellt und bei -70°C eingefroren.

Iodierung von GAD₆₅

[0122] Das Iodierungsprotokoll basierte auf dem kommerziell erhältlichen Enzymobead Kit (BioRad), und ergab [¹²⁵I]GAD₆₅. Die Inhalte der einzelnen Reaktionsgefäße, die mit dem Kit verkauft werden, wurden zuerst rehydriert. Zu diesem rehydrierten Gefäß wurden 2 µl (1 µg) gereinigte GAD₆₅, 5 µl (0,5 mCi) ¹²⁵I, 25 µl 1% Beta-D-Glukose, 50 µl 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2 und 18 µl H₂O (Gesamtvolumen 150 µl) hinzugefügt, gefolgt von Inkubation. Nach der Reaktion mit den Enzymobeads wurden die Inhalte des Gefäßes direkt auf eine Größenausschlussgelsäule geladen und 200 µl-Fractionen wurden mit PBS, 1 mM AET und 1 mM PLP eluiert. Fraktionen, die ¹²⁵I enthielten, wurden durch das Zählen von 1 µl-Aliquots identifiziert.

[0123] Bevor es in dem Assay verwendet wurde, wurde [¹²⁵I]GAD₆₅ unter Verwendung zusammengefassten normalen menschlichen Serums voradsorbiert. 200 µl [¹²⁵I]GAD₆₅ wurden mit 80 µl Reaktionspuffer, 100 µl eines Pools von 8 IDDM negativen Kontrollseren und 20 µl PBS gemischt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurde eine 50% Suspension von Protein A-Sepharose in PBS hinzugefügt und für 1 Std. bei 4°C inkubiert. Diese Suspension wurde dann der Mikrozentrifugierung unterworfen, der Überstand gesammelt, die Pellets mit 400 µl PBS gewaschen und die zwei Überstände wurden zusammengefasst und in Aliquots bei -70°C aufbewahrt.

Biotinilierung von GAD₆₅

[0124] Gereinigte GAD₆₅, 282 µg/450 µl in GAD-Puffer, pH 7,0, wurde unter Verwendung von 1 µl 6 N NaOH auf einen pH zwischen 8,0 und 8,2 eingestellt. Die Zusammensetzung des GAD-Puffers war 20 ml Phosphatpuffer (pH 6,8-7,0), 20 µM PLP, 1 mM AET, 1 mM EDTA, 0,1 % TRITON X-100 und 10% Glycerin. Dann wurden 4 µl 10 mM PLP und 5 µl einer 41 mg/ml-Lösung TCEP hinzugefügt. Nach einer Inkubation auf Eis wurde die Biotinilierung durchgeführt, indem 5 µl Jodacetyl-LC-Biotin (Pierce) für 3 Stunden bei 4°C im Dunkeln hinzugefügt wurden. Nicht-reagiertes Biotin wurde mittels Zentrifugation abgetrennt. Das Verhältnis Biotin:GAD₆₅ wurde zu ungefähr 3 bis 5 Mol Biotin/Mol GAD₆₅ bestimmt.

Maus-Anti-GAD₆₅ Antikörper

[0125] Mäuse wurden mit GAD₆₅, das wie oben beschrieben exprimiert und gereinigt wurde, und MABs, die gemäß Standardverfahren, wie in Milstein und Kohler, supra, beschrieben, erzeugt wurden, immunisiert.

[0126] Die entstandenen monoklonalen Antikörper (MABs) wurden in einem Standard ELISA-Format getestet und die besten MABs wurden basierend auf Spezifität gegen GAD₆₅ ausgewählt.

[0127] Eine Mischung aus sechs Anti-GAD MABs wurde in frühen Assays verwendet, um bGAD₆₅, das an SAV-beschichtete Platten gebunden ist, zu bestimmen, jeder MAB bei 1 pMol/µl in PBS plus 0,2% Natriumazid. Die Endkonzentration jedes MABs war 0,2 pMol/100 µl/Well.

[0128] Spätere Assays verwendeten nur einen Anti-GAD MAB, welcher mit HRP markiert war, wodurch der Bedarf an HRP-markierten Anti-Maus-MABs vermieden wurde.

Protein A-Sepharose-Suspension

[0129] Protein A-Sepharose (CL-4B, Sigma Chemical Company) wurde als 50%ige Suspension in PBS und 0,1 % Azid hergestellt.

Protein A-Dextran

[0130] Ein Konjugat von Protein A-Dextran aus dem oben erwähnten Beispiel 1 wurde als phosphatgepufferte Salzlösung (BioWhittaker, Walkersville, MD) hergestellt.

MICROTRAK®-Plattenwäscher und -Leser

[0131] Der Microtiterplattenwäscher und -leser sind Komponenten des MICROTRAK®-EIA Systems (Syva Company). Die verwendete Waschlösung war der MICROTRAK Chlamydia EIA Waschpuffer: 0,559 g/ml Trisnatriumzitat, 0,002 g/ml Zitronensäure, 0,0182 ml/ml TWEEN® 20, 0,3175 ml/ml Glycerin, pH 6,5–6,9. Jeder Waschzyklus wurde auf 300 µl/Well × 5 eingestellt.

Humane Serumproben

[0132] In diesen Beispielen verwendete menschliche Seren waren entweder Kontrollproben (keine Autoantikörper gegen GAD₆₅) oder von Patienten mit IDDM (Autoantikörper gegen GAD₆₅ vorhanden), welche von Dr. Noel Maclaren von der University of Florida zur Verfügung gestellt wurden.

A) Radioimmunassay (RIA) für GAD₆₅

[0133] Um [¹²⁵I]GAD₆₅, das von menschlichen Seren gebunden wird, zu messen, wurde eine über Nacht andauernde Inkubation bei 4°C eingerichtet, die 6 µl menschlichen Seren, 10 µl (ungefähr 150000 cpm) [¹²⁵I]GAD₆₅, voradsorbiert mit negativen menschlichen Seren im Reaktionspuffer, in einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt. Nach der über Nacht andauernden Inkubation, wurden 50 µl 50%iger Protein A-Sepharose hinzugefügt und die Inkubation wurde unter leichtem Schütteln 1 h bei 4°C fortgeführt.

[0134] Nach der Protein A-Sepharose Inkubation wurde die Suspension bei RT zentrifugiert, 3x mit 750 µl eiskaltem 20 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5% TRITON X-100 gewaschen. Jede Waschung wurde in einem Gammazähler gezählt und nach der letzten Waschung wurden die Pellets gezählt.

[0135] Die folgende Tabelle fasst typische Zählungen zusammen, die in jeder der 3 Waschfraktionen vorkamen, oder in den Pellets mit negativen Seren oder positiven Seren gebunden waren:

<u>Serum</u>	<u>Zählungen</u>	<u>Zählungen in</u>			<u>Zählungen</u>
	<u>insgesamt</u>	<u>Waschung 1</u>	<u>Waschung 2</u>	<u>Waschung 3</u>	<u>gebunden</u>
Negativ	188037	140940	12280	2236	2130
Positiv	196063	118324	12804	4536	11230

[0136] Da die RIA einen Überschuss an radiomarkiertem Material verwendet, wird ein sehr kleiner Prozentsatz der Eingangszählungen schließlich in der gebundenen Fraktion erzielt. Dies wird unten veranschaulicht, als das Prozent an radioaktiver GAD₆₅, das gebunden ist:

<u>Serum</u>	<u>%-gebundene Zählungen</u>
Negativ	1,1
Positiv	5,7

[0137] Der Depletionassay dieses Beispiels umfasst eine Reaktion zwischen Antigenen und Antikörpern und die nachfolgende Bestimmung von Antigenen, das nicht mit Antikörpern komplexiert ist. Es wurde angenommen, dass die Menge an Anti-Antigen-Antikörpern in einer Probe den A₄₅₀-Werten in dem Depletionassay dieses Beispiels invers korreliert. Demzufolge wird eine Probe in diesem Assay als "positiv" bewertet, wenn der A₄₅₀-Wert unter dem vom Mittel bestimmten Cutoff-Wert liegt, abzüglich 2 oder 3 Standardabweichungen einiger normaler Kontrollseren. Dies steht im Gegensatz zum typischen RIA, wo eine Probe mit einem cpm-Wert, der höher ist als der Kontrollmittelwert cpm zuzüglich 2 oder 3 Standardabweichungen als "positiv" bewertet wird. Dies wird am besten im folgenden Assay veranschaulicht.

B) Enzym-Immunoassay (EIA) für GAD₆₅ (ohne Zentrifugation)

[0138] 25 µl Humanserum in BSA-Puffer (10 mM KPhos, pH 7,0, 1 mM AET, 1 mM EDTA, 20 µM PLP, 0,1 % TRITON X-100, 10% Glycerin und 1 mg/ml proteasefreies BSA) wurden mit 15 µl bGAD₆₅ (1,5 fMol pro Assay)

und 10 µl 5 × Reaktionspuffer zu einem Endvolumen von 50 µl vermischt. Dies wurde für 2 Stunden bei RT inkubiert.

[0139] 50 µl Protein A-Dextran (1 bis 25 Standardverdünnung in PBS) wurden hinzugefügt und für 1 Stunde bei RT inkubiert.

[0140] 80 µl Überstandflüssigkeit (ungebundene bGAD₆₅ enthaltend) wurde zurückgehalten und auf eine vorgewaschene SAV-beschichtete Platte übertragen. Nach 1 Stunde Inkubation bei RT, unter Schütteln, wurde die Platte auf dem MICROTRAK System gewaschen.

[0141] 100 µl MAbs (6G10)-HRP-Konjugat (1:320 Verdünnung in Syva-Konjugat-Verdünner, vorgewärmt auf 37°C) wurden hinzugefügt und für 1 Stunde bei RT inkubiert, unter Schütteln, gefolgt von Waschen auf dem MICROTRAK System.

[0142] TMB-Substrat wurde hinzugefügt und bei RT für 30 Minuten entwickelt. Die Farbentwicklung wurde mit 1 N H₂SO₄ gestoppt und bei 450 nm ausgelesen.

[0143] Sieben von neun Patientenseren wurden mit dieser Methode korrekt diagnostiziert. Dies steht im Gegensatz zu konventionellen ELISA-Techniken, welche nur zwei von neun Proben korrekt bewerteten.

C) Vergleich zwischen EIA und RIA

[0144] Um die analytische Leistung des Assays der vorliegenden Erfindung zu ermitteln, wurde mit Testseren, welche zuvor mit der RIA-Methode untersucht wurden, verglichen. Das Hauptziel war es, zu bestimmen, ob Ergebnisse der zwei Verfahren korrelieren würden, ungeachtet der Art der Seren, z. B. Kontroll- oder Patientenproben mit einer Auswahl an GAD₆₅ Autoantikörpertitern.

[0145] Das Assayprotokoll war wie oben in B) beschrieben, mit den folgenden Abwandlungen: Serum (24 µl), bGAD₆₅ (20 µl enthaltend 12 fMol), 5 × Reaktionspuffer (20 µl) und erstionisiertes H₂O (36 µl) wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Protein A-Sepharose (200 µl einer 50%igen Suspension) wurden hinzugefügt und bei 4°C für 1 h weiter inkubiert. Dies wurde dann für 2 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand (180 µl) wurde sorgfältig gesammelt und zwei Aliquote von je 90 µl wurden zu zwei SAV-beschichteten Wells in einer Platte hinzugefügt, um Doppelwerte zu erhalten. Der Rest des Protokolls war wie oben in B) beschrieben.

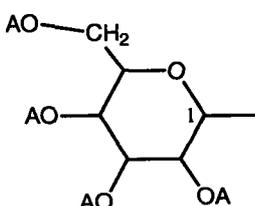
[0146] Die erhaltenen klinischen Daten zeigten hervorragende Korrelation zwischen den Ergebnissen des vorliegenden Assays und den Daten, die aus dem RIA erhalten wurden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Anbindung eines Polysaccharids an ein Polypeptid, umfassend:

- (a) die Umsetzung des Polysaccharids mit einem Alkylierungsmittel, welches eine Funktionalität hat, die mit einer Hydroxygruppe des Polysaccharids reagiert, wodurch ein alkyliertes Polysaccharid geformt wird, worin das Alkylierungsmittel eine Olefingruppe hat und worin das Alkylierungsmittel als Funktionalität ein Epoxid oder eine Alkylgruppe hat, welche eine Abgangsgruppe umfasst,
- (b) das Behandeln des alkylierten Polysaccharids, um die Olefingruppe zu einer amin-reaktiven Funktionalität umzuwandeln, und
- (c) die Umsetzung der amin-reaktiven Funktionalität mit einer Aminfunktionalität am Polypeptid, um ein an das Polypeptid gebundenes Polysaccharid herzustellen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin das alkylierte Polysaccharid aus Schritt (a) ein Polymer ist, welches eine Folge von Monosaccharidwiederholungseinheiten hat, von denen jede unabhängig ausgewählt wird aus Monosaccharideinheiten der Formel:



worin eines der As eine Bindung an den C1 glykosidischen Kohlenstoff einer anderen der Einheiten ist und die

anderen As unabhängig aus der Gruppe bestehend aus H und QL ausgewählt werden, worin L eine Verknüpfungsgruppe ist, die O und Q verknüpft, und Q ist C(Z)=D, worin D gleich CR¹R² ist, worin R¹ und R² unabhängig voneinander H, Alkyl oder Aryl sind, und Z ist H oder C(Y)=O, worin Y gleich R³, OR³ oder NR³R⁴ ist, worin R³ und R⁴ unabhängig voneinander H, Alkyl oder Aryl sind, und worin ein jedes von L, R¹, R², R³ und R⁴ zusammengefasst werden kann, um einen Ring zu formen, mit der Maßgabe, dass mindestens zwei der As im Polymer QL sind.

3. Verfahren nach Anspruch 2, worin das Polymer von ungefähr 50 bis 50000 Monosaccharidwiederholungseinheiten hat.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, worin das A am Methylenoxy-Sauerstoff einer der Einheiten des Polymers an einen C1 glykosidischen Kohlenstoff einer der anderen Einheiten des Polymers gebunden ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, worin die amin-reaktive Funktionalität ein Aldehyd ist.

6. Verfahren nach Anspruch 2 oder Anspruch 4, worin im Polymer Q gleich C(Z)=D ist, worin D gleich CR¹R² ist und Z ist gleich H.

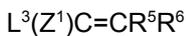
7. Verfahren nach Anspruch 2 oder Anspruch 4, worin im Polymer mindestens zwei der As QL sind in mindestens einer Monosaccharideinheit alle 20 Monosaccharideinheiten des Polymers.

8. Verfahren nach Anspruch 5, worin das Verfahren in Schritt (c) die reduktive Aminierung der amin-reaktiven Funktionalität mit einem Polypeptid umfasst.

9. Verfahren nach Anspruch 1, worin Schritt (b) die Ozonolyse des alkylierten Polysaccharids umfasst.

10. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Polysaccharid Dextran ist.

11. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Alkylierungsmittel die Struktur



hat, worin L³ eine Gruppe ist, die mit einer Hydroxygruppe des Dextrans reaktiv ist, R⁵ und R⁶ sind unabhängig voneinander H, Alkyl, Aryl, oder können miteinander oder mit L³ zusammengefasst werden, um einen Ring zu formen, und Z¹ ist H oder C(W)=O, worin W gleich R⁷, OR⁷, NR⁷ oder R⁸ ist, worin R⁷ und R⁸ unabhängig voneinander H, Alkyl oder Aryl sind, worin L³ ein Epoxid oder eine Alkylgruppe, umfassend eine Abgangsgruppe, umfasst.

12. Verfahren nach Anspruch 11, worin L³ eine Alkylgruppe ist, welche eine Abgangsgruppe hat und die genannte Abgangsgruppe ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Bromid, Chlorid, Iodid, Arylsulfonaten, Alkylsulfonaten, Arylsulfaten und Alkylsulfaten.

13. Verfahren nach Anspruch 11, worin L³ gleich CH₂OCH₂(C₂H₃O) ist, worin (C₂H₃O) eine Oxiranylgruppe ist.

14. Verfahren nach Anspruch 11, worin L³ gleich CH₂Br ist.

15. Verfahren nach Anspruch 1, worin die amin-reaktive Funktionalität ein Aldehyd ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, worin das Olefin einer Ozonolyse unterzogen wird, um die Aldehydfunktionalität zu erhalten.

17. Verfahren nach Anspruch 1, worin die amin-reaktive Funktionalität eine Alpha-Keto-Karbonsäure-Funktionalität ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen