

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-510160

(P2004-510160A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 2 5 G	4 B O 2 4
CO 7 K 5/02	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	4 B O 6 3
CO 7 K 7/02	CO 7 K 5/02 Z N A	4 H O 4 5
CO 7 K 14/16	CO 7 K 7/02	4 H O 5 0
CO 7 K 19/00	CO 7 K 14/16	

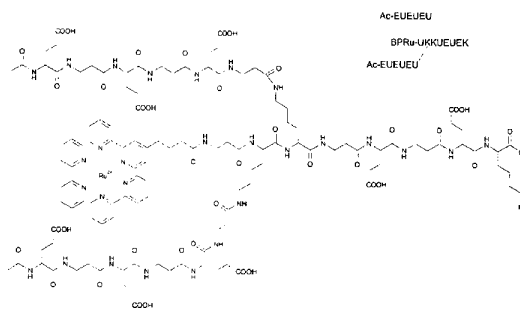
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-530643 (P2002-530643)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成13年9月26日 (2001.9.26)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月27日 (2003.3.27)		F. HOFFMANN-LA ROCHE
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/011118		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02002/027315		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成14年4月4日 (2002.4.4)		グレンツアーヘルストラツセ124
(31) 優先権主張番号	100 48 417.4	(74) 代理人	100095832
(32) 優先日	平成12年9月29日 (2000.9.29)		弁理士 細田 芳徳
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(72) 発明者	アンドレス, ヘルベルト
			ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 823
			77 カペレンヴィーゼ 39
		(72) 発明者	ヨーゼル, ハンス-ペーター
			ドイツ連邦共和国 ワイルハイム 823
			62 ウルメンシュトラーセ 28
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分枝リンカーを有する化合物

(57) 【要約】

本発明は、診断法または治療法における適用のための複合体を作製するための分枝リンカーを含有してなる新規化合物、およびその使用に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複合体の作製のための、一般式 (I) :



式中、Zは少なくとも1つの反応性官能基または結合性基であり、Xは、リンカー-Yを介してZに共有結合している反応性官能基であり(ここで、該リンカーは、1000Daより大きな分子量を有し、かつ少なくとも1つの電荷担体または/および少なくとも1つの親水性基を含有する分枝リンカーである)、nは1~10の整数であり、mは1または2である、
の化合物の使用。

10

【請求項 2】

該結合性基が標識基またはエフェクター基である請求項1記載の使用。

【請求項 3】

該結合性基が、発光および蛍光検出基、酵素、マイクロ粒子またはナノ粒子および放射性同位体から選ばれる標識基である請求項1または2記載の使用。

【請求項 4】

該標識基が金属キレート錯体であり、該化合物が一般式 (II) :



式中、

Mは、希土類金属イオンまたは遷移金属イオンから選ばれる二価または三価の金属カチオンであり、

20

L₁、L₂およびL₃は、同じかまたは異なっており、窒素含有複素環を少なくとも2つ含有する配位子を表し、かつ窒素原子を介して金属カチオン(capti on)に結合しており、

Xは、該分枝リンカー-Yを介して配位子L₁、L₂およびL₃の少なくとも1つに共有結合している反応性官能基であり、

nは1~10の整数であり、

mは1または2であり、

Aは電荷を一様にするために必要でありうる対イオンを表す、

の化合物である、請求項3記載の使用。

30

【請求項 5】

該結合性基が、特異的なバイオアフィン結合対のパートナーから選ばれるエフェクター基である請求項1~4いずれか記載の使用。

【請求項 6】

該エフェクター基が、ビオチンおよびそのアナログ、ストレプトアビジン、アビジン、抗原、ハプテン、抗体、核酸、核酸アナログ、糖類、レクチン、レセプターおよびレセプター配位子から選ばれる請求項5記載の使用。

【請求項 7】

該反応性官能基が、カルボン酸、カルボン酸ハロゲン化物、カルボン酸無水物、カルボン酸ヒドラジド、カルボン酸アジド、アミン、活性エステル、マレイミド、チオールまたは光活性化性基である請求項1~6いずれか記載の使用。

40

【請求項 8】

該分枝リンカーが、ホスフェート基、ホスホネート基、スルフィネート基、スルホネート基、スルフェート基およびカルボキシレート基からなる群より選ばれる少なくとも1つの負の電荷担体を含有する請求項1~7いずれか記載の使用。

【請求項 9】

該分枝リンカーが、少なくとも1つのカルボキシレート基または/およびホスフェート基を含有する請求項8記載の使用。

【請求項 10】

該分枝リンカーが、アミノ基および置換アミノ基から選ばれる少なくとも1つの正の電荷

50

担体を含有する請求項 1 ~ 9 いずれか記載の使用。

【請求項 1 1】

該分枝リンカーが、70個までの電荷担体を含有する請求項 1 ~ 10 いずれか記載の使用。

【請求項 1 2】

該分枝リンカーが、1 ~ 40個の電荷担体を含有する請求項 1 1 記載の使用。

【請求項 1 3】

該分枝リンカーが、エチレンオキシド基、ポリエチレンオキシド基、スルホキシド基、スルホン基、カルボン酸アミド基、カルボン酸エステル基、ホスホン酸アミド基、ホスホン酸エステル基、リン酸アミド基、リン酸エステル基、スルホン酸アミド基、スルホン酸エステル基、硫酸アミド基および硫酸エステル基から選ばれる少なくとも1つの非帯電親水性基を含有する前記請求項いずれか記載の使用。

10

【請求項 1 4】

少なくとも1つの非帯電親水性基が、第一級カルボン酸アミド基である請求項 1 3 記載の使用。

【請求項 1 5】

該リンカーの分子量が、1000 ~ 50,000 Da の範囲である前記請求項いずれか記載の使用。

【請求項 1 6】

該分枝リンカーの少なくとも一部分が、ペプチド結合により互いに連結されたアミノカルボン酸単位から構成される請求項 1 ~ 15 いずれか記載の使用。

20

【請求項 1 7】

該電荷担体が、該リンカーへの導入後もなお少なくとも1つの遊離の電荷担体を含有する多官能性アミノカルボン酸に由来する請求項 1 6 記載の使用。

【請求項 1 8】

該親水性基が、該リンカーへの導入後もなお少なくとも1つの親水性基を含有する多官能性アミノカルボン酸に由来する請求項 1 6 記載の使用。

【請求項 1 9】

分枝位置が、多官能性アミノカルボン酸に由来する請求項 1 6 記載の使用。

【請求項 2 0】

該多官能性アミノカルボン酸が、リシン、オルニチン、ヒドロキシリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、ホスホセリンおよび合成の三官能性アミノカルボン酸から選ばれる請求項 1 7、1 8 または 1 9 記載の使用。

30

【請求項 2 1】

一般式 (I)



式中、Z は少なくとも1つの反応性官能基または結合性基であり、X は、リンカー Y を介して Z に共有結合している少なくとも1つの反応性官能基であり (ここで、該リンカーは、1000 Da より大きな分子量を有し、かつ少なくとも1つの電荷担体または/および少なくとも1つの親水性基を含有する分枝リンカーである)、n は 1 ~ 10 の整数であり、m は 1 または 2 である、
の化合物。

40

【請求項 2 2】

請求項 2 ~ 20 いずれか記載の特徴の1つまたは数個を有する請求項 2 1 記載の化合物。

【請求項 2 3】

少なくとも1つの生物学的物質と、請求項 2 1 または 2 2 記載の一般式 (I) の化合物の少なくとも1つとを含有してなる複合体。

【請求項 2 4】

該生物学的物質が抗体もしくは抗体断片、核酸、ポリペプチド抗原、免疫学的に反応性のペプチドまたはハプテンである請求項 2 3 記載の複合体。

50

【請求項 25】

免疫学的検出法または核酸ハイブリダイゼーション法における請求項 21 または 22 記載の化合物または請求項 23 または 24 記載の複合体の使用。

【請求項 26】

発光法における請求項 25 記載の使用。

【請求項 27】

電気化学発光法における請求項 25 または 26 記載の使用。

【請求項 28】

複合体の標識基またはエフェクター基の可溶性を改善するための請求項 27 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

本発明は、診断法または治療法における適用のための複合体を作製するための新しいリンカーおよびその使用に関する。

【0002】

数個の結合性基または / およびエフェクター基、例えば、標識基または固相結合性基または毒素を含有してなる複合体は、しばしば診断法または治療法において使用される。かかる複合体は、直接結合させることにより、または先行技術で公知のブリッジ構造もしくはリンカー構造を用いることにより調製されうる。複合体パートナー間または他の成分間の分子内および分子間相互作用を妨害することは、しばしば、かかる複合体の性質にとって不利である。

20

【0003】

診断試験において、これらの望ましくない分子内および分子間相互作用は、しばしば、シグナル、信号対雑音比、測定範囲の幅、ブランク値、検出下限の力学的範囲などの重要なアッセイパラメータの欠陥をもたらす。したがって、アッセイの相当な欠陥をもたらす。治療手順において、該相互作用がさらに、有効性または標的特異性の減少をもたらす。

【0004】

発光金属複合体の複合体のための先行技術で公知のリンカーの使用（欧州特許公開公報第 0178450A 号、欧州特許公開公報第 0580979A 号、国際公開第 87/06706 号パンフレット）は、例えば、アッセイの力学的範囲の低下をもたらす。かかる複合体の他の欠点は、タンパク質に対する非常に高い非特異的結合性および非常に高いブランク値である。しかしながら、類似の問題は、他の標識基および固相結合性基でも生じる。

30

【0005】

国際公開第 96/03409 号パンフレットおよび国際公開第 96/03410 号パンフレットには、金属錯体の反応性結合性基を配位子の 1 つに連結するリンカー内への遊離の正または / および負の電荷担体の導入、またはこれらの発光金属錯体内への親水性基の導入が、これらの錯体の複合体の非特異的吸収を低減し、したがって、イムノアッセイにおいて試験感度ならびに該複合体の安定性および回収率が向上することが開示されている。さらに、ある場合においては、総収量（quantum yield）の増加を達成することが可能である。

【0006】

40

Bredhorst, R. らの Anal Biochem 193 (1991) 272-9 には、主鎖としてインスリン A 鎖分子の 21 個のアミノ酸残基を含有する三官能性ハプテン-発光団複合体が記載されている。このように発光基とハプテン間のリンカーの働きをするインスリン A 鎖は、直鎖リンカーであり、分枝リンカーではない。

【0007】

最近の研究において、国際公開第 96/03409 号パンフレットまたは国際公開第 96/03410 号パンフレットによる親水性または帯電リンカーの使用は、試験成績において相当な利益をもたらすことがわかったが、かかる複合体を用いた場合でも、ブランク値は該系ブランク値よりも相当高い。したがって、非特異的結合の低減により、ブランク値をさらに低下させることが望ましいと思われる。また、標識基と他の試験化合物間の非特

50

異的な分子内および分子間相互作用は、シグナル生成量 (s i g n a l y i e l d) および該標識基の接近性 (a c c e s s i b i l i t y) に悪影響を及ぼすことなく低減されるべきである。

【 0 0 0 8 】

驚くべきことに、前記の欠点は、帯電担体または / および親水性基を特に側鎖に有する分枝リンカーを使用することにより排除されることがわかった。また、これらの分枝リンカーは、診断もしくは治療法において、またはスクリーニング目的のために使用される他の種類の複合体における改善をもたらす。

【 0 0 0 9 】

したがって、本発明の主題は、複合体作製のための、一般式 (I) :

10



式中、Zは少なくとも1つの反応性官能基または結合性基であり、Xは、リンカーYを介してZに共有結合している反応性官能基であり(ここで、該リンカーは、1000Da以上の分子量を有し、かつ少なくとも1つの電荷担体または / および少なくとも1つの親水性基を含有する分枝リンカーである)、nは1~10の整数、好ましくは1~4の整数であり、mは1または2、好ましくは1である、の多官能性化合物の使用である。

【 0 0 1 0 】

Z基は、1回または数回生じ得、各場合において、独立して反応性官能基または結合性基でありうる。該結合性基の例は、標識基またはエフェクター基である。エフェクター基は、例えばバイオアフィン (b i o a f f i n e) 結合対の他方のパートナーと特異的に相互作用しうるバイオアフィン結合対のパートナーである。

20

【 0 0 1 1 】

標識基は、染料などの任意の検出可能な公知の基、化学発光基などの発光標識基、例えばアクリジニウムエステルもしくはジオキセタン、または蛍光染料、例えばフルオレセイン、クマリン、ローダミン、オキサジン、レソルフィン (r e s o r u f i n)、シアニンおよびその誘導体から選択されうる。標識基の他の例は、ルテニウム錯体もしくはユーロピウム錯体などの発光金属錯体またはCEDIA (クローン化酵素ドナーイムノアッセイ (C l o n e d E n z y m e D o n o r I m m u n o a s s a y)、例えば欧州特許第0061888号)に使用されるような酵素、マイクロ粒子 (m i c r o p a r t i c l e s) またはナノ粒子 (n a n o p a r t i c l e s)、例えばラテックス粒子もしくは金属ゾルならびに放射性同位体である。

30

【 0 0 1 2 】

好ましい態様において、標識基は発光金属錯体であり、該化合物は一般式 (I I) :



式中、

Mは、希土類金属イオンまたは遷移金属イオンから選ばれる二価または三価の金属カチオンであり、L₁、L₂ およびL₃ は、同じかまたは異なっており、窒素含有複素環を少なくとも2つ含有する配位子を表し、かつ窒素原子を介して金属カチオンに結合しており、Xは、リンカーYを介して配位子L₁、L₂ およびL₃ の少なくとも1つに共有結合している反応性官能基であり、nは1~10の整数、好ましくは1~4の整数であり、mは1または2、好ましくは1であり、Aは電荷を一様にするために必要でありうる対イオンを表す、

40

の構造を有する。

【 0 0 1 3 】

金属錯体は、好ましくは発光金属錯体、すなわち、適切な励起後に検出可能な発行反応を行なう金属錯体である。発光反応は、例えば、蛍光測定により、もしくは電気化学発光 (e l e c t r o c h e m i l u m i n e s c e n c e) 測定により検出され得る。この錯体における金属カチオンは、例えば、遷移金属または希土類金属である。該金属は、好ましくは、ルテニウム、オスミウム、レニウム、イリジウム、ロジウム、白金、インジウム

50

、パラジウム、モリブデン、テクネチウム、銅、クロムまたはタングステンである。ルテニウム、イリジウム、レニウム、クロムおよびオスミウムが特に好ましい。ルテニウムが最も好ましい。

【0014】

配位子 L_1 、 L_2 および L_3 は、窒素含有複素環を少なくとも2つ含有する配位子である。ピピリジル、ピピラジル、テルピリジル (terpyridyl) およびフェナントロリル (phenanthrolyl) などの芳香族複素環が好ましい。配位子 L_1 、 L_2 および L_3 は、特に好ましくは、ピピリジン環系およびフェナントロリン環系から選ばれる。

【0015】

該錯体は、電荷を一様にするための1つ、または数個の対イオン A をさらに含む。好適な負の帯電対イオンの例は、ハロゲン化物、 OH^- 基、カーボネート基、アルキルカルボキシレート基、例えばトリフルオロアセテート基、スルフェート基、ヘキサフルオロホスフェート基およびテトラフルオロボレート基である。ヘキサフルオロホスフェート基、トリフルオロアセテート基およびテトラフルオロボレート基が特に好ましい。好適な正の帯電対イオンの例は、アルカリ金属イオンおよびアンモニウムイオンなどの一価カチオンである。

【0016】

他方において、Z基は、結合パートナーと特異的に、好ましくは非共有結合的に相互作用するエフェクター基でありうる。好適な結合パートナーの例は、ハプテンまたは抗原/抗体、アミノピオチン、イミノピオチンまたはデスチオピオチンなどのピオチンまたはピオチンアナログ/アビジンまたはストレプトアビジン、糖/レクチン、核酸または核酸アナログ/相補核酸、レセプター/配位子、例えばステロイドホルモンレセプター/ステロイドホルモンであり、この場合、結合対の一方のパートナーはエフェクター基であり、したがって化合物 (I) の成分である。

【0017】

さらに好ましい態様では、Zは治療上活性な物質、例えば毒素、またはプロ毒素、例えば抗腫瘍物質でもあり得る。

【0018】

複合体を調製するために、化合物 (I) がリンカー分子として使用される。このプロセスにおいて、結合パートナー、特に上述のような結合パートナーを化合物 (I) の少なくとも1つの遊離官能基に共有結合させる。

【0019】

得られる結合生成物は、分枝リンカー Y を介して互いに連結された少なくとも2つの、好ましくは異なる結合性基を含有する。

【0020】

化合物 (I) または錯体 (II) の反応性官能基 X または Z は、生物学的物質に共有結合されうる反応性基である。X基は、好ましくは、カルボン酸ハロゲン化物、カルボン酸無水物、カルボン酸ヒドラジド、カルボン酸アジドなどの活性化カルボン酸基、または活性エステル、例えば N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル、p-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、イミダゾリルエステルもしくは N-ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル、アミン、マレイミド、チオールまたは光活性化性基、例えばアジドである。該化合物は、同じか異なりうる1つまたは数個の官能基 X または Z を含有しうる。X および Z は、好ましくは異なっている。Z が官能基である場合、これは好ましくは1つだけで存在する。Z が結合性基である場合、それは、数個、例えば10個まで存在しうる。官能基または結合性基 Z は、それぞれ同じか異なり得、任意に保護基によりブロックされている。しかしながら、X基とZ基を足した総数は、少なくとも2である、すなわち該化合物は、少なくとも二官能性化合物、好ましくは少なくともヘテロ二官能性化合物である。ヘテロ二官能性リンカーのための適切な活性基は、Aslam M., Dent A., Bioconjugation (1998) Mcmillan Refer

10

20

30

40

50

ence Ltd., London, p 216 - 363 に記載されている。

【0021】

リンカーの分子量は、少なくとも1000Daである。これは、リンカーの利点が特に明白になるからである。リンカーの分子量は、好ましくは1000～50,000Daの範囲であり、特に1000～20,000Daの範囲であり、最も好ましくは1000～10,000Daの範囲である。

【0022】

化合物(I)および金属錯体(II)は、XとZ間のリンカーYが、少なくとも1つの電荷担体または/および少なくとも1つの親水性基を含有する分枝リンカーであるという点で先行技術と異なる。本発明の文脈において、「電荷担体」という用語は、pH値が6～8の範囲で、主にイオン形態で存在する基を意味する。リンカーは、好ましくは70個まで、特に好ましくは1～40個、最も好ましくは2～20個の、かかる電荷単体を含有する。

10

【0023】

リンカーは、特に好ましくは少なくとも1つの負の電荷担体を含有する。好適な負の電荷担体の例は、ホスフェート基、ホスホネート基、スルフィネート基、スルホネート基、スルフェート基およびカルボキシレート基であり、カルボキシレート基およびホスフェート基が最も好ましい。

【0024】

正の電荷担体の例は、アミノ基および一アルキルアミノ基、二アルキルアミノ基もしくは三アルキルアミノ基(ここで、アルキル基は、炭素数が1～6である直鎖もしくは分枝アルキル残基、または炭素数が3～6である環状アルキル残基を表す)などの一置換アミノ基または多置換アミノ基である。正の電荷担体は特に好ましくは、リシンなどの塩基性アミノ酸、またはジエチルリシンもしくはジプロピルリシンなどの置換アミノ酸から選ばれる。アミンおよび置換アミンもまた、電気化学発光による金属錯体検出のための電子供与体として使用しうる。

20

【0025】

リンカーはまた、電荷担体の代替物として、または電荷担体に加えて非帯電親水性基を含みうる。非帯電親水性基の好ましい例は、エチレンオキシド基もしくは、好ましくは少なくとも3つのエチレンオキシド単位を有するポリエチレンオキシド基、スルホキシド基、スルホン基、カルボン酸アミド基、カルボン酸エステル基、ホスホン酸アミド基、ホスホン酸エステル基、リン酸アミド基、リン酸エステル基、スルホン酸アミド基、スルホン酸エステル基、硫酸アミド基および硫酸エステル基である。アミド基は好ましくは第一級アミド基であり、特に好ましくは、例えばアミノ酸アスパラギンおよびグルタミンの、アミノ酸側鎖基のカルボン酸アミド残基である。エステルは、好ましくは、親水性アルコール、特にC₁～C₃アルコールまたはジオールまたはトリオールに由来するものである。

30

【0026】

本発明の文脈において、「分枝」という用語は、リンカーがZ基とX基との間に主鎖と、さらにこの主鎖を起点とする1つまたは数個の側鎖とを含有することを意味する。電荷担体および親水性基は、主鎖または/および側鎖に位置しうる。本発明のリンカーが数個のZ基およびX基を含有する場合、主鎖それ自体がすでに分枝でありうる。しかしながら、いずれの場合でもリンカーは、Z基およびX基を全く含有しない1つまたは数個の側鎖をさらに含有する。側鎖の数は、好ましくは1～10であり、特に好ましくは2～6であり、最も好ましくは2～4個である。

40

【0027】

本発明の好ましい態様では、リンカーは、上述のような非帯電親水性基、特にカルボン酸アミド基または/およびポリエチレングリコール基を1つまたは数個含有する主鎖を含有するとともに、1つまたは数個の側鎖に電荷担体が少なくとも1つ存在する。この場合、例えば、1つの側鎖あたり1～10個の電荷担体、特に1～5個の電荷担体が存在しうる。あるいはまた、リンカーは、主鎖に電荷担体を、1つまたは数個の側鎖に非帯電親水性

50

基を含有しうる。また、さらなる態様では、主鎖および側鎖が、電荷担体とともに非帯電親水性基を含有することが想定されうる。

【0028】

分枝リンカーが、意図する結合化学的特性を妨害しうるXおよびZ以外の基、例えば、 $-COO^-$ 基または $-NH_2$ 基などを含有する場合、合成および/または結合の際に当業者に公知の適切な保護基を使用する。ペプチド側鎖内の末端 $-NH_2$ 基は、好ましくは、例えば、アセチル化またはスクシニル化により不活性化する。

【0029】

リンカーの主鎖の長さは、好ましくは7~200原子であり、特に好ましくは7~100原子である。主鎖は、ヘテロ原子、例えばO原子、またはアミド基を含有させることにより修飾されたアルキレン鎖であり、少なくとも1つの分枝部を含有する。分枝部に形成される側鎖は、好ましくは4~100原子の長さを有する。

【0030】

電荷担体は、好ましくは、主鎖のアルキレン単位のH原子または/および側鎖内のH原子が電荷担体を含有する基、例えば NH_3^+ または CO_2^- で置換されるようにリンカー内に位置する。

【0031】

遊離の電荷担体または/および親水性基を含有する分枝リンカーは、好ましくは、少なくとも部分的に、ペプチド結合により互いに連結されたアミノカルボン酸単位から構成される。かかるリンカーにおいて、分枝点は多官能性アミノカルボン酸に由来し得、該多官能性アミノカルボン酸は、主鎖への導入後もなお1つの官能基が存在するような、少なくとも3つの官能基、例えばアミノ基もしくはカルボキシ基を含有し、かつ側鎖の合成の開始点として使用しうる。分枝は、特に好ましくは、リシン、オルニチン、ヒドロキシリシンなどのジアミノカルボン酸を用いて作製する。

【0032】

分枝リンカーの電荷担体は、好ましくは、多官能性アミノカルボン酸の遊離の正または/および負の帯電基に由来し得、該多官能性アミノカルボン酸は、リンカーへの導入および2つの帯電基の同時反応後もなお少なくとも1つの遊離の電荷担体が存在するような、総数が少なくとも3つの帯電基、例えば、アミノ基、カルボキシレート基もしくはホスフェート基を含有する。例えば、電荷担体は、(a)1つのアミノ基および2つのカルボキシレート基、または(b)2つのアミノ基および1つのカルボキシレート基を含有する三官能性アミノカルボン酸に由来しうる。かかる三官能性アミノカルボン酸の例は、リシン、オルニチン、ヒドロキシリシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸、欧州特許公開公報第0618192号または米国特許第5,519,142号明細書に記載のような対称三官能性カルボン酸である。あるいはまた、三官能性アミノカルボン酸(a)内のカルボキシレート基の1つは、ホスフェート、スルホネートまたはスルフェート基で置換されうる。かかる三官能性アミノ酸の例は、ホスホセリンである。

【0033】

あるいはまた、分枝リンカーは、ホスフェート-糖単位、例えば、核酸塩基(nucleobase)を有しないDNA主鎖から少なくとも部分的に構成され得るか、またはグリコペプチド構造から構成されうる。さらにまた、リンカーは、少なくとも部分的にサッカリド単位から構成されうる。いずれの場合においても、リンカーの側鎖は、好ましくは三官能性単位により構成される主鎖の分枝部に位置しており、側鎖の長さは、合成に使用される少なくとも2つの構成(building)ブロック、例えば、天然もしくは合成のアミノ酸、またはエチレングリコールなどの他の成分である。

【0034】

好ましくは、分枝親水性リンカーは、非特異的結合により引き起こされる問題を低減するために、免疫学的手順において使用される。

【0035】

本発明のリンカー分子を構築するために、非天然のアミノ酸、および例えばジペプチドU

10

20

30

40

50

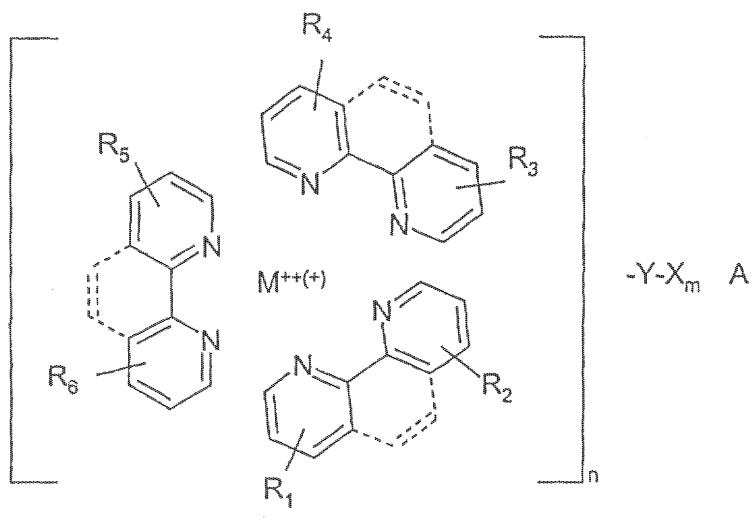
EまたはUQのような非天然の配列モチーフを使用するのが有利であることがわかっている。これは、血清学的アッセイ、すなわち患者の血清中の抗体を検出するために設定されたアッセイにおいて特に有利であることが証明されている。非天然のアミノ酸を有するリンカーは、プロテアーゼに対して、例えば血清または血漿中のプロテアーゼに対してむしろ安定であることが証明されており、したがって、本発明のさらに好ましい態様を示す。

【0036】

本発明の一態様において、金属錯体を含む分枝リンカーは、一般式(III)：

【0037】

【化1】



10

20

【0038】

式中、M、X、A、nおよびmは先に定義した通りであり、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅およびR₆は、同じかまたは異なっており、それぞれ、1つまたは数個の置換基を表すが、Xは、置換基R₁、R₂、R₃、R₄、R₅またはR₆の1つおよびリンカーYを介して配位子の1つに結合している、

30

を有する。

【0039】

錯体の配位子は、点線で示された基が存在するかないかに応じて、任意に置換されたフェナントロリン系またはピピリジン系である。

【0040】

配位子上の置換基R₁、R₂、R₃、R₄、R₅およびR₆は、好ましくは水素、C₁~C₅アルキル、特にC₁~C₃アルキル、フェニル、または上述のような親水性基であるが、これらは、リンカーYを含有しないものとする。

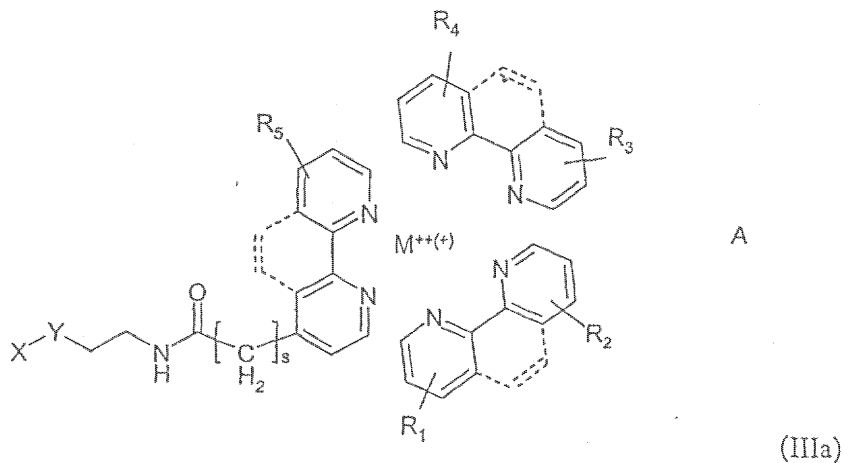
40

【0041】

特に好ましい態様では、金属錯体を含む分枝リンカーは、一般式(IIIa)：

【0042】

【化2】



10

20

30

40

50

【0043】

式中、M、XおよびAは先に定義した通りであり、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 は先に定義した通りであり、sは、0～6の整数、好ましくは1～4の整数であり、Yは遊離の電荷担体または/および親水性基を有する分枝リンカーを表す、を有する。

【0044】

標識基として金属錯体を有するか、またはエフェクター基としてビオチンを有し、反応性官能基としてリシンのアミノ側鎖基を有する、式(I)の化合物の例を図1～7に示す。リンカーの分枝点は、2つのアミノ基および1つのカルボキシレート基を有する三官能性アミノ酸であるリシンにより形成される。リンカーの主鎖内ペプチド結合を形成するために1つのアミノ基および1つのカルボキシレート基が使用されるが、側鎖の合成のための開始点としては第2のアミノ基が使用される。遊離の電荷担体は、グルタミン酸側鎖から形成される。図8において、リシンアミノ基は、フェニルアセチル(Phac)によりブロックされる。リンカー内の1つまたは数個の反応性基の保護基、例えばフェニルアセチルまたは/および全体の構造と適合性である他の保護基によるブロッキングはまた、不安定な結合基が化合物(I)内に導入されやすくする。

【0045】

反応性カルボキシレート基を、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドまたはジスクシンイミジルスベレート(disuccinimidyl suberate)(DSS)との反応により活性エステルに変換しうる(図12参照のこと)。あるいはまた、第一級アミノ基を、マレイミドヘキサノイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MHS)との反応によりマレイミド基に変換しうる(図9～11参照のこと)。

【0046】

一例として金属錯体を用いた本発明の化合物の調製を以下に詳細に記載する。例えば、ビオチンまたはペプチド抗原をエフェクター基として含有する他の化合物は、同様にして調製しうる。

【0047】

金属錯体のN-複素環配位子などの標識基上または固相結合性基上の帯電した分枝リンカーの合成は、任意に部分的に保護されたアミノカルボン酸を、配位子の反応性基、例えばカルボン酸にカップリングさせることにより、溶液中でのカップリング反応として行なうことができる。この結合段階は、所望の長さの分枝リンカーが合成されるまで任意に繰り返し得る。このプロセスにおいて、1つまたは数個の帯電側鎖基を含有する少なくとも1つの多官能性アミノカルボン酸が導入される。

【0048】

続いて、反応性基Xが導入され、該アミノカルボン酸の側鎖基上に存在しうる保護基を除

去する。溶液中で連続的にアミノ酸を結合することによる配位子の合成は、単一の配位子において起こり得るし、出発物質としての金属錯体にすでに結合している配位子でも起こり得る。好適な出発物質は、例えば、遊離のカルボキシレート基を含有する発光性金属錯体である。かかる金属錯体は、上述の文献から公知であり、また、例えば I g e n I n c . C o m p a n y , R o c k v i l l e , M D , U S A により商品としても提供される。

【0049】

他方において、分枝リンカーは、固相ペプチド合成によっても調製しうる。固相合成の第1の態様では、アミノ酸を、そのカルボキシレート基により固相支持体に結合させ、次いで、さらにアミノ酸を連続的にカップリングさせることにより所望のリンカーを合成する。このプロセスでは、側鎖基として帯電基、例えばアミノ基またはカルボキシレート基を含有する少なくとも1つのアミノ酸、および分枝部となり、かつ任意に保護された形態である少なくとも1つのアミノ酸を用いて本発明のリンカーを調製する。所望のリンカー配列が完成した後、活性化された金属錯体、例えば活性エステルを、固相に結合したペプチドの遊離N-末端アミノ基に結合させうる。固相から切り離した後、反応性基Xをペプチドリンカーのカルボキシ末端に結合させることができ、存在しうる保護基を除去する。

10

【0050】

固相合成の別の様式においては、保護されたアミノ基およびカルボキシレート基を含有するアミノ酸-金属錯体複合体、例えば F m o c - L y s (- R u (ピリジル)₃ - O H) を、遊離カルボキシレート基により固相に固定させ得、ブロックされたアミノ基を切り離した後、ペプチドリンカーが合成されうる。所望のリンカー配列が完成した後、錯体を固相から切り離し、少なくとも元のカルボキシレートアンカー基を遊離の電荷担体として含有するリンカーを得る。得られたペプチドリンカーのアミノ末端に反応性基Xをカップリングさせうる。

20

【0051】

固相合成のさらなる手順において、電荷担体を有する分枝リンカー配列を、選択したペプチドエピトープ上で直接合成することもできる。

【0052】

また、上述の合成変形型の組み合わせを用いて本発明の化合物を調製することができる。帯電リンカーを有する本発明の錯体の固相合成に好適なアミノ酸-金属錯体複合体は、独
国特許44 30 998 . 8号に記載されている。これによりこの開示に対して言及がなされる。

30

【0053】

本発明のさらなる主題は、上述のような一般式(I)の化合物である。

【0054】

本発明のさらなる主題は、少なくとも1つの本発明の化合物(I)がカップリングした少なくとも1つの生物学的物質を含有してなる複合体である。生物学的物質の例は、細胞、ウイルス、亜細胞粒子、タンパク質、リポ蛋白、糖蛋白、ペプチド、ポリペプチド、核酸、ペプチド核酸(PNA)、オリゴ糖、多糖類、リポ多糖類、細胞代謝物、ハプテン、ホルモン、薬理学的物質、アルカロイド類、ステロイド類、ビタミン類、アミノ酸および糖
類である。

40

【0055】

生物学的物質の官能基に共有結合しうる化合物の反応性官能基により、化合物を生物学的物質にカップリングさせる。官能基が活性エステルである場合、それは、例えば、生物学的物質の遊離アミノ基に結合しうる。官能基がマレイミド残基である場合、それは、例えば、生物学的物質の遊離SH基に結合しうる。

【0056】

本発明の特に好ましい態様では、化合物は、好ましくは最大50個のアミノ酸長、特に好ましくは最大30個のアミノ酸を有するペプチドに結合する。これらのペプチドは、好ましくは、所望のアミノ酸配列のペプチドを固相上で合成することにより調製され、この間

50

に、a) 固相結合性基またはノおよび標識基、例えば活性化された金属錯体、好ましくは金属錯体 - 活性エステル誘導体がペプチドのN - 末端アミノ基にカップリングする、またはノおよびb) エフェクター基またはノおよび標識基、例えばハプテンまたは金属錯体に共有結合したアミノ酸誘導体が、合成中にペプチドの少なくとも1つの位置に導入される。例えばペプチドのN - 末端アミノ酸へのエフェクター基またはノおよび標識基のカップリングは、好ましくは、固相からペプチドを切り離す前、およびペプチド合成に使用されるアミノ酸誘導体の反応性側鎖基上の保護基を除去する前に行なわれる。

【0057】

ペプチドは、好ましくは、1つまたは数個の免疫学的に反応性のエピトープ領域を含有する。これらのエピトープ領域は、好ましくは、病原性微生物、例えば細菌、ウイルスおよび原生動物、または自己免疫抗原に由来する。該エピトープ領域は、特に好ましくは、ウイルス抗原に由来し、H I V I、H I V I I、H I V OまたはC型肝炎ウイルス(H C V)のアミノ酸配列に相当する。

【0058】

生物学的物質のさらに好ましい例は、ビオチン、毒素、プロ毒素(protoxin)、核酸、抗体もしくは抗体断片、ポリペプチド抗原、すなわち免疫学的に反応性のポリペプチドまたはハプテンすなわち150 ~ 2000の分子量を有する有機分子、特に、カルデノライド、カルデノライドグリコシド(例えば、ジゴキシン、ジゴキシゲニン)、ステロイドアルカロイド、性ホルモン(例えば、プロゲステロン)、グルココルチコイドなどのステロイド骨格を有する分子である。ハプテンの他の例は、プロスタグランジン、ロイコトレイン(leucotrene)、ロイコ-エン-ジイン(leuco-en-diene)、トロンボキサンなどである。

【0059】

本発明のまたさらなる主題は、検出方法、例えば免疫学的検出方法または核酸ハイブリダイゼーション法、特に発光アッセイにおける、本発明の化合物または本発明の複合体の使用である。

【0060】

金属錯体を標識基として使用する場合、それは、好ましくは、発光種が電極の表面上に電気化学的に発生する電気化学的発光により検出される。先行技術の金属錯体を用いる発光アッセイを行なうための例は、欧州特許公開公報第0580979号、国際公開公報第90/05301号パンフレット、国際公開公報第90/11511号パンフレットおよび国際公開公報第92/141381号パンフレットにみられうる。これにより、これらに開示された方法および発光アッセイのための装置に対して言及がなされる。電気化学的発光アッセイは、好ましくはマイクロ粒子、特に、反応性コート、例えばストレプトアビジンが設けられた磁気マイクロ粒子からなる固相の存在下で行なわれる。このようにして、固相に結合した標識基として金属錯体を含有する、免疫複合体またはハイブリダイゼーション複合体を検出することが可能である。

【0061】

電気化学的発光の測定は、好ましくは、金属錯体の還元剤、例えばアミンの存在下で行われる。脂肪族アミンが好ましく、特に、アルキル基の炭素数がそれぞれ1 ~ 3である第一級、第二級および第三級アルキルアミンが好ましい。トリプロピルアミンが特に好ましい。しかしながら、アミンはまた、アニリンなどの芳香族アミンまたは複素環アミンでありうる。還元剤はすでに錯体の配位子球体内に一体化されうる。

【0062】

また、表面活性剤、例えば、エトキシ化フェノールなどの非イオン性剤が増幅剤として存在し得る。かかる物質は、例えば、T r i t o n X 1 0 0またはT r i t o n N 4 0 1の名称で商品として入手しうる。

【0063】

他方において、発光金属錯体はまた、蛍光または経時的(time-resolved)蛍光を測定することにより検出され得、ここでは、適切な波長の光を照射することにより

金属キレートが励起され、生じた蛍光発散を測定する。蛍光アッセイを行なうための例は、欧州特許公開公報第0178450号および欧州特許公開公報第0255534号にみられる。これにより、この開示に対する言及がなされる。

【0064】

上記の詳細に記載した、分枝した帯電または親水性リンカーを有する金属錯体を用いることの原理は、他の標識基または/およびエフェクター基に同様に適用されうる。分枝リンカーが使用されうる他の好ましい試験形式は、均一系(homogeneous)アッセイである。かかるアッセイは、例えば、CEDIAまたは経時的FRETなどのFRET(蛍光共鳴エネルギー移動、例えば、Pope, A. J.ら、Drug Discovery Today 4(1999)350-362参照のこと)として知られる測定手順に基づくものである。

10

【0065】

本発明の分枝リンカーを用いることにより、公知の試験形式と比べてかなりの利点が達成されうる。したがって、例えば、正に帯電した発光金属錯体は、負に帯電した分枝リンカーを含有してなる複体内で、より良好に取り扱われうる。改良された溶解性、したがって低下した非特異的結合特性は、一般に、分枝リンカーが疎水性の標識基または/および生物学的物質と組み合わせて用いられる場合に見られる。多くの場合において、これは、標識基の数を増加するため、したがって、シグナル生成量を増加させるために使用されうる。さらにまた、立体的に制約される(demanding)分枝リンカーは、疎水性標識基と疎水性生物学的物質との間の相互作用を妨げ、これにより、標識基の接近性の改良が確実になる。

20

【0066】

本発明の分枝リンカーは、例えば、ブランク値を低下させること、試験の力学的範囲を改良すること、検出限界を低下させること、試験範囲を広げること、または/および信号対雑音比を改良することにより、診断方法において非常に有利でありうる。活性物質の用量の低減、または/および副作用の低下が治療適用において達成されうる。

【0067】

本発明のまたさらなる局面は、1つまたは数個の電荷担体または/および1つまたは数個の上述したような親水性基を保有するリンカーが、ゲル電気泳動、例えば、アガロースゲル電気泳動、SDSゲル電気泳動、ゲル濾過、疎水性相互作用クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー法において見掛け分子量の大きなシフトを引き起こすことである。この効果は、本明細書に記載された分枝リンカーを用いて、および国際公開第96/03409号パンフレットに記載された線状リンカーを用いると生じる。見掛け分子量におけるこのシフトの結果、すなわち、リンカーが実際の場合よりも大きな分子量を有するように見える結果、それらを用いて、規定の化学量論および均一な組成を有する複合体を調製することができる。例えば、規定の数の標識基またはエフェクター基を保有するリンカーが結合性基、例えば、生体分子にカップリングされた後、調製の反応生成物は、別個の画分として、その化学量論にしたがって(例えば、1つの結合性基あたり1分子のリンカー、1つの結合性基あたり2分子のリンカー、1つの結合性基あたり3分子のリンカーなど)、クロマトグラフィー法により簡単に得られうる。

30

40

【0068】

特定の複合体を調製するために使用されるリンカーは、この場合、同じクロマトグラフィー分離系における結合性基の見掛け分子量の好ましくは20%以上、特に好ましくは30%以上、最も好ましくは40%以上の見掛け分子量を有するはずである。

【0069】

さらにまた、試薬キット(リンカー+(1つまたは複数の)標識基または(1つまたは複数の)エフェクター基+結合性基、例えば、標識対象の生体分子)、システム(それぞれの標識基を検出するための測定装置を含む)および規定の化学量論および官能性の試薬を含有する組成物が提供される。

【0070】

50

規定の化学量論を有するかかる複合体の好ましい例は、モノジゴキシゲニル化 F a b ' 抗体断片複合体である。

【 0 0 7 1 】

以下の実施例および図面により本発明をさらに明らかにする。

【 0 0 7 2 】

以下の実施例、参考文献、配列表および図面は、本発明の理解を補助するために提供され、その真の範囲は特許請求の範囲に記載される。本発明の精神から逸脱することなく、記載された手順において変形がなされうることが理解される。

【 0 0 7 3 】

実施例 1 : 固相ペプチド合成による分枝リンカーの調製

例えば Applied Biosystems A 4 3 3 のバッチペプチド合成機でのフルオレニルメチルオキシカルボニル - (F m o c) - 固相ペプチド合成により、分枝リンカーを合成した。各場合において、表 1 に示される 4 . 0 当量のアミノ酸誘導体をこのために使用した。

【 0 0 7 4 】

【 表 1 】

表 1:

A	Fmoc-Ala-OH
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH
D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH
E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH
gE	Fmoc-Glu-OtBu
F	Fmoc-Phe-OH
G	Fmoc-Gly-OH
H	Fmoc-His(Trt)-OH
I	Fmoc-Ile-OH
K1	Fmoc-Lys(Boc)-OH
K2	Fmoc-Lys(Fmoc)-OH
K3	Fmoc-Lys(Dde)-OH
K4	Fmoc-Lys(Alloc)-OH
K5	Fmoc-Lys(PhAc)-OH
K6	Fmoc-Lys-(標 識)-OH
K7	Boc-Lys(Fmoc)-OH
L	Fmoc-Leu-OH
M	Fmoc-Met-OH
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH
P	Fmoc-Pro-OH
Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
T	Fmoc-Thr(tBU)-OH
U	Fmoc-β-アラニン-OH
V	Fmoc-Val-OH
W	Fmoc-Trp-OH
Y	Fmoc-Tyr(tBU)-OH
Z	Fmoc-ε-アミノカプロン酸
Ps	Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH
Cs	Fmoc-Cys(SO ₃ H)-OH
M _{tt} -U	Mtt-β-アラニン-OH

10

20

30

40

50

【 0 0 7 5 】

アミノ酸およびアミノ酸誘導体を、N-メチル-ピロリドンに溶解した。ペプチドをWang樹脂上で合成する(Wang, S. S., J Am Chem Soc 95 (1973) 1328-33)。樹脂を0.2~0.4 mmol/gで充填する。反応媒体としてのジメチルホルムアミド中のFmoc-アミノ酸誘導体に対して、ジメチルホ

ルムアミド中 4 当量のジシクロヘキシルカルボジイミドおよび 4 当量の N - ヒドロキシベンゾトリアゾールを用いてカップリング反応を 20 分間行なった。合成の各工程の後、ジメチルホルムアミド中 20% ピペリジンを用いて 20 分間 F - m o c 基を切断した。最後の分枝後、アミノ基に対して 4 当量の F m o c - アミノ酸が用いられるように、樹脂の量を選択した。分枝および続く 2 つの同一のアームの合成のために F m o c - L y s (F m o c) - O H を使用する。非対称な分枝を、F m o c - L y s (D d e) または F m o c - L y s (A l l o c) などの直交する側鎖保護基を有するアミノ酸誘導体により得る。文献中の公知の方法により (B y c r o f t , B . W . ら、J . C h e m . S o c . , C h e m . C o m m u n . 9 (1 9 9 3) 7 7 8 - 9 ; M e r z o u k , A . ら、T e t r a h e d r o n L e t t e r s 3 3 (1 9 9 2) 4 7 7 - 8 0) 、樹脂上でこれらの直交する保護基を切断する。固相上の末端アミノ基を、任意に無水酢酸または無水コハク酸を用いてアセチル化またはスクシニル化する。

【0076】

ハプテン、標識または官能基を、対応するアミノ酸誘導体が固相合成の間に安定である場合、樹脂上、例えばペプチドの N - 末端アミノ酸上にすでに導入しておいた。

【0077】

担体結合ペプチドの遊離の N - 末端アミノ基に、適切な活性エステル誘導体を介して、例えば金属キレート標識の導入を行なった。このために、遊離の第 1 級アミノ官能基当たり 4 当量のルテニウム (ビピリジル)₃ 錯体 (B P R u) を N - ヒドロキシベンゾトリアゾール / ジシクロヘキシルカルボジイミドを用いて活性化して少量の D M S O に溶解し、これを滴下して室温で 2 時間攪拌した。

【0078】

例えば、金属キレートまたはビオチン結合アミノ酸誘導体の直接取込みにより、ハプテンまたは標識を、固相合成の間にすでに C - 末端に導入しうる (W O 9 6 / 0 3 4 0 9 に記載されている) 。

【0079】

ペプチドを支持体から放出させ、トリフルオロ酢酸 20 ml、エタンジオール 0.5 ml、チオアニソール 1 ml、フェノール 1.5 g および水 1 ml を用いて、酸不安定性保護基を 40 分間室温で切断する。使用されるアミノ酸誘導体に依存して、少しのラジカルトラップを含むカクテルを使用することも可能である。次に、冷ジイソプロピルエーテル 300 ml を反応溶液に添加して、ペプチドを完全に沈澱させるために 0 で 40 分間保った。沈殿物を濾過し、ジイソプロピルエーテルを用いて洗浄し、少量の 50% 酢酸に溶解させ、凍結乾燥させた。適切なグラジエント (溶離剤 A : 水、0.1% トリフルオロ酢酸、溶離剤 B : アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸) をかけるデルタ - P A K R P C 1 8 (カラム 50 x 300 mm ; 100 ; 15 μ) 上の調製用 H P L C によって、得られた粗物質を約 120 分で精製した。質量分析によって、溶出した物質を同定した。

【0080】

固相合成により調製されたかかる化合物の例を、図 1 ~ 7 および図 16 に示す。

【0081】

代替的には、標識基 (標識)、エフェクター基 (ハプテン) または官能基はまた、樹脂からの切断後に導入されうる。このために、固相ペプチド合成の間ならびに切断の間に安定である保護基 (例えば、フェニルアセチル (P h a c)) を用いて、誘導体化されない他の基をブロックする必要がある。保護基は、P e n G アミダーゼを用いて酵素的に除去されうる (P C T / E P 9 5 / 0 2 9 2 1 に記載されている) 。

【0082】

P h a c を用いて保護された化合物の例を、図 8 に示す。

【0083】

実施例 2 : 分枝ペプチドリンカーへのマレインイミド官能基の導入
マレインイミド官能基を導入するために、実施例 1 のペプチドを、0.1 M リン酸カリウ

ム緩衝液 pH 7.0 に溶解し、DMSO 中 1 当量のマレインイミドヘキサノイル N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (MH = マレインイミドヘキサノイル) と混合して、25 で 16 時間攪拌した。調製物を調製用 HPLC (上記を参照のこと) により精製した。溶出した物質の同一性を、質量分析によって確認した。

【0084】

図 9 ~ 11 および図 17 に示される化合物を調製した。

【0085】

実施例 3 : 分枝ペプチドリンカーへの N - ヒドロキシスクシンイミドエステル基の導入実験を、WO 96 / 03409 の実施例 6 と類似のように行なった。

【0086】

図 12 に示す化合物を調製した。

【0087】

実施例 4 : 免疫学試験における分枝および帯電リンカーを有する金属錯体 - 抗原複合体の使用

HIV に対する特異的抗体を検出するために、二抗原架橋試験 (double antigen bridge test) を行なった。この方法において、測定対象の抗体に対するルテニウム標識抗原およびビオチン標識抗原と共に試料液体を、ストレプトアビジン被覆固相の存在下でインキュベートした。Electrochem (登録商標) システムを用いる電気化学発光によって固相上の標識を測定することにより、試料液体中の抗 HIV 抗体の存在を決定する。HIV 2 の gp 36 タンパク質の一部の配列 (配列番号 : 1) が、患者血清中の重要な抗体により認識される抗原性エピトープを含有することが公知である。

【0088】

SH 官能基リンカーを有し、N 末端で伸長した配列番号 : 1 を含有するペプチド (配列番号 : 2 および図 13) を、WO 96 / 03652 に記載されているように調製した。図 13 の 2 つのシステイン (C) の間の実線は、-SS- シスチン架橋を示す。

【0089】

マレインイミド - 活性化ルテニウム錯体を有する HIV ペプチドを誘導するために、0.1 mol / l リン酸カリウム緩衝液 pH 7.0 中で 2 時間室温にて、配列番号 : 2 のペプチド (図 13) を、それぞれマレインイミド活性化ルテニウムリンカーと複合体化した。調製用 HPLC またはゲルクロマトグラフィーのいずれかにより、非反応成分を分離した。精製産物を凍結乾燥した。

【0090】

化合物 A : gp 36 抗原を有する図 9 由来の BPRu リンカー

【0091】

化合物 B : gp 36 抗原を有する図 10 由来の BPRu リンカー

【0092】

化合物 C : gp 36 抗原を有する図 11 由来の BPRu リンカー

【0093】

化合物 D : gp 36 抗原を有する図 17 由来の BPRu リンカー

【0094】

配列番号 : 2 および種々のリンカーバリエーション (化合物 A ~ D) の 1 つを含有する複合体を、上記試験フォーマットを用いて評価した。同一の配列番号 : 1 の gp 36 エピトープを含有する同じビオチン標識ペプチド (図 14) を用いて、同じ濃度で、全評価を行なった。ビオチン標識捕捉抗原に対して等モルの濃度で標識検出抗原を使用した。

【0095】

図 15 に示される複合体を、PCT / EP 95 / 02921 に記載のようにして調製し、先行技術の標識参照抗原として使用した (表 2 ~ 4 における比較)。本発明の抗原を先行技術の抗原に対して等モル量で使用した。濃度は、0.018 nmol / l であった。

【0096】

図 15 の化合物と比較した複合体 A および C を用いた実験の結果を、表 2 に ECL カウ

10

20

30

40

50

ントで示す。一定の陽性シグナルを有するかなり低いブランク値が、本発明のリンカーを使用することによってのみ得られ、それは、したがって、陽性シグナルと陰性シグナルの間の良好な区別を生じることが、見出されうる。これらの改善された信号対雑音比は、測定範囲の改善をもたらす。

【0097】

【表2】

表2:

実験	比較	A	C
陰性試料	6014	2044	1975
陽性試料	345247	484681	391007
陽性/陰性比	57.5	237.1	198

10

【0098】

図15の化合物と比較した複合体Bを用いた実験の結果を、表3にECLカウントで示す。分枝リンカーの有利な効果がまた、ブランク値の有意な増加なしに数個の標識の導入を可能にすることが見出されうる。陽性シグナルは消えず、測定カウントにおける増加さえ観察されることもまた、驚くべきことである。

20

【0099】

【表3】

表3:

実験	比較	B
陰性試料	6096	2366
陽性試料	393197	765298
陽性/陰性比	64.5	323.5

30

【0100】

表4は、図15の化合物と比較した複合体Dを用いた実験からの結果をECLカウントで示す。驚くべきことに、非帯電分枝親水性リンカーもまた、ブランク値に対して正の効果をも有する。信号対雑音比が改善される。

40

【0101】

【表4】

表 4:

実験	比較	D
陰性試料	6718	2015
陽性試料	553816	759947
陽性/陰性比	82.4	377.1

10

【0102】

実施例 5：抗体断片複合体の調製

1. 手順の説明

I g G 由来の F a b ' の調製

モノクローナル抗 D i g 抗体をペプシンにより切断し、F (a b ')₂ - 断片を形成した。定量的な切断後、pH を上げてペプスタチンを添加することによりペプシンを不活性化した。予め精製することなく、システアミンにより F (a b ')₂ を F a b ' に分解した (r e d u c e d) 。システアミンは、ほとんど選択的にヒンジ領域のジスルフィド架橋を切断する。次に、それを透析した。これにより、ペプシンにより生じた F c 切断産物のほとんどは、それらが透析チューブの孔を通過するのに十分小さいので (> 10,000 ダルトン)、除去される。

20

【0103】

F a b ' - B P R U リンカー複合体

過剰の B P R u - リンカー - M H と F a b ' を反応させることにより、複合体合成を行った。このプロセスにおいて、ヒンジ領域の S H 基が主に変換した。軽鎖および F d 鎖の分解した分子内ジスルフィド架橋の結果最も起こりやすい副反応として、少量の多ルテニウム標識 (p o l y r u t h e n y l a t e d) F a b ' を形成した。

30

【0104】

粗複合体の精製

粗複合体を分子ふるいによって精製した。このプロセスにおいて、一ルテニウム標識物質を多ルテニウム標識物質から分離した。

【0105】

2. 手順

F (a b ')₂ を形成するための抗体の切断

モノクローナル抗体抗 - D I G - M 19 . 11 I g G の凍結乾燥物 (l y o p h i l i s a t e) を、20 mg / ml の濃度を得るために、H₂O を用いて再構築した。溶液 1 ml 当たり 20 μl の 1 M クエン酸塩 pH 3 . 5 を添加した (クエン酸塩の最終濃度 = 20 mM) 。pH を H C l を用いて 3 . 60 に調整した。それを 0 . 45 μm フィルターを通して濾過した。濃度を O D_{280nm} で決定した (1 O D_{280nm} = 1 . 4 mg / ml) 。それを、20 mM クエン酸塩 pH 3 . 60 を用いて 10 mg / ml に調整した。溶液を水浴中で 37 に加熱した。抗体溶液 1 ml 当たり 100 μl ペプシン溶液 (3 mg / ml) を添加し、水浴中で 37 にてインキュベートした。完全な切断後、pH 値を上げ、ペプスタチンを添加することにより、反応を停止した。

40

【0106】

F a b ' への分解

50

切断混合物 1 ml 当たり 52.6 μ l の 0.1 M ジチオトレイトール (DTT) を添加し、水浴中で 25℃ にて 30 分間インキュベートした。0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{NaOH}$ pH 6.5、30 mM NaCl 、2 mM EDTA に対して、Fab' を透析した。

【0107】

Fab' - BPRu - リンカー複合体の合成

BPRu - リンカー - MH を DMSO 中に溶解した。化学量論的 Fab' : BPRu - リンカー - MH は、1 : 3 (モル/モル) であった。混合物における Fab' の最終濃度は、3.9 mg/ml であった。混合物における DMSO の最大濃度は、10% であった。反応時間は、室温にて 1 時間であった。

10

【0108】

精製

粗複合体を、AMICON PM 10 を使用して 2 ~ 3 倍濃縮し、Superdex 200 によって精製した (緩衝液: 25 mM MOPS / NaOH pH 6.5, 50 mM NaCl , 10% DMSO、適用量: ゲル床の最大 1.5%、画分: ゲル床の 0.5%)。Fab' - BPRu - リンカー複合体を含む画分をプールした。

【0109】

実施例 6: 免疫学試験における分枝および帯電リンカーを有する金属錯体 - 抗体断片複合体の使用

HIV に対する特異的抗体を検出するために、二抗原ブリッジ試験を行なった。この方法において、測定対象の抗体に対するビオチン標識抗原およびジゴキシゲニン標識抗原と共に試料液体を、ストレプトアビジン被覆固相および抗-Dig-BPRu 抗体の存在下でインキュベートした。Electrochem (登録商標) システムを用いる電気化学発光によって固相への二抗原ブリッジを介して結合した標識を測定することにより、試料液体中の抗 HIV 抗体の存在を決定した。

20

【0110】

HIV 1 の gp41 領域由来の HIV ペプチド (配列番号: 3) を N 末端で標識し、抗原として用いた。ビオチン標識抗原およびジゴキシゲニン標識抗原の調製は、PCT/EP 95/02921 に記載されている。2つの抗-Dig-BPRu 複合体を、ルテニウム標識 gp41 ペプチドの検出に使用した。

30

【0111】

化合物 E: リンカー無しの抗-Dig-IgG-BPRu

【0112】

化合物 F: 図 9 のリンカーを有する抗-Dig-Fab' - BPRu

【0113】

抗原を 20 ng/ml の濃度の等モル量で使用した。

【0114】

化合物 F と比較した化合物 E を用いた実験の結果を、表 5 に示す。ジゴキシゲニン標識抗原および抗体複合体 (濃度 180 ng/ml) をプレインキュベートした。本発明のリンカーの使用により、陽性シグナルと陰性シグナルの間の良好な区別に関連するかなり低いブランク値を生じることが見出されうる。これは、正規化された値から容易に見出される (表 5/2)。

40

【0115】

【表 5】

表 5:

実験 [カウント]	BPRu 複合体無し =システムブランク値	化合物 E	化合物 F
陰性試料	441	2117	582
陽性試料 1	437	1215275	668410
陽性試料 2	453	49187	25819

10

表 5/2:

実験 (陰性試料に対して 正規化)	BPRu 複合体無し =システムブランク値	化合物 E	化合物 F
陰性試料	1.0	1.0	1.0
陽性試料 1	0.99	574.1	1148.5
陽性試料 2	1.03	23.1	44.4

20

【 0 1 1 6 】

表 6 では、抗体複合体（濃度 600 ng/ml）を添加する前に、結合した免疫錯体を有する磁気ビーズを洗浄するように試験手順を変更した。この場合もまた、ブランク値はかなり低く、このことは、改善された区別に関連した。改善された信号対雑音比は、特に表 6 / 2 から明らかであり、この値は、陰性試料を用いて測定したシステムブランクに対して正規化されている。

30

【 0 1 1 7 】

【 表 6 】

表 6:

実験 [カウント]	BPRu 複合体無し =システムブランク値	化合物 E	化合物 F
陰性試料	464	2771	758
陽性試料 1	453	1503690	686607
陽性試料 2	480	47040	27133

40

50

表 6/2:

実験 陽性/陰性血清	BPRu 複合体無し =システムブランク値	化合物 E	化合物 F
陰性試料	1.0	1.0	1.0
陽性試料 1	0.98	592.6	905.8
陽性試料 2	1.03	17.0	35.8

10

【 0 1 1 8 】

表 7 は、ストレプトアビジン固相への抗体複体の非特異的結合を示す。この「試験手順」において、緩衝液のみを使用し、ビオチン標識抗原もジゴキシゲニン標識抗原も使用しなかった。ルテニウム標識抗体複体の濃度は、600 ng/ml であった。本発明のリンカーはまた、改善されたブランク値を示す。

【 0 1 1 9 】

20

【 表 7 】

表 7:

実験 [カウント]	BPRu 複合体無し =システムブランク値	化合物 E	化合物 F
陰性試料	333	3188	566
緩衝液	329	983	436

30

【 0 1 2 0 】

実施例 7 : さらなる複体の調製

1 . テストステロン誘導体 (図 1 8) の合成

約 2 ml のリン酸緩衝液 pH 8 . 5 に、8 . 5 mg の B P R u - リンカー - NH₂ (図 1) を溶解し、ジオキサン 2 ml に溶解した 1 . 8 mg の活性化テストステロン誘導体 (テストステロン - 3 - ジメチル - カルボキシオキシム - NHS) を滴下した。それを光を遮断して 6 時間室温で攪拌した。

40

【 0 1 2 1 】

調製用 H P L C により、粗生成物を精製する。分子量を、質量分析 (M A L D I) により 3 1 8 0 と確認した。

【 0 1 2 2 】

2 . T 3 誘導体 (図 1 9) の合成

7 . 1 . と同様に合成を行なった。MS - M A L D I は、予期される分子量に対応した。

【 0 1 2 3 】

3 . P E G - L y s - M P - g p 3 6 誘導体 (図 2 0) の合成

ルテニウム錯体のリジン誘導体で開始し、マレインイミド - プロピオン酸 - (M P) - NHS エステルを用いる従来法により、第一段階でリジンの遊離の - アミノ基を反応

50

させた。次に、カルボン酸を、標準法により活性化させた。

【0124】

次の工程では、3.64 mgの活性エステルを25.5 mgのアミノ修飾ポリエチレングリコールH₂N-PEG-OCH₃-5000 (Shearwater) と20 mlアセトニトリル中室温で反応させた。生成物の混合物を、ロータリーエバポレートし、ゲルクロマトグラフィーにより精製した(MALDIは、予期した分子量に対応した)。

【0125】

すでに記載した方法と同様にして、gp36-ペプチドへのマレインイミドのさらなる結合を行なった。質量分析を用いて決定した分子量は、予期した分子量6990に対応した。

10

【0126】

4. 蛍光染料標識分枝リンカー(図23)の合成

Mtt-保護分枝ペプチドリinker(図21)を、標準手順により合成する。

【0127】

具体的にはAletras A.ら、Int. J. Peptide Res. (1995) 45, 488に記載の方法により、Mtt保護基を切断し、固相に結合した図22のリンカーを得た。

【0128】

単一の非保護N末端アミノ基を有する分枝リンカー分子(図22)を結合した固相50 mgを4 mlのDMFに懸濁させた。その後、10 μlのトリエチルアミンおよび活性化蛍光標識(16 mg)を添加し、固相結合リンカーに複合体化させた(活性化標識であるローダミン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの合成は、DE4137934に記載されている)。反応混合物を12時間室温で攪拌した。

20

【0129】

標準条件下での固相からの切断後(トリフルオロ酢酸95%)、調製用HPLCを用いて精製を行なった。

【0130】

21 μlのトリエチルアミンを含む10 mlのDMF中での16 mgの中間体と18.5 mgのジスクシンイミジルスベレート(DSS)との5時間の反応および標準的な精製は、7 mgの生成物(図23に示されるNHS-活性化ローダミン標識分枝リンカー)をもたらした。これをMALDI-TOFにより解析し、分子量が理論値に対応することを見出した。

30

【0131】

実施例8: アクリジニウム標識分枝リンカー構造

1. アクリジニウムエステル標識分枝リンカー

4 mlのDMFに溶解した50 mgの固相結合リンカー(図22を参照)に、13 mgのアクリジニウムエステル誘導体(EP82636に従って合成)を添加し、実施例7.4に記載のように反応させた。

【0132】

アクリジニウム標識リンカーを調製用HPLCにより精製し、凍結乾燥させた。

40

【0133】

生成物の収量が7 mgであることを見出した。

【0134】

生成物(図24を参照)をMALDI-TOFにより解析し、分子量が理論値に対応することを見出した。

【0135】

2. アクリジニウムスルホニル標識分枝リンカーの合成

アクリジニウム標識分枝固相結合化合物を、実施例7.4に記載のように合成する(アクリジニウムスルホンアミドの合成は、US5,543,524を参照)。固相からの切断および精製の後(上記参照)、1 mlのDMF中でペプチドリinker(4 mgのり

50

ンカー) の遊離の C 末端アミノ基を、0.7 mg のマレイミドプロピオニル - オキシスクシンイミドエステル (MPS) と反応させ (室温、150 時間)、調製用 HPLC により精製する。

【0136】

生成物の収量が 2 mg であることを見出した。

【0137】

生成物 (図 25 を参照) を MALDI - TOF により解析し、分子量が理論値に対応することを見出した。

【0138】

MPS - 活性化アクリジニウムスルホンアミド標識リンカーを SH 基に複合体化する。この実施例において、TSH (甲状腺刺激ホルモン) を使用し、標準プロトコルに従ってカップリングを行なった (Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996, p. 456 ff を参照)。

【0139】

TSH に対する二段免疫アッセイ (two step immunoassay) を用いる比較研究において (第 1 抗体と試料のインキュベーション後に洗浄工程を有する)、本実施例の TSH - 複合体をリンカー無しの TSH - 複合体と比較した。表 8 において TSH 濃度を $\mu\text{IU/ml}$ として示す。Cal 1 および Cal 2 は市販品の Roche Diagnostics 発注番号 TSH Cal Set: Id. Nr: 173148 3 であり、Tris (100 mM Tris、1% BSA、0.1% Thesit、0.1% Oxaban、pH 7.4) で示される試料は、1 ml 当たりそれぞれ 0 および 50 μIU TSH を含有する。

【0140】

【表 8】

表 8:

	TSH $\mu\text{IU/ml}$	信号対雑音比 (リンカー無し)	信号対雑音比 (リンカー有り)
Cal1	0		
Cal2	1.43	2	7
Tris 0	0		
Tris 50	50	17	127

【0141】

表 8 から、本発明の分枝リンカーを含有する TSH - 複合体は、かかるリンカー無しの複合体と比較して信号対雑音比に関して有意な改善を示す。

【0142】

参考文献の表

Aletras A ろ, Int. J. Peptide Res. (1995) 45, 488
 Aslam M., Dent A., Bioconjugation (1998) Mcmillan Reference Ltd., London, p 95 ff
 Bredehorst, R. ろ, Anal Biochem 193 (1991)272-9
 Bycroft, B.W. ろ, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 9 (1993) 778-9
 Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996, p. 456 ff
 Merzouk, A. ろ, Tetrahedron Letters 33 (1992) 477-80
 Pope, A. J. ろ, Drug Discov Today 4 (1999) 350-362
 Wang, S.S., J Am Chem Soc 95 (1973) 1328-33

10

PCT/EP95/02921

DE 4137934

DE 44 30 998.8

EP 0 061 888

EP 0 178 450

EP 0 255 534

EP 0 580 979

EP 0 618 192

US 5,519,142

WO 87/06706

20

WO 90/05301

WO 90/11511

WO 92/14138

WO 96/03409

WO 96/03410

WO 96/03652

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明の化合物を示す。

30

【図 2】

図 2 は、本発明の化合物を示す。

【図 3】

図 3 は、本発明の化合物を示す。

【図 4】

図 4 は、本発明の化合物を示す。

【図 5】

図 5 は、本発明の化合物を示す。

【図 6】

図 6 は、本発明の化合物を示す。

40

【図 7】

図 7 は、本発明の化合物を示す。

【図 8】

図 8 は、本発明の化合物を示す。

【図 9】

図 9 は、本発明の化合物を示す。

【図 10】

図 10 は、本発明の化合物を示す。

【図 11】

50

図 1 1 は、本発明の化合物を示す。

【図 1 2】

図 1 2 は、本発明の化合物を示す。

【図 1 3】

図 1 3 は、参照抗原のアミノ酸配列を示す。

【図 1 4】

図 1 4 は、参照抗原のアミノ酸配列を示す。

【図 1 5】

図 1 5 は、参照抗原のアミノ酸配列を示す。

【図 1 6】

図 1 6 は、本発明の化合物を示す。

【図 1 7】

図 1 7 は、本発明の化合物を示す。

【図 1 8】

図 1 8 は、本発明の化合物を示す。

【図 1 9】

図 1 9 は、本発明の化合物を示す。

【図 2 0】

図 2 0 は、本発明の化合物を示す。

【図 2 1】

図 2 1 は、図 2 3 ~ 2 5 の複合体を作製するのに使用した固相結合分枝リンカー (M t t - 保護基有りおよびアミノ酸側鎖上に保護基有り) を示す。

【図 2 2】

図 2 2 は、図 2 3 ~ 2 5 の複合体を作製するのに使用した固相結合分枝リンカー (M t t - 保護基無しおよびアミノ酸側鎖上に保護基有り) を示す。

【図 2 3】

図 2 3 は、本発明の化合物を示す。

【図 2 4】

図 2 4 は、本発明の化合物を示す。

【図 2 5】

図 2 5 は、本発明の化合物を示す。

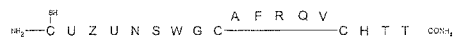
10

20

30

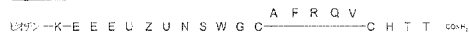
【 図 13 】

Figure 13:



【 図 14 】

Figure 14:



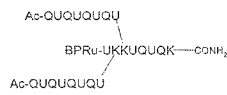
【 図 15 】

Figure 15:



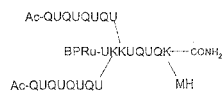
【 図 16 】

Figure 16:



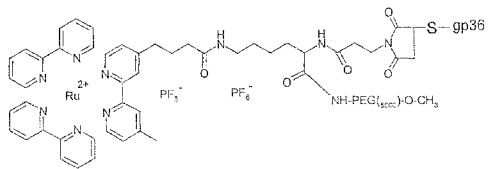
【 図 17 】

Figure 17:



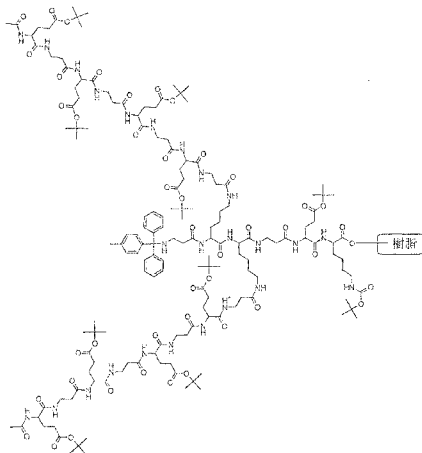
【 図 20 】

Figure 20: ルテニウムおよび gp36-標識親水性(PEG5000)リンカー



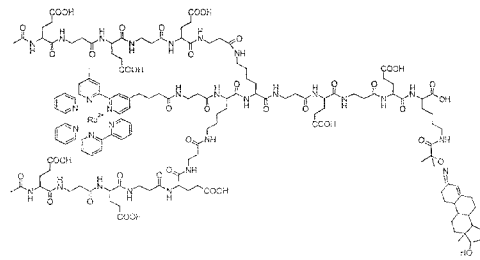
【 図 21 】

Figure 21: 固相結合分枝リンカー(保護基を有する)



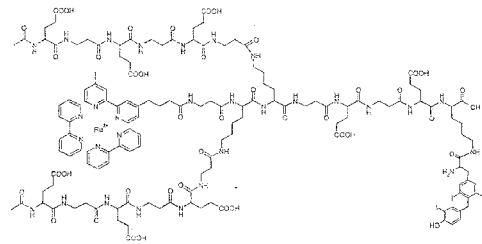
【 図 18 】

Figure 18:



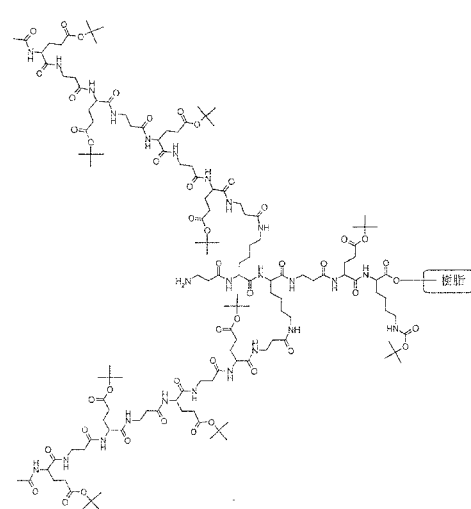
【 図 19 】

Figure 19:



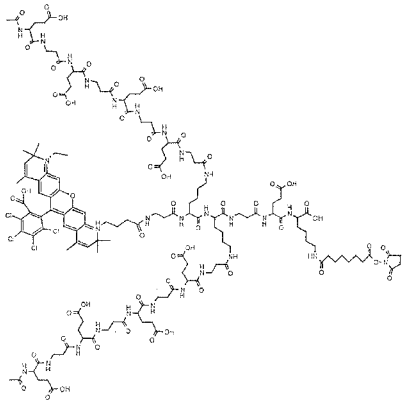
【 図 22 】

Figure 22: 保護アミノ酸側鎖およびリシンの非保護ε-アミノ基を有する分枝リンカー



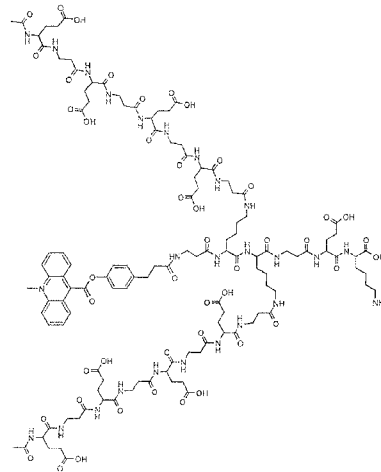
【 図 2 3 】

Figure 23: NHS 活性化ローダミン標識分枝リンカー



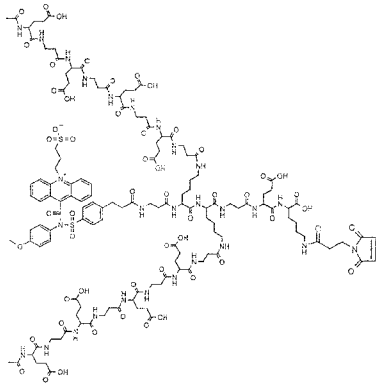
【 図 2 4 】

Figure 24: アクリジニウムエステルで標識された分枝リンカー



【 図 2 5 】

Figure 25: 標識としてアクリジニウムスルホン塩基誘存するMPS 活性化分枝リンカー



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 April 2002 (04.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/27315 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53
- (21) International Application Number: PCT/EP01/11118
- (22) International Filing Date:
26 September 2001 (26.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
100 48 417.4 29 September 2000 (29.09.2000) DE
- (71) Applicant (for DE only): ROCHE DIAGNOSTICS
GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, 68305
Mannheim (DE).
- (71) Applicant (for all designated States except DE, US): F.
HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacher-
strasse 124, CH-4070 Basel (CH).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): ANDRES, Her-
bert [DE/DE]; Kapellenwiese 39, 82377 Penzberg (DE).
JOSEL, Hans-Peter [DE/DE]; Ulmenstrasse 28, 82362
Weilheim (DE). HOESS, Eva [DE/DE]; Zitzelsberg-
erstrasse 13a, 81476 Muenchen (DE). HERRMANN,
Rupert [DE/DE]; In der Au 23, 82362 Weilheim (DE).
VON DER ELTZ, Herbert [DE/DE]; In der Au 21, 82362
Weilheim (DE).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for the following designation US
- of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

Published:

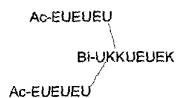
- without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/27315 A2

(54) Title: COMPOUNDS WITH A BRANCHED LINKER



(57) Abstract: The present invention concerns new compounds comprising a branched linker and their use for producing conjugates for applications in diagnostic or therapeutic methods.

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

Compounds with a branched linker

The present invention concerns new linkers and their use for producing conjugates for applications in diagnostic or therapeutic methods.

5 Conjugates comprising several binding groups or/and effector groups e.g. labeling or solid phase binding groups or toxins are often used in diagnostic or therapeutic methods. Such conjugates can be prepared by direct coupling or by using the bridge or linker structures known in the prior art. Interfering intramolecular and intermolecular interactions between the conjugate partners or other components are often disadvantageous for the properties of such conjugates.

10 In diagnostic tests these undesired intramolecular and intermolecular interactions often lead to an impairment of important assay parameters such as the dynamic range of the signal, signal-to-noise ratio, breadth of the measuring range, blank value, lower limit of detection and thus to a considerable impairment of the assay. In therapeutic procedures the interactions in turn result in a reduction of efficacy or of target specificity.

15 The use of linkers that are known in the prior art for the conjugation of luminescent metal complexes (EP-A-0 178 450, EP-A-0 580 979, WO 87/06706) for example leads to a worsening of the dynamic range of an assay. Other disadvantages of such conjugates are a high unspecific binding to proteins and high blank values. However, similar problems also occur with other labeling and solid phase binding groups.

20 WO 96/03409 and WO 96/03410 disclose that the introduction of free positive or/and negative charge carriers in the linkers that link the reactive coupling group of the metal complex to one of the ligands or the introduction of hydrophilic groups into these luminescent metal complexes reduces the unspecific adsorption of conjugates of these complexes and thus improves the test sensitivity as well as the stability and recovery of the conjugates in immunoassays. Moreover in some cases it is possible to achieve an increase in
25 quantum yield.

Breddehorst, R., et al., Anal Biochem 193 (1991) 272-9 describe a trifunctional hapten-fluorophore conjugate which contains the 21 amino acid residues of the insulin A chain molecule as a backbone. The insulin A chain thus working as a linker between the fluorescent and hapten groups is a linear linker and not a branched linker.

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 2 -

In recent investigations it was found that the use of hydrophilic or charged linkers according to WO 96/03409 or WO 96/03410 results in considerable advantages in test performance but even when using such complexes the blank value is considerably higher than the blank value of the system. Hence a further reduction of the blank value by reducing unspecific binding would be desirable. In addition unspecific intramolecular and intermolecular interactions between the labeling group and other test components should be reduced without adversely affecting the signal yield and the accessibility of the labeling group.

It was surprisingly found that the said disadvantages can be eliminated by using branched linkers with charged carriers or/and hydrophilic groups especially in the side chains. These branched linkers also result in improvements in other types of conjugates used in diagnostic or therapeutic methods or for screening purposes.

Hence a subject matter of the present invention is the use of a polyfunctional compound of the general formula (I):



in which Z denotes at least one reactive functional group or a binding group, X is a reactive functional group which is bound covalently to Z via a linker Y where the linker is a branched linker which has a molecular weight of ≥ 1000 Da and contains at least one charge carrier or/and at least one hydrophilic group, n is an integer from 1 to 10 and preferably from 1 to 4 and m is 1 or 2 and preferably 1, for the production of conjugates.

The group Z can occur once or several times and can in each case be independently a reactive functional group or a binding group. Examples of binding groups are labeling groups or effector groups. Effector groups are for example partners of a bioaffine binding pair which can specifically interact with the other partner of the bioaffine binding pair.

The labeling groups can be selected from any detectable known groups such as dyes, luminescent labeling groups such as chemiluminescent groups e.g. acridinium esters or dioxetanes or fluorescent dyes e.g. fluorescein, coumarin, rhodamine, oxazine, resorufin, cyanine and derivatives thereof. Other examples of labeling groups are luminescent metal complexes such as ruthenium or europium complexes, enzymes as used for CEDIA (Cloned Enzyme Donor Immunoassay, e.g. EP 0 061 888), microparticles or nanoparticles e.g. latex particles or metal sols, and radioisotopes.

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 3 -

In a preferred embodiment the labeling group is a luminescent metal complex and the compound has a structure of the general formula (II):



in which M is a divalent or trivalent metal cation selected from rare earth or transition metal ions, L₁, L₂ and L₃ are the same or different and denote ligands with at least two nitrogen-containing heterocycles in which L₁, L₂ and L₃ are bound to the metal cation via nitrogen atoms, X is a reactive functional group which is covalently bound to at least one of the ligands L₁, L₂ and L₃ via a linker Y, n is an integer from 1 to 10, preferably 1 to 4, m is 1 or 2 and preferably 1 and A denotes the counterion which may be required to equalize the charge.

The metal complex is preferably a luminescent metal complex i.e. a metal complex which undergoes a detectable luminescence reaction after appropriate excitation. The luminescence reaction can for example be detected by fluorescence or by electrochemiluminescence measurement. The metal cation in this complex is for example a transition metal or a rare earth metal. The metal is preferably ruthenium, osmium, rhenium, iridium, rhodium, platinum, indium, palladium, molybdenum, technetium, copper, chromium or tungsten. Ruthenium, iridium, rhenium, chromium and osmium are particularly preferred. Ruthenium is most preferred.

The ligands L₁, L₂ and L₃ are ligands with at least two nitrogen-containing heterocycles. Aromatic heterocycles such as bipyridyl, bipyrazyl, terpyridyl and phenanthrolyl are preferred. The ligands L₁, L₂ and L₃ are particularly preferably selected from bipyridine and phenanthroline ring systems.

The complex can additionally contain one or several counterions A to equalize the charge. Examples of suitable negatively charged counterions are halogenides, OH⁻, carbonate, alkylcarboxylate, e.g. trifluoroacetate, sulphate, hexafluorophosphate and tetrafluoroborate groups. Hexafluorophosphate, trifluoroacetate and tetrafluoroborate groups are particularly preferred. Examples of suitable positively charged counterions are monovalent cations such as alkaline metal and ammonium ions.

On the other hand the group Z can be an effector group which interacts specifically and preferably non-covalently with a binding partner. Examples of suitable binding partners are hapten or antigen/antibody, biotin or biotin analogues such as aminobiotin, iminobiotin or

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 4 -

desthiobiotin/avidin or streptavidin, sugar/lectin, nucleic acid or nucleic acid analogue/complementary nucleic acid, receptor/ligand e.g. steroid hormone receptor/steroid hormone in which one partner of the binding pair is the effector group and thus a component of compound (I).

- 5 In a further preferred embodiment Z can also be a therapeutically active substance e.g. a toxin or protoxin e.g. an anti-tumour substance.

The compounds (I) are used as linker molecules to prepare conjugates. In this process a binding partner and in particular a binding partner as stated above is coupled covalently to the at least one free functional group of the compound (I).

- 10 The resulting coupling product contains at least two, preferably different, binding groups which are linked together via the branched linker Y.

- The reactive functional group X or Z of the compound (I) or of the complex (II) is a reactive group which can be coupled covalently to a biological substance. The group X is preferably an activated carboxylic acid group such as a carboxylic acid halogenide, a carboxylic acid anhydride, a carboxylic acid hydrazide, a carboxylic acid azide or an active ester e.g. an N-hydroxy-succinimide, a p-nitrophenyl, pentafluorophenyl, imidazolyl or N-hydroxybenzotriazolyl ester, an amine, a maleimide, a thiol or a photoactivatable group e.g. an azide. The compound can contain one or several functional groups X or Z which can be the same or different. X and Z are preferably different. If Z is a functional group, it preferably only occurs once. If Z is a binding group, it can be present several times e.g. up to 10 times. The functional groups or binding groups Z, respectively can be the same or different and be optionally blocked by protective groups. However, the total number of groups X plus Z is at least 2 i.e. the compound is at least a bifunctional compound, preferably at least a hetero-bifunctional compound. Appropriate active groups for hetero-bifunctional linkers are described in Aslam M., Dent A., Bioconjugation (1998) Mcmillan Reference Ltd., London, p 216-363.
- 15
20
25

- The molecular weight of the linker is at least 1000 Da, because then the advantages of the linker become particularly apparent. The molecular weight of the linker is preferably in the range of 1000 to 50,000 Da, particularly in the range of 1000 to 20,000 Da and most preferably in the range of 1000 to 10,000 Da.
- 30

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 5 -

The compound (I) and the metal complex (II) differ from the prior art in that the linker Y between X and Z is a branched linker with at least one charge carrier or/and at least one hydrophilic group. In the sense of the present invention the term "charge carrier" means a group which is present mainly in an ionic form at a pH value in the range 6 to 8. The linker
5 preferably contains up to 70, particularly preferably 1 to 40 and most preferably 2 to 20 such charge carriers.

The linker particularly preferably contains at least one negative charge carrier. Examples of suitable negative charge carriers are phosphate, phosphonate, sulphinate, sulphonate, sulphate and carboxylate groups, carboxylate groups and phosphate groups being most
10 preferred.

Examples of positive charge carriers are amino and mono-substituted or polysubstituted amino groups such as mono-, di- or trialkyl amino groups, in which alkyl denotes a straight-chained or branched alkyl residue with 1 to 6 C atoms or a cyclic alkyl residue with 3 to 6 C atoms. The positive charge carriers are particularly preferably selected from basic amino acids such as lysine or substituted amino acids such as diethyllysine, or dipropyllysine. Amines and substituted amines can also be used as electron donors for the detection of metal complexes by electrochemiluminescence.
15

The linkers can also contain uncharged hydrophilic groups as an alternative to or in addition to the charge carriers. Preferred examples of uncharged hydrophilic groups are
20 ethylene oxide or polyethylene oxide groups with preferably at least three ethylene oxide units, sulfoxide, sulphone, carboxylic acid amide, carboxylic acid ester, phosphonic acid amide, phosphonic acid ester, phosphoric acid amide, phosphoric acid ester, sulphonic acid amide, sulphonic acid ester, sulphuric acid amide and sulphuric acid ester groups. The amide groups are preferably primary amide groups, particularly preferably carboxylic acid amide residues in amino acid side groups e.g. the amino acids asparagine and glutamine.
25 The esters are preferably derived from hydrophilic alcohols, in particular C₁-C₃ alcohols or diols or triols.

In the sense of the present invention the term "branched" means that the linker contains a main chain between the groups Z and X and in addition one or several side chains starting
30 from the main chain. The charge carriers and hydrophilic groups can be located in the main chain or/and in a side chain. If the linker according to the invention contains several groups Z and X, the main chain itself can already be branched. However, the linker in any case additionally contains one or several side chains which contain none of the groups Z

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 6 -

and X. The number of side chains is preferably 1 to 10, particularly preferably 2 to 6 and most preferably 2 to 4.

In a preferred embodiment of the invention the linker contains a main chain which contains one or several uncharged hydrophilic groups as mentioned above in particular
5 carboxylic acid amide groups or/and polyethylene glycol groups while there is at least one charge carrier in one or several of the side chains. In this case 1 to 10 charge carriers and in particular 1 to 5 charge carriers can for example be present per side chain. Alternatively the linker can also contain charge carriers in the main chain and uncharged hydrophilic groups
10 in one or several side chains. Furthermore embodiments are also conceivable in which the main chain and the side chains contain uncharged hydrophilic groups as well as charge carriers.

In case the branched linker comprises groups other than X and Z, which might interfere with the intended coupling chemistry, e.g., like $-COO^-$ groups or $-NH_2$ groups, appropriate protective groups, which are known to the skilled artisan are used during synthesis and/or
15 coupling. Terminal $-NH_2$ groups in peptidic side chains preferably are inactivated, e.g., by acetylation or succinylation.

The length of the main chain of the linker is preferably 7 to 200 atoms, particularly preferably 7 to 100 atoms. The main chain is an alkylene chain modified by the incorporation of heteroatoms e.g. O atoms or amide groups and contains at least one
20 branch site. The side chains formed at the branching site preferably having a length of 4 to 100 atoms.

The charge carriers are preferably located in the linker in such a manner that a H atom of an alkylene unit of the main chain or/and in a side chain is replaced by a group containing a charge carrier e.g. NH_3^+ or CO_2^- .

25 The branched linker which contains the free charge carriers or/and hydrophilic groups is preferably at least partially composed of aminocarboxylic acid units that are linked together by peptide bonds. In such a linker the branching points can be derived from polyfunctional aminocarboxylic acids which contain at least three functional groups e.g. amino or carboxylate groups such that one functional group is still present after incorporation into
30 the main chain which can be used as the starting point for the synthesis of the side chain. The branches are particularly preferably generated with diaminocarboxylic acids such as lysine, ornithine, hydroxylysine etc.

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 7 -

The charge carriers of the branched linker can be preferably derived from free positively or/and negatively charged groups of polyfunctional amino-carboxylic acids which contain a total of at least three charged groups e.g. amino, carboxylate or phosphate groups such that after incorporation into the linker and the concomitant reaction of two of the charged
5 groups, at least one free charge carrier is still present. For example the charge carriers can be derived from trifunctional aminocarboxylic acids which contain (a) an amino group and two carboxylate groups or (b) two amino groups and one carboxylate group. Examples of such trifunctional aminocarboxylic acids are lysine, ornithine, hydroxylysine, aspartic acid and glutamic acid, symmetric trifunctional carboxylic acids like those described in EP 0 618
10 192 or US 5,519,142. Alternatively one of the carboxylate groups in the trifunctional aminocarboxylic acids (a) can be replaced by a phosphate, sulphonate or sulphate group. An example of such a trifunctional amino acid is phosphoserine.

Alternatively the branched linker can also be composed at least partially of phosphate-sugar units e.g. a DNA backbone without nucleobases or composed of glyco-peptidic structures.
15 Furthermore the linker can also be composed at least partially of saccharide units. In any case the side chain of the linker is preferably situated at a branch site of the main chain which is formed by a trifunctional unit and the length of a side chain is at least two of the building blocks used for the synthesis e.g. natural or synthetic amino acids or other components such as ethylene glycol.

20 Preferably, the branched hydrophilic linker is used in immunological procedures to reduce problems caused by non-specific binding.

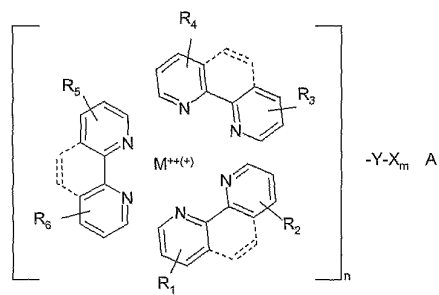
It has been found advantageous to use non-naturally occurring amino acids and non-naturally occurring sequence motives, like e.g., the di-peptides UE or UQ to construct a linker molecule according to the present invention. This has proven especially
25 advantageous in serological assays, i.e. in assays set up to detect antibodies in patient sera. Linkers with non-naturally occurring β -amino acids have proven rather stable against proteases, e.g., against proteases in serum or plasma, and therefore represent a further preferred embodiment of the present invention.

In one embodiment of the present invention the branched linker comprising a metal
30 complex has the general formula (III):

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 8 -

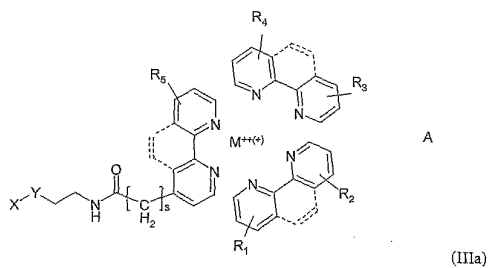


in which M, X, A, n and m are defined as above, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ and R₆ are the same or different and each denotes one or several substituents provided that X is bound to one of the ligands via one of the substituents R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ or R₆ and the linker Y.

The ligands of the complex are optionally substituted phenanthroline or bipyridene systems depending on whether the groups denoted by the broken lines are present or not.

The substituents R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ and R₆ on the ligands are preferably hydrogen, C₁-C₅ alkyl, in particular C₁-C₃ alkyl, phenyl or a hydrophilic group as defined above provided they do not contain the linker Y.

In a particularly preferred embodiment the branched linker comprising a metal complex has the general formula (IIIa):



WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 9 -

in which M, X and A are defined as above, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ are as defined above, s is an integer from 0 to 6 preferably from 1 to 4 and Y denotes the branched linker with free charge carriers or/and hydrophilic groups.

5 Examples of compounds of formula (I) with metal complexes as labeling groups or biotin as an effector group and the amino side group of lysine as the reactive functional group are shown in figs. 1-7. The branching points of the linker are formed by the trifunctional amino acid lysine which has two amino groups and one carboxylate group. One amino group and one carboxylate group are used to form peptide bonds in the main chain of the linker whereas the second amino group is used as the starting point for the synthesis of the side chain. The free charge carriers are formed from glutamic acid side chains. In Fig. 8 the lysine amino group is blocked by phenylacetyl (Phac). The blocking of one or several reactive groups in the linker by protective groups e.g. phenylacetyl or/and other protective groups compatible with the overall structure also enables labile binding groups to be introduced into the compound (I).

15 The reactive carboxylate group can for example be converted into an active ester by reaction with N-hydroxysuccinimide or disuccinimidyl suberate (DSS) (see Fig. 12). Alternatively the primary amino group can also be converted into a maleimide group by reaction with maleimidohexanoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MHS) (see figs. 9 - 11).

20 The preparation of the compounds according to the invention is described in detail in the following using metal complexes as an example. Other compounds that for example contain biotin or peptide antigens as the effector group can be prepared in an analogous manner.

25 The synthesis of a charged and branched linker on a labeling group or solid phase binding group such as the N-heterocyclic ligand of a metal complex can be carried out as a coupling reaction in solution by coupling an optionally partially protected aminocarboxylic acid to a reactive group of the ligand e.g. a carboxylic acid. This coupling stage can optionally be repeated until a branched linker of the desired length has been synthesized. In this process at least one polyfunctional aminocarboxylic acid is introduced which contains one or several charged side groups.

30 Subsequently the reactive group X is introduced and protective groups that may be present on the side groups of the aminocarboxylic acids are cleaved off. This synthesis of the ligand by successively coupling amino acids in solution can take place on a single ligand and also

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 10 -

on a ligand that has already been bound to a metal complex as the starting material. A suitable starting material is for example a luminescent metal complex which contains a free carboxylate group. Such complexes are known from the above-mentioned documents and are also offered commercially for example by the Igen Inc. Company, Rockville, MD, USA.

- 5 On the other hand the branched linker can also be prepared by solid phase peptide synthesis. In a first embodiment of the solid phase synthesis, an amino acid is coupled via its carboxylate group to the solid phase support and then the desired linker is synthesized by successively coupling further amino acids. In this process at least one amino acid which contains a charged group as a side group e.g. an amino group or a carboxylate group and at
10 least one amino acid which serves as the branching site and is optionally in a protected form are used to prepare a linker according to the invention. After completion of the desired linker sequence, an activated metal complex, e.g. an active ester, can be coupled to the free N-terminal amino group of the peptide bound to the solid phase. After cleavage from the solid phase the reactive group X can be coupled to the carboxy terminus of the
15 peptide linker and protective groups that may be present are cleaved off.

- In another mode of the solid phase synthesis an amino acid-metal complex conjugate which contains a protected amino group and a carboxylate group e.g. Fmoc-Lys(-Ru(bipyridyl)₃-OH) can be anchored to a solid phase by means of the free carboxylate group and a peptide linker can be synthesized after release of the blocked amino group.
20 After completion of the desired linker sequence, the complex is cleaved from the solid phase to obtain a linker which contains at least the original carboxylate anchor group as the free charge carrier. The reactive group X can be coupled to the amino terminus of the resulting peptide linker.

- In a further procedure of solid phase synthesis the branched linker sequence with charge
25 carriers can also be synthesized directly on a selected peptide epitope.

- A combination of the above-mentioned synthesis variants can also be used to prepare the compounds according to the invention. Amino acid-metal complex conjugates that are suitable for the solid phase synthesis of the complexes according to the invention with a charged linker are described in DE 44 30 998.8. Reference is herewith made to this
30 disclosure.

A further subject matter of the present invention is a compound of the general formula (I) as defined above.

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 11 -

Yet a further subject matter of the present invention is a conjugate comprising at least one biological substance to which at least one compound (I) according to the invention is coupled. Examples of suitable biological substances are cells, viruses, subcellular particles, proteins, lipoproteins, glycoproteins, peptides, polypeptides, nucleic acids, peptidic nucleic acids (PNA), oligosaccharides, polysaccharides, lipopoly-saccharides, cellular metabolites, haptens, hormones, pharmacological substances, alkaloids, steroids, vitamins, amino acids and sugars.

The compound is coupled to the biological substance by means of a reactive functional group of the compound that can covalently couple to a functional group of the biological substance. If the functional group is an active ester, it can for example be coupled to free amino groups of the biological substance. If the functional group is a maleimide residue, it can for example be coupled to free SH groups of the biological substance.

In a particularly preferred embodiment of the present invention the compounds are coupled to peptides which preferably have a maximum length of 50 amino acids and particularly preferably a maximum of 30 amino acids. These peptides are preferably prepared by synthesizing a peptide of the desired amino acid sequence on a solid phase during which a) a solid phase binding group or/and a labeling group e.g. an activated metal complex, preferably a metal complex-active ester derivative is coupled to the N-terminal amino group of the peptide or/and b) an amino acid derivative which is coupled covalently to an effector or/and labeling group e.g. a hapten or metal complex is introduced during the synthesis in at least one position of the peptide. The coupling of the effector group or/and labeling group e.g. to the N-terminal amino acid of the peptide is preferably carried out before cleaving the peptide from the solid phase and before cleaving protective groups on reactive side groups of the amino acid derivatives used for the peptide synthesis.

The peptides preferably contain one or several immunologically reactive epitope regions. These epitope regions are preferably derived from pathogenic organisms, e.g. bacteria, viruses and protozoa or from autoimmune antigens. The epitope region is particularly preferably derived from viral antigens and corresponds to the amino acid sequences of HIVI, HIVII, HIVO or hepatitis C virus (HCV).

Further preferred examples of biological substances are biotin, toxins, protoxins, nucleic acids, antibodies or antibody fragments, polypeptide antigens i.e. immunologically reactive polypeptides or haptens i.e. organic molecules having a molecular weight of 150 to 2000, in particular molecules with a steroid backbone such as cardenolides, cardenolide glycosides

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 12 -

(e.g. digoxin, digoxigenin), steroid alkaloids, sex hormones (e.g. progesterone), glucocorticoids etc. Other examples of haptens are prostaglandins, leucotrienes, leuco-endiines, thromboxanes etc.

Yet a further subject matter of the present invention is the use of the compounds according to the invention or the conjugates according to the invention in a detection method e.g. in an immunological detection method or a nucleic acid hybridization method, in particular in a luminescence assay.

If a metal complex is used as the labeling group, it is preferably detected by electrochemiluminescence in which luminescent species are generated electrochemically on the surface of an electrode. Examples for carrying out luminescence assays with metal complexes of the prior art can be found in EP 0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511 and WO 92/14138. Reference is herewith made to the methods and devices for luminescence assays disclosed therein. The electrochemiluminescence assays are carried out in the presence of a solid phase which is preferably composed of microparticles, in particular of magnetic microparticles which are provided with a reactive coating e.g. with streptavidin. In this manner it is possible to detect immune or hybridization complexes containing a metal complex as the labeling group that are bound to the solid phase.

The electrochemiluminescence measurement is preferably carried out in the presence of a reducing agent for the metal complex e.g. an amine. Aliphatic amines are preferred and in particular primary, secondary and tertiary alkylamines whose alkyl groups each have 1 to 3 carbon atoms. Tripropylamine is particularly preferred. The amine can, however, also be an aromatic amine such as aniline or a heterocyclic amine. The reducing agent can already be integrated into the ligand sphere of the complex.

In addition a surface active agent e.g. a non-ionic agent such as an ethoxylated phenol may be present as an amplifier. Such substances are for example commercially available under the names Triton X100 or Triton N401.

On the other hand the luminescent metal complex can also be detected by measuring the fluorescence or time-resolved fluorescence in which the metal chelate is excited by irradiation with light of a suitable wavelength and the resulting fluorescence radiation is measured. Examples for carrying out fluorescence assays are to be found in EP 0 178 450 and EP 0 255 534. Reference is herewith made to this disclosure.

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 13 -

The principle described in detail above of using metal complexes with branched and charged or hydrophilic linkers can be applied in an analogous manner to other labeling groups or/and effector groups. Other preferred test formats in which the branched linkers can be used are homogeneous assays. Such assays are based for example on the measurement procedures known as CEDIA or FRET (fluorescence resonance energy transfer, cf. e.g. Pope, A. J., et al., Drug Discov Today 4 (1999) 350-362) such as time-resolved FRET.

Considerable advantages compared to known test formats can be achieved by using the branched linkers according to the invention. Thus, e.g., positively charged luminescent metal complexes can be better handled within a conjugate comprising a negatively charged branched linker. An improved solubility and thus a lower unspecific binding is generally found when the branched linkers are used in combination with hydrophobic labeling groups or/and biological substances. In many cases this can be used to increase the number of labeling groups and thus to increase signal yields. Furthermore the sterically demanding branched linkers prevent interactions between hydrophobic labeling groups and hydrophobic biological substances which ensures an improved accessibility of the labeling group.

The branched linkers according to the invention can be very advantageous in diagnostic methods by for example reducing the blank value, improving the dynamic range of the test, lowering the lower limit of detection, broadening the test range or/and improving the signal-to-noise ratio. A reduction of the dose of active substance or/and a reduction of side effects can be achieved in therapeutic applications.

Yet a further aspect of the present invention is that linkers that carry one or several charge carriers or/and one or several hydrophilic groups as defined above cause a large shift of the apparent molecular weight in chromatographic methods such as gel electrophoresis e.g. agarose gel electrophoresis, SDS gel electrophoresis, gel filtration, hydrophobic interaction chromatography and ion exchange chromatography. This effect occurs with the branched linkers described in the present application as well as with the linear linkers described in WO 96/03409. As a result of this shift in the apparent molecular weight, i.e. the linkers appear to have a higher molecular weight than is actually the case, they can be used to prepare conjugates with a defined stoichiometry and homogeneous composition. After the linker which for example carries a defined number of labeling groups or effector groups, has been coupled to a binding group e.g. a biomolecule, the reaction products of the preparation can be simply obtained by chromatographic methods according to their

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 14 -

stoichiometry (e.g. one molecule of linker per binding group, two molecules of linker per binding group, three molecules of linker per binding group etc.) in the form of separate fractions.

- 5 The linker used to prepare a particular conjugate should in this case have an apparent molecular weight of preferably ≥ 20 %, particularly preferably of ≥ 30 % and most preferably of ≥ 40 % of the apparent molecular weight of the binding group in the same chromatographic separation system.

- 10 Furthermore reagent kits (linker plus labeling group(s) or effector group(s) plus binding group e.g. biomolecule to be labeled), a system (including a measuring device to detect the respective labeling group) and a composition containing a reagent of defined stoichiometry and functionality are provided.

A preferred example of such conjugates with a defined stoichiometry are monodioxigenylated Fab' antibody fragment conjugates.

The present invention is further elucidated by the following examples and figures.

- 15 The following examples, references, sequence listing and figures are provided to aid the understanding of the present invention, the true scope of which is set forth in the appended claims. It is understood that modifications can be made in the procedures set forth without departing from the spirit of the invention.

Figures:

- 20 Fig. 1 to 12 and 16 to 20 as well as 23 to 25 show compounds according to the invention Fig. 13 to 15 show amino acid sequences of reference antigens, and Figures 21 and 22 show the solid-phase-bound branched linker (with and without the Mtt-protective group and with protective groups on the amino acid side chains) used to produce the conjugates of Fig. 23 to 25.

- 25 Example 1: Preparation of branched linkers by means of solid phase peptide synthesis

The branched linkers were synthesized by means of fluorenylmethyloxycarbonyl-(Fmoc)-solid phase peptide synthesis on a batch peptide synthesizer e.g. from Applied Biosystems A433. In each case 4.0 equivalents of the amino acid derivative shown in table 1 were used for this.

Table 1:

A	Fmoc-Ala-OH
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH
D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH
E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH
gE	Fmoc-Glu-OtBu
F	Fmoc-Phe-OH
G	Fmoc-Gly-OH
H	Fmoc-His(Trt)-OH
I	Fmoc-Ile-OH
K1	Fmoc-Lys(Boc)-OH
K2	Fmoc-Lys(Fmoc)-OH
K3	Fmoc-Lys(Dde)-OH
K4	Fmoc-Lys(Alloc)-OH
K5	Fmoc-Lys(PhAc)-OH
K6	Fmoc-Lys-(label)-OH
K7	Boc-Lys(Fmoc)-OH
L	Fmoc-Leu-OH
M	Fmoc-Met-OH
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH
P	Fmoc-Pro-OH
Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
T	Fmoc-Thr(tBU)-OH
U	Fmoc-β-alanine-OH
V	Fmoc-Val-OH
W	Fmoc-Trp-OH
Y	Fmoc-Tyr(tBU)-OH
Z	Fmoc-ε-amino caproic acid
Ps	Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH
Cs	Fmoc-Cys(SO ₃ H)-OH

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 16 -

M _n -U	Mitt-β-alanine-OH
-------------------	-------------------

The amino acids and amino acid derivatives were dissolved in N-methyl-pyrrolion. The peptide is synthesized on Wang resin (Wang, S. S., J Am Chem Soc 95 (1973) 1328-33). The resin is loaded with 0.2 to 0.4 mMol/g. The coupling reactions were carried out for 20 minutes using 4 equivalents dicyclohexylcarbodiimide and 4 equivalents N-hydroxybenzotriazole in dimethyl-formamide relative to the Fmoc-amino acid derivative in dimethylformamide as the reaction medium. The Fmoc group was cleaved after each step of the synthesis with 20 % piperidine in dimethylformamide for 20 min. The amount of resin was selected such that after the last branch, 4 equivalents Fmoc-amino acid relative to the amino groups are used. Fmoc-Lys(Fmoc)-OH is used for the branch and subsequent synthesis of two identical arms. The unsymmetric branches are achieved by amino acid derivatives with orthogonal side chain protective groups such as Fmoc-Lys(Dde) or Fmoc-Lys(Alloc). These orthogonal protective groups are cleaved on the resin by methods known in the literature (Bycroft, B. W., et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun. 9 (1993) 778-9; Merzouk, A., et al., Tetrahedron Letters 33 (1992) 477-80). Terminal amino groups on the solid phase are optionally acetylated or succinylated with acetic anhydride or succinic anhydride.

The hapten, label or functional group in those cases where the corresponding amino acid derivative is stable during the solid phase synthesis was already introduced on the resin e.g. on the N-terminal amino acid of the peptide.

The introduction of e.g. a metal chelate label was carried out via appropriate active ester derivatives at the free N-terminal amino group of the carrier-bound peptide. For this four equivalents ruthenium(bipyridyl)₃ complex (BPRu) per free primary amino function were activated with N-hydroxybenzotriazole/dicyclohexyl-carbodiimide and dissolved in a small amount of DMSO and this was added dropwise and stirred for 2 h at room temperature.

A hapten or a label can also be introduced at the C-terminus already during the solid phase synthesis by the direct incorporation of for example a metal chelate or biotin-coupled amino acid derivatives (described in WO 96/03409).

The peptide is released from the support and the acid-labile protective groups are cleaved with 20 ml tri-fluoroacetic acid, 0.5 ml ethanediol, 1 ml thioanisole, 1.5 g phenol and 1 ml water within 40 min at room temperature. Depending on the amino acid derivatives that

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 17 -

are used, it is also possible to use cocktails containing fewer radical traps. 300 ml cooled diisopropyl ether was subsequently added to the reaction solution and was kept for 40 min at 0°C in order to completely precipitate the peptide. The precipitate was filtered, washed with diisopropyl ether and dissolved in a small amount of 50 % acetic acid and lyophilized.

5 The crude material obtained was purified by means of preparative HPLC on Delta-PAK RP C18 (column 50 x 300 mm, 100 Å; 15 µ) over an appropriate gradient (eluant A: water, 0.1 % trifluoroacetic acid, eluant B: acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid) within ca. 120 min. The eluted material was identified by mass spectrometry.

10 Examples of such compounds prepared by solid phase synthesis are shown in figs. 1 to 7 and 16.

Alternatively the labeling group (label), the effector group (hapten) or the functional group can also be introduced after cleavage from the resin. For this it may be necessary to block other groups that should not be derivatized with a protective group which is stable during the solid phase peptide synthesis as well as during the cleavage (e.g. phenylacetyl (Phac)).

15 The protective group can be removed enzymatically with PenG amidase (described in PCT/EP95/02921).

An example of a compound protected with Phac is shown in Fig. 8.

Example 2: Introduction of a maleinimide function into a branched peptidic linker

20 In order to introduce the maleinimide function, a peptide according to example 1 was dissolved in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.0, admixed with one equivalent maleinimidohexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester (MH = maleinimidohexanoyl) in DMSO and stirred for 16 h at 25°C. The preparation was purified by preparative HPLC (see above). The identity of the eluted material was checked by means of mass spectrometry.

The compounds shown in Fig. 9 to 11 and 17 were prepared.

25 Example 3: Introduction of N-hydroxysuccinimide ester groups into branched peptidic linkers

The experiment was carried out analogously to WO 96/03409, example 6.

The compound shown in Fig. 12 was prepared.

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 18 -

Example 4: Use of metal complex-antigen conjugates with branched and charged linkers in immunological tests

5 A double antigen bridge test was carried out to detect specific antibodies to HIV. In this method the sample liquid was incubated with a ruthenium-labeled antigen and a biotinylated antigen for the antibody to be determined in the presence of a streptavidin-coated solid phase. The presence of anti-HIV antibodies in the sample liquid is determined by measuring the label on the solid phase by means of electrochemiluminescence using the Elecsys® system. A partial sequence (SEQ ID NO: 1) of the gp36 protein of HIV2 is known to comprise antigenic epitopes as recognized by important antibodies in patient sera.

10 A peptide comprising SEQ ID NO: 1 extended at the N-terminus with an SH functional linker (SEQ ID NO: 2 and Fig. 13) was prepared as described in WO 96/03652. The full line between the two cysteines (C) of Fig. 13 shall indicate a -SS- cystine bridge.

The peptide of SEQ ID NO: 2 (Fig. 13) was conjugated within 2 h at room temperature to the respective maleimido-activated ruthenium linker in 0.1 mol/l potassium phosphate buffer pH 7 in order to derivatize the HIV peptide with maleimido-activated ruthenium complexes. Non-reacted components were either separated by means of preparative HPLC or gel chromatography. The purified products were lyophilized.

compound A: BPRu linker from Fig.9 with gp36 antigen

compound B: BPRu linker from Fig. 10 with gp36 antigen

20 compound C: BPRu linker from Fig. 11 with gp36 antigen

compound D: BPRu linker from Fig. 17 with gp36 antigen

The conjugates comprising SEQ ID NO: 2 and one of the various linker variants (compounds A-D) were evaluated with the test format describe above. All evaluations were carried out with the same biotinylated peptide comprising the identical gp36 epitope of SEQ ID NO: 1 (Fig. 14) and at the same concentration. Labeled detection antigens were used in an equimolar concentration to the biotinylated capture antigen.

The conjugate shown in Fig. 15 and prepared as and described in PCT/EP95/02921 was used as a labeled reference antigen according to the prior art (comparison in tables 2 to 4).

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 19 -

The antigens according to the invention were used in equimolar amounts relative to the antigen of the prior art. The concentration was 0.018 nmol/l.

The result of the experiments with conjugates A and C compared to the compound from Fig. 15 is shown in ECL counts in table 2. It can be seen that considerably lower blank values with constant positive signals are only obtained by using the linker according to the invention which thus results in a better differentiation between positive signals and negative signals. These improved signal-to-noise ratios lead to an improvement of the measuring range.

Table 2:

Experiment	Comparison	A	C
negative sample	6014	2044	1975
positive sample	345247	484681	391007
ratio positive/negative	57.5	237.1	198

10

The result of the experiment with conjugate B in comparison to the compound of Fig. 15 is shown in ECL counts in table 3. It can be seen that the advantageous effects of the branched linker also enable the introduction of several labels without significantly increasing the blank value. It is also surprising that the positive signal is not quenched and even an increase in the measured counts is observed.

Table 3:

Experiment	Comparison	B
negative sample	6096	2366
positive sample	393197	765298
ratio positive/negative	64.5	323.5

15

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 20 -

Table 4 shows the result from the experiment with conjugate D compared to the compound of Fig. 15 in ECL counts. Surprisingly uncharged branched, hydrophilic linkers also have a positive effect on the blank value. The signal-to-noise ratio is improved.

Table 4:

Experiment	Comparison	D
negative sample	6718	2015
positive sample	553816	759947
ratio positive/negative	82.4	377.1

5

Example 5: Preparation of antibody fragment conjugates

1. Description of the procedure

Preparation of the Fab' from IgG

A monoclonal anti-Dig antibody was cleaved by pepsin to form F(ab')₂-fragments. After quantitative cleavage the pepsin was inactivated by increasing the pH and adding pepstatin. The F(ab')₂ was reduced by means of cysteamine to Fab' without prior purification. Cysteamine cleaves almost selectively the disulfide bridges in the hinge region. It was subsequently dialysed. This removes most of the Fc cleavage products generated by pepsin since they are small enough to pass through the pores of the dialysis tube (> 10,000 Dalton).

15

Fab'-BPRU linker conjugate

The conjugate synthesis was carried out by reacting the Fab' with an excess of BPRU-linker-MH. In this process an SH group in the hinge region was mainly converted. Small amounts of polyruthenylated Fab' were formed as a side reaction most likely as a result of reduced intramolecular disulphide bridges in the light and in the Fd chain.

20

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 21 -

Purification of the crude conjugate

The crude conjugate was purified by a molecular sieve. In this process the monoruthenylated material was separated from the polyruthenylated material.

2. Procedure

5 Cleavage of the antibody to form F(ab')₂

The lyophilisate of the monoclonal antibody anti-DIG-M19.11 IgG was reconstituted with H₂O to obtain a concentration of 20 mg/ml. 20 µl 1 M citrate pH 3.5 were added per ml solution (final concentration citrate = 20 mM). The pH was adjusted with HCl to 3.60. It was filtered through a 0.45 µm filter. The concentration was determined at OD 280 nm (1 OD_{280nm} = 1.4 mg/ml). It was adjusted to 10 mg/ml with 20 mM citrate pH 3.60. The solution was heated in a water bath to 37°C. 100 µl pepsin solution (3 mg/ml) was added per ml antibody solution and incubated at 37°C in a water bath. After complete cleavage the reaction was stopped by increasing the pH value and adding pepstatin.

Reduction to Fab'

15 52.6 µl 0.1 M dithiothreitol (DTT) was added per ml cleavage mixture and incubated for 30 min at 25°C in a water bath. The Fab' was dialysed against 0.1 M NaH₂PO₄/NaOH pH 6.5, 30 mM NaCl, 2 mM EDTA.

Synthesis of the Fab'-BPRu-linker conjugate

20 The BPRu-linker-MH was dissolved in DMSO. The stoichiometry Fab':BPRu-linker-MH was 1:3 (mole/mole). The final concentration of Fab' in the mixture was 3.9 mg/ml. The maximum concentration of DMSO in the mixture was 10 %. The reaction time was 1 h at room temperature.

Purification

25 The crude conjugate was concentrated 2-3-fold using an AMICON PM 10 and purified by means of Superdex 200 (buffer: 25 mM MOPS/NaOH pH 6.5, 50 mM NaCl, 10 % DMSO; applied amount: max 1.5 % of the gel bed, fractions: 0.5 % of the gel bed). The fractions containing the Fab'-BPRu-linker conjugate were pooled.

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 22 -

Example 6: Use of metal complex-antibody fragment conjugates with branched and charged linkers in immunological tests

A double antigen bridge test was carried out to detect specific antibodies to HIV. In this method the sample liquid was incubated with a biotinylated antigen and a digoxigenin-labeled antigen to the antibody to be determined in the presence of a streptavidin-coated solid phase and anti-Dig-BPRu antibody. The presence of anti-HIV antibodies in the sample liquid was determined by determining the label bound via the double antigen bridge to the solid phase by electrochemiluminescence using the Elecsys® system.

A HIV peptide from the gp41 region of HIV1 (SEQ ID NO: 3), which was labeled at the N-terminus was used as the antigen. The preparation of the biotinylated and the digoxigenylated antigens is described in PCT/EP 95/02921. Two anti-Dig-BPRu conjugates were used for detection of ruthenylated gp41 peptide.

Compound E: anti-Dig-IgG-BPRu without linker

Compound F: anti-Dig-Fab'-BPRu with the linker of Fig. 9

Antigens were used in equimolar amounts at a concentration of 20 ng/ml.

The result of the experiments with compound E in comparison to compound F is shown in table 5. Digoxigenylated antigen and antibody conjugate (concentration 180 ng/ml) were pre-incubated. It can be seen that use of the linker according to the invention results in considerably lower blank values which is associated with a better differentiation between positive and negative signals. This is easily seen from the normalized values (table 5/2).

Table 5:

Experiment [counts]	without BPRu conjugate = system blank value	compound E	compound F
negative sample	441	2117	582
positive sample 1	437	1215275	668410
positive sample 2	453	49187	25819

Table 5/2:

Experiment (normalized to negative sample)	without BPRu conjugate = system blank value	compound E	compound F
negative sample	1.0	1.0	1.0
positive sample 1	0.99	574.1	1148.5
positive sample 2	1.03	23.1	44.4

In table 6 the test procedure was changed such that the magnetic beads with bound immune complexes were washed before adding the antibody conjugate (concentration 5 600 ng/ml). Also in this case the blank values were considerably lower and this was associated with an improved differentiation. The improved signal-to-noise ratio is especially evident from table 6/2, wherein the values have been normalized to the system blank as measured with the negative sample.

Table 6

Experiment [counts]	without BPRu conjugate = system blank value	compound E	compound F
negative sample	464	2771	758
positive sample 1	453	1503690	686607
positive sample 2	480	47040	27133

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 24 -

Table 6/2:

Experiment pos./neg. sera	without BPRu conjugate = system blank value	compound E	compound F
negative sample	1.0	1.0	1.0
positive sample 1	0.98	592.6	905.8
positive sample 2	1.03	17.0	35.8

- 5 Table 7 shows the unspecific binding of the antibody conjugate to the streptavidin solid phase. In this "test procedure" only buffer was used and neither the biotinylated nor the digoxigenylated antigens. The concentration of the ruthenylated antibody conjugate was 600 ng/ml. The linker according to the invention again exhibits improved blank values.

Table 7:

Experiment [counts]	without BPRu conjugate = system blank value	compound E	compound F
negative sample	333	3188	566
buffer	329	983	436

10

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 25 -

Example 7: Preparation of further conjugates

1. Synthesis of a testosterone derivative (Fig. 18)

8.5 mg BPRu-linker-NH₂ (Fig. 1) was dissolved in ca. 2 ml phosphate buffer pH 8.5 and 1.8 mg of the activated testosterone derivative (testosterone-3-dimethyl-carboxyoxime-NHS) dissolved in 2 ml dioxane was added dropwise. It was allowed to stir for 6 h at room temperature with the exclusion of light.

The crude product is purified by means of preparative HPLC. The molecular weight was confirmed by means of mass spectrometry (MALDI) as 3180.

2. Synthesis of a T3 derivative (Fig. 19)

10 The synthesis was carried out analogous to 7.1. MS-MALDI corresponded to the expected molecular weight.

3. Synthesis of a PEG-Lys-MP-gp36 derivative (Fig. 20)

15 Starting with a lysine derivative of a ruthenium complex the free α -amino group of the lysine was reacted in the first step by conventional methods with maleinimido-propionic acid-(MP)-NHS ester. Then the carboxylic acid was activated by standard methods.

In the next step 3.64 mg of the active ester was reacted with 25.5 mg of an amino-modified polyethylene glycol H₂N-PEG-OCH₃-5000 (Shearwater) in 20 ml acetonitrile at room temperature. The product mixture was rotary evaporated and purified by means of gel chromatography (MALDI corresponded to the expected molecular weight).

20 The further coupling of the maleinimide to the gp36-peptide was carried out analogously to the already described method. The molecular weight determined with mass spectrometry corresponded to the expected molecular weight of 6990.

4. Synthesis of a fluorescence dye-labeled branched linker (Fig. 23)

25 The Mtt-protected branched peptidic linker (Fig. 21) is synthesized according to standard procedures.

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 26 -

The Mtt protecting group is cleaved off specifically according to the procedure described in Aletras A., et al., Int. J. Peptide Res. (1995) 45, 488 to yield the solid phase bound linker of Fig. 22.

50 mg of solid phase bound branched linker molecule (Fig. 22) with a single unprotected N-terminal amino group was suspended in 4 ml DMF. Afterwards 10 µl triethylamine and the activated fluorescence label (16 mg) was added and conjugated to the solid phase bound linker. (The synthesis of the activated label, the rhodamine-N-hydroxy succinimide ester, is described in DE 4137934.). The reaction mixture was stirred for 12 h at room temperature.

10 After cleavage from the solid phase under standard conditions (trifluoro acetic acid 95%), purification was performed with prep. HPLC.

Reaction of 16 mg of the intermediate with 18.5 mg disuccinimidyl suberate (DSS) in 10 ml DMF with 21 µl triethylamine for 5 h and standard purification led to 7 mg product (NHS-activated rhodamine-labeled branched linker as shown in Fig. 23). This was analyzed by MALDI-TOF and the molecular weight was found to correspond to the theoretical value.

Example 8: Acridinium-labeled branched linker structures

I. Acridinium ester labeled branched linker

13 mg of the acridinium ester derivative (synthesis according to EP 82636) were added to 50 mg of solid phase bound linker (cf. Fig. 22) dissolved in 4 ml DMF and reacted as described in Example 7.4.

The acridinium-labeled linker was purified by prep. HPLC and lyophilised.

Product yield was found with 7 mg.

The product (cf. Fig. 24) was analyzed by MALDI-TOF and the molecular weight was found to correspond to the theoretical value.

25 2. Synthesis of acridinium sulfonyl labeled branched linker

The acridinium-labeled branched solid phase bound compound is synthesised as described in example 7.4 (synthesis of the acridinium sulfonamide see US 5,543,524). After cleavage

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 27 -

from the solid phase and purification (see above) the free C-terminal amino group of the peptidic linker (4 mg linker) is reacted with 0,7 mg maleimidopropionyl-oxy succinimide ester (MPS) in 1 ml DMF (room temperature, 150 h) and purified by prep. HPLC.

Product yield was found with 2 mg.

- 5 The product (cf. Fig. 25) was analyzed by MALDI-TOF and the molecular weight was found to correspond to the theoretical value.

The MPS-activated acridinium sulfonamide labeled linker is conjugated to SH groups. In this example TSH (thyroid-stimulating hormone) was used and coupling performed according to a standard protocol (see Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 10 Academic Press, 1996, p. 456 ff).

In a comparison study using a two step immunoassay (with a washing step after the incubation of the sample with the first antibody) for TSH, the TSH-conjugate of this example was compared to a TSH-conjugate without linker. The TSH-concentrations are given as $\mu\text{IU/ml}$ in table 8. Cal 1 and Cal 2 are commercial products, Roche Diagnostics order numbers TSH Cal Set: Id. Nr: 1731483, the samples marked Tris (100mM Tris, 1% BSA, 0,1% Thesit, 0,1% Oxaban, pH 7,4) comprise 0 and 50 μIU TSH per ml, respectively.

Table 8:

	TSH $\mu\text{IU/ml}$	Signal-to-noise ratio (without linker)	Signal-to-noise ratio (with linker)
Cal1	0		
Cal2	1.43	2	7
Tris 0	0		
Tris 50	50	17	127

It is obvious from table 8 that the TSH-conjugate comprising the branched linker according to the present invention shows a significant improvement with regard to signal-
20 to-noise ratio as compared to a conjugate without such linker.

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 28 -

List of References

- Aletras A., et al., *Int. J. Peptide Res.* (1995) 45, 488
Aslam M., Dent A., *Bioconjugation* (1998) Mcmillan Reference Ltd., London, p 95 ff
Bredehorst, R., et al., *Anal Biochem* 193 (1991) 272-9
5 Bycroft, B. W., et al., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 9 (1993) 778-9
Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 1996, p. 456 ff
Merzouk, A., et al., *Tetrahedron Letters* 33 (1992) 477-80
Pope, A. J., et al., *Drug Discov Today* 4 (1999) 350-362
Wang, S. S., *J Am Chem Soc* 95 (1973) 1328-33
10 PCT/EP95/02921
DE 4137934
DE 44 30 998.8
EP 0 061 888
15 EP 0 178 450
EP 0 255 534
EP 0 580 979
EP 0 618 192
US 5,519,142
20 WO 87/06706
WO 90/05301
WO 90/11511
WO 92/14138
WO 96/03409
25 WO 96/03410
WO 96/03652

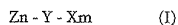
WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 29 -

Patent Claims

1. Use of a compound of the general formula (I):

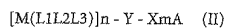


- 5 in which Z denotes at least one reactive functional group or a binding group and X is a reactive functional group which is bound covalently to Z via a linker Y wherein the linker is a branched linker which has a molecular weight of > 1000 Da and contains at least one charge carrier or/and at least one hydrophilic group, n is an integer from 1 to 10 and m is 1 or 2, for the production of conjugates.

2. Use as claimed in claim 1, wherein the binding group is a labeling group or an effector group.

3. Use as claimed in claim 1 or 2, wherein the binding group is a labeling group selected from luminescent and fluorescent detection groups, enzymes, microparticles or nanoparticles and radio-isotopes.

4. Use as claimed in claim 3, wherein the labeling group is metal chelate complex and the compound is of the general formula (II):



in which

- M is a divalent or trivalent metal cation selected from rare earth or transition metal ions,
- 20 - L1, L2 and L3 are the same or different and denote ligands containing at least two nitrogen-containing heterocycles, L1, L2 and L3 being bound to the metal cation via nitrogen atoms,
- X is a reactive functional group which is covalently bound to at least one of the ligands L1, L2 and L3 via the branched linker Y,
- 25 - n is an integer from 1 to 10,

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 30 -

- m is 1 or 2 and
 - A denotes the counterion which may be required to equalize the charge.
5. Use as claimed in one of the claims 1 to 4, wherein the binding group is an effector group selected from partners of specific bioaffine binding pairs.
 - 5 6. Use as claimed in claim 5, wherein the effector group is selected from biotin and analogues thereof, streptavidin, avidin, antigens, haptens, antibodies, nucleic acids, nucleic acid analogues, sugars, lectins, receptors and receptor ligands.
 7. Use as claimed in one of the claims 1 to 6, wherein the reactive functional group is a
10 carboxylic acid, a carboxylic acid halogenide, a carboxylic acid anhydride, a carboxylic acid hydrazide, a carboxylic acid azide, an amine, an active ester, a maleimide, a thiol or a photoactivatable group.
 8. Use as claimed in one of the claims 1 to 7, wherein the branched linker contains at least one negative charge carrier selected from the group consisting of phosphate, phosphonate, sulphinate, sulphonate, sulphate and carboxylate groups.
 - 15 9. Use as claimed in claim 8, wherein the branched linker contains at least one carboxylate group or/and phosphate group.
 10. Use as claimed in one of the claims 1 to 9, wherein the branched linker contains at least one positive charge carrier selected from amino groups and substituted amino groups.
 - 20 11. Use as claimed in one of the claims 1 to 10, wherein the branched linker contains up to 70 charge carriers.
 12. Use as claimed in claim 11, wherein the branched linker contains 1 to 40 charge carriers.
 13. Use as claimed in one of the previous claims, wherein the branched linker contains at
25 least one uncharged hydrophilic group selected from ethylene oxide, polyethylene oxide, sulphoxide, sulphone, carboxylic acid amide, carboxylic acid ester, phosphonic acid amide, phosphonic acid ester, phosphoric acid amide, phosphoric acid ester,

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 31 -

sulphonic acid amide, sulphonic acid ester, sulphuric acid amide and sulphuric acid ester groups.

14. Use as claimed in claim 13, wherein at least one uncharged hydrophilic group is a primary carboxylic acid amide group.
- 5 15. Use as claimed in one of the previous claims, wherein the molecular weight of the linker is in the range from 1000 to 50,000 Da.
16. Use as claimed in one of the claims 1 to 15, wherein the branched linker is at least partially composed of aminocarboxylic acid units which are linked together by peptide bonds.
- 10 17. Use as claimed in claim 16, wherein the charge carriers are derived from polyfunctional aminocarboxylic acids which still contain at least one free charge carrier after incorporation into the linker.
18. Use as claimed in claim 16, wherein the hydrophilic groups are derived from polyfunctional aminocarboxylic acids which still contain at least one hydrophilic group after incorporation into the linker.
- 15 19. Use as claimed in claim 16, wherein the branching positions are derived from polyfunctional aminocarboxylic acids.
20. Use as claimed in claim 17, 18 or 19, wherein the polyfunctional aminocarboxylic acids are selected from lysine, ornithine, hydroxylysine, aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine, phosphoserine and synthetic trifunctional aminocarboxylic acids.
- 20 21. Compound of the general formula (I)



- 25 wherein Z denotes at least one reactive functional group or a binding group and X is at least one reactive functional group which is covalently bound to Z via a linker Y where the linker is a branched linker that has a molecular weight of > 1000 Da and

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 32 -

contains at least one charge carrier or/and at least one hydrophilic group, n is an integer from 1 to 10 and m is 1 or 2.

22. Compound as claimed in claim 21, wherein it has one or several of the features claimed in one of the claims 2 to 20.
- 5 23. Conjugate comprising at least one biological substance and at least one compound of the general formula (I) as claimed in claim 21 or 22.
24. Conjugate as claimed in claim 23, wherein the biological substance is an antibody or antibody fragment, a nucleic acid, a polypeptide antigen, an immunologically reactive peptide or a hapten.
- 10 25. Use of compounds as claimed in claim 21 or 22 or the conjugates as claimed in claim 23 or 24 in an immunological detection method or in a nucleic acid hybridization method.
26. Use as claimed in claim 25 in a luminescence method.
27. Use as claimed in claim 25 or 26 in an electrochemiluminescence method.
- 15 28. Use as claimed in claim 27 to improve the solubility of labeling groups or effector groups or of their conjugates.

Figure 1:

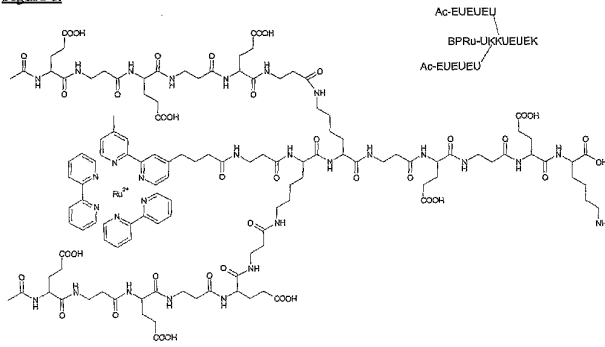


Figure 2:

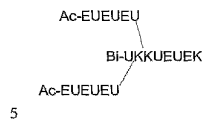


Figure 3:

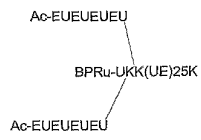


Figure 4:

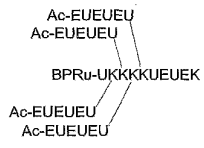


Figure 5:

5

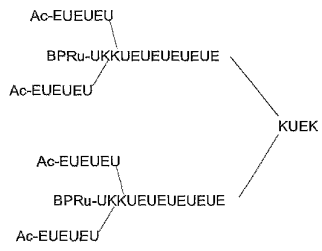


Figure 6:

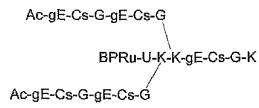


Figure 7:

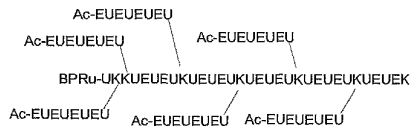


Figure 8:

5

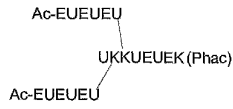


Figure 9:

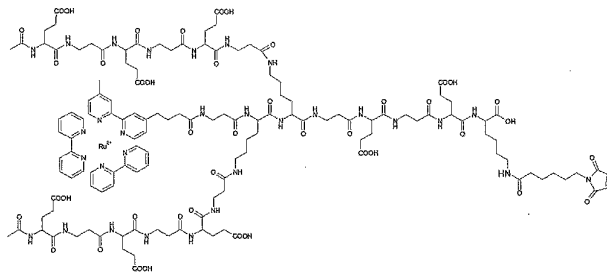


Figure 10:

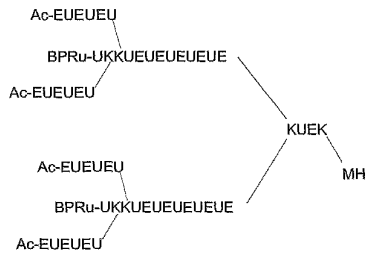


Figure 11:

5

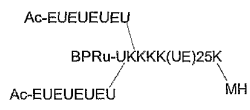
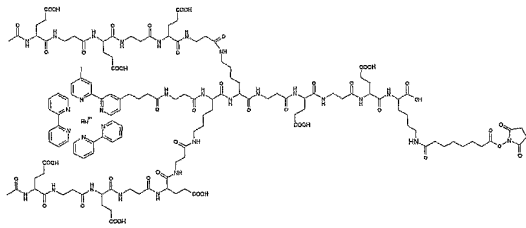


Figure 12:



WO 02/27315

5/11

PCT/EP01/11118

Figure 13:

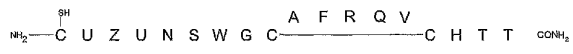


Figure 14:

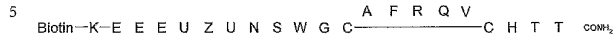


Figure 15:

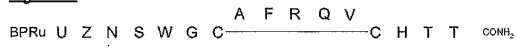


Figure 16:

10

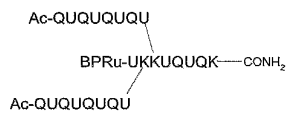


Figure 17:

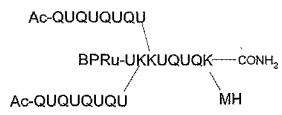


Figure 18:

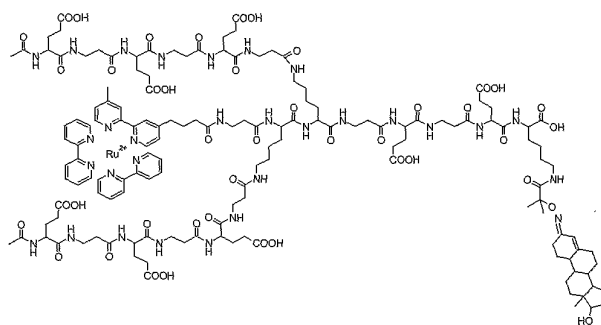


Figure 19:

5

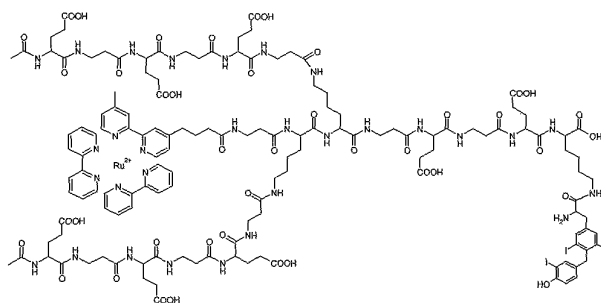


Figure 20: Ruthenium- and gp36-labeled hydrophilic (PEG 5000) linker

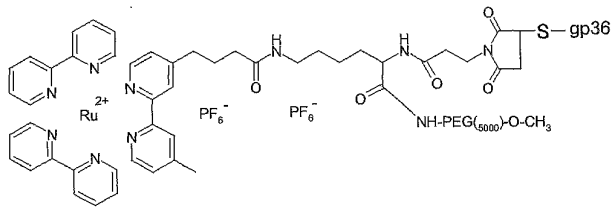


Figure 21: Solid-phase bound branched linker (with protective groups)

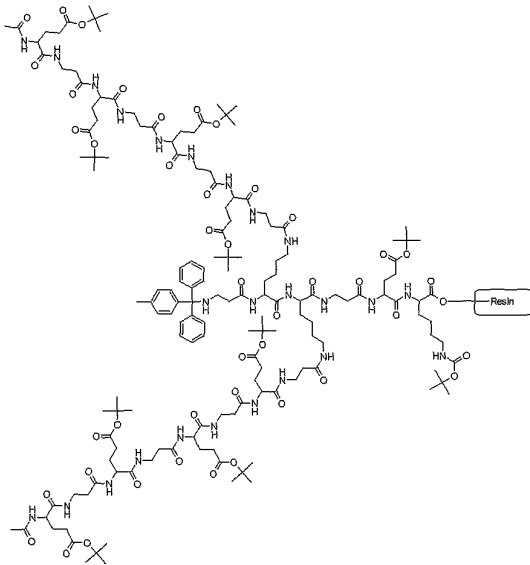


Figure 22: Branched linker with protected amino acid side chains and un-protected ϵ -amino-group of lysine

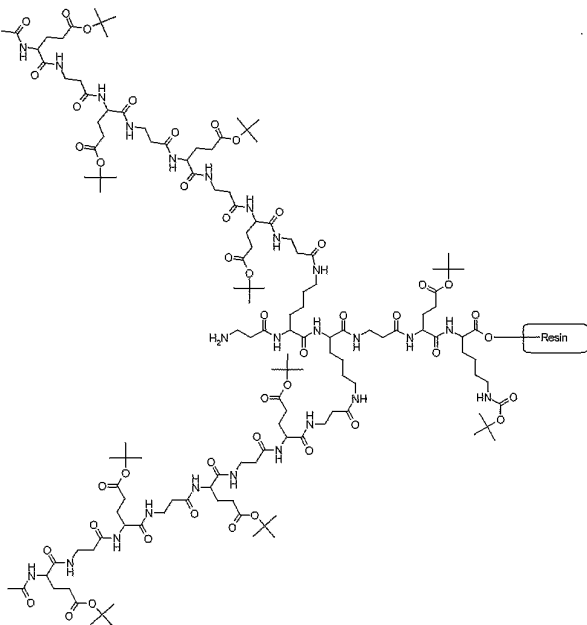


Figure 23: NHS-activated rhodamine-labeled branched linker

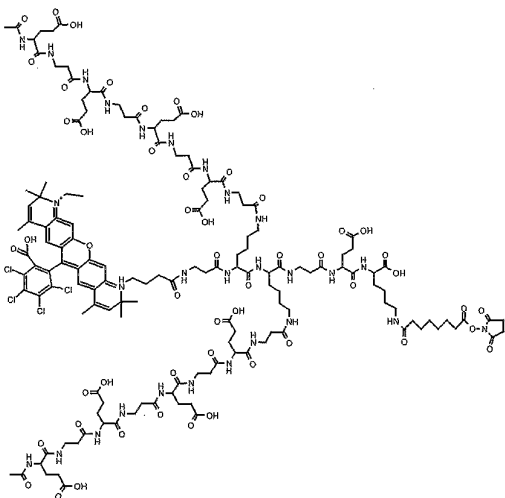


Figure 24: Branched linker labeled with an acridinium ester

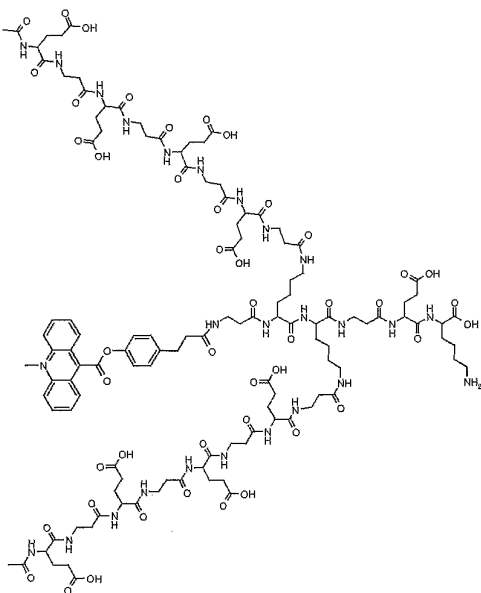
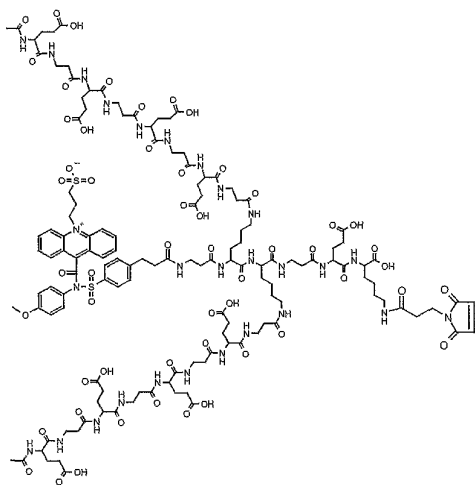


Figure 25: MPS-activated branched linker with an acridinium sulfonyl group as label



WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 1 -

SEQUENCE LISTING

<110> F. HOPFMANN-LA ROCHE AG
Roche Diagnostics GmbH

5 <120> Compounds with a branched linker

<130> 19063WO

10 <140>
<141>

<150> DE10048417.4
<151> 2000-09-29

15 <160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

25 <220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

<400> 1
Asn Ser Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys His Thr Thr
30 1 5 10

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

40 <220>
<223> Xaa in position 3 denotes (Z) epsilon-amino
caproic acid and Xaa in positions 2 and 4
denotes (U) beta-alanine

45 <400> 2
Cys Xaa Xaa Xaa Asn Ser Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys His
1 5 10 15

50 Thr Thr

<210> 3
55 <211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/27315

PCT/EP01/11118

- 2 -

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:peptide

5 <400> 3
Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val
1 5 10 15

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 April 2002 (04.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/027315 A3

(51) International Patent Classification: G01N 33/543, 33/53, 33/58, C07F 15/00, C07K 14/18, 14/16

JOSEL, Hans-Peter [DE/DE]; Ulmenstrasse 28, 82362 Weilheim (DE). HOESS, Eva [DE/DE]; Zitzelsbergerstrasse 13a, 81476 Muenchen (DE). HERRMANN, Rupert [DE/DE]; In der Au 23, 82362 Weilheim (DE). VON DER ELTZ, Herbert [DE/DE]; In der Au 21, 82362 Weilheim (DE).

(21) International Application Number: PCT/EPO1/11118

(22) International Filing Date: 26 September 2001 (26.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 100 48 417.4 29 September 2000 (29.09.2000) DE

(71) Applicant (for DE only): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim (DE).

(71) Applicant (for all designated States except DE, US): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ANDRES, Herbert [DE/DE]; Kapellenwiese 39, 82377 Penzberg (DE).

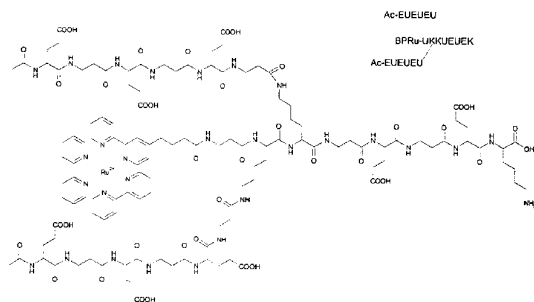
(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:
— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for the following designation US
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOUNDS WITH A BRANCHED LINKER



(57) Abstract: The present invention concerns new compounds comprising a branched linker and their use for producing conjugates for applications in diagnostic or therapeutic methods.



WO 02/027315 A3

WO 02/027315 A3



- of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

(88) Date of publication of the international search report:
11 July 2002

Published:

- with international search report
 - before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

【手続補正書】

【提出日】平成14年10月21日(2002.10.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

複合体の作製のための、一般式(I)：



式中、Zは少なくとも1つの反応性官能基または結合性基であり、Xは、リンカーYを介してZに共有結合している反応性官能基であり(ここで、該リンカーは、1000Daより大きな分子量を有し、かつ少なくとも1つの電荷担体を含む分枝リンカーである)、nは1~10の整数であり、mは1または2である、
の化合物の使用。

【請求項2】

複合体の作製のための、一般式(I)：



式中、Zは少なくとも1つの反応性官能基または結合性基であり、Xは、リンカーYを介してZに共有結合している反応性官能基であり(ここで、該リンカーは、1000Daより大きな分子量を有し、かつ少なくとも1つの電荷担体および少なくとも1つの親水性基を含む分枝リンカーである)、nは1~10の整数であり、mは1または2である、
の化合物の使用。

【請求項3】

該結合性基が標識基またはエフェクター基である請求項1または2記載の使用。

【請求項4】

該結合性基が、発光および蛍光検出基、酵素、マイクロ粒子またはナノ粒子および放射性同位体から選ばれる標識基である請求項1~3いずれか記載の使用。

【請求項5】

該標識基が金属キレート錯体であり、該化合物が一般式(II)：



式中、

Mは、希土類金属イオンまたは遷移金属イオンから選ばれる二価または三価の金属カチオンであり、

L1、L2およびL3は、同じかまたは異なっており、窒素含有複素環を少なくとも2つ含有する配位子を表し、かつ窒素原子を介して金属カチオン(capt ion)に結合しており、

Xは、該分枝リンカーYを介して配位子L1、L2およびL3の少なくとも1つに共有結合している反応性官能基であり、

nは1~10の整数であり、

mは1または2であり、

Aは電荷を一様にするために必要でありうる対イオンを表す、

の化合物である、請求項4記載の使用。

【請求項6】

該結合性基が、特異的なバイオアフィン結合対のパートナーから選ばれるエフェクター基である請求項1~5いずれか記載の使用。

【請求項7】

該エフェクター基が、ビオチンおよびそのアナログ、ストレプトアビジン、アビジン、抗原、ハプテン、抗体、核酸、核酸アナログ、糖類、レクチン、レセプターおよびレセプタ

一配位子から選ばれる請求項 6 記載の使用。

【請求項 8】

該反応性官能基が、カルボン酸、カルボン酸ハロゲン化物、カルボン酸無水物、カルボン酸ヒドラジド、カルボン酸アジド、アミン、活性エステル、マレイミド、チオールまたは光活性化性基である請求項 1 ~ 7 いずれか記載の使用。

【請求項 9】

該分枝リンカーが、ホスフェート基、ホスホネート基、スルフィネート基、スルホネート基、スルフェート基およびカルボキシレート基からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの負の電荷担体を含む請求項 1 ~ 8 いずれか記載の使用。

【請求項 10】

該分枝リンカーが、少なくとも 1 つのカルボキシレート基または / およびホスフェート基を含む請求項 9 記載の使用。

【請求項 11】

該分枝リンカーが、アミノ基および置換アミノ基から選ばれる少なくとも 1 つの正の電荷担体を含む請求項 1 ~ 10 いずれか記載の使用。

【請求項 12】

該分枝リンカーが、70 個までの電荷担体を含む請求項 1 ~ 11 いずれか記載の使用。

【請求項 13】

該分枝リンカーが、1 ~ 40 個の電荷担体を含む請求項 12 記載の使用。

【請求項 14】

該分枝リンカーが、エチレンオキシド基、ポリエチレンオキシド基、スルホキシド基、スルホン基、カルボン酸アミド基、カルボン酸エステル基、ホスホン酸アミド基、ホスホン酸エステル基、リン酸アミド基、リン酸エステル基、スルホン酸アミド基、スルホン酸エステル基、硫酸アミド基および硫酸エステル基から選ばれる少なくとも 1 つの非帯電親水性基を含む前記請求項いずれか記載の使用。

【請求項 15】

少なくとも 1 つの非帯電親水性基が、第一級カルボン酸アミド基である請求項 14 記載の使用。

【請求項 16】

該リンカーの分子量が、1000 ~ 50,000 Da の範囲である前記請求項いずれか記載の使用。

【請求項 17】

該分枝リンカーの少なくとも一部分が、ペプチド結合により互いに連結されたアミノカルボン酸単位から構成される請求項 1 ~ 16 いずれか記載の使用。

【請求項 18】

該電荷担体が、該リンカーへの導入後もなお少なくとも 1 つの遊離の電荷担体を含む多官能性アミノカルボン酸に由来する請求項 17 記載の使用。

【請求項 19】

該親水性基が、該リンカーへの導入後もなお少なくとも 1 つの親水性基を含む多官能性アミノカルボン酸に由来する請求項 17 記載の使用。

【請求項 20】

分枝位置が、多官能性アミノカルボン酸に由来する請求項 17 記載の使用。

【請求項 21】

該多官能性アミノカルボン酸が、リジン、オルニチン、ヒドロキシリジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、ホスホセリンおよび合成の三官能性アミノカルボン酸から選ばれる請求項 18、19 または 20 記載の使用。

【請求項 22】

一般式 (I)

$Z_n - Y - X_m$

式中、Zは少なくとも1つの反応性官能基または結合性基であり、Xは、リンカーYを介してZに共有結合している少なくとも1つの反応性官能基であり(ここで、該リンカーは、1000Daより大きな分子量を有し、かつ少なくとも1つの電荷担体を含有する分枝リンカーである)、nは1~10の整数であり、mは1または2である、
の化合物。

【請求項23】

一般式(I)



式中、Zは少なくとも1つの反応性官能基または結合性基であり、Xは、リンカーYを介してZに共有結合している少なくとも1つの反応性官能基であり(ここで、該リンカーは、1000Daより大きな分子量を有し、かつ少なくとも1つの電荷担体および少なくとも1つの親水性基を含有する分枝リンカーである)、nは1~10の整数であり、mは1または2である、
の化合物。

【請求項24】

請求項3~21いずれか記載の特徴の1つまたはいくつかを有する請求項22または23記載の化合物。

【請求項25】

少なくとも1つの生物学的物質と、請求項22~24記載の一般式(I)の化合物の少なくとも1つとを含有してなる複合体。

【請求項26】

該生物学的物質が抗体もしくは抗体断片、核酸、ポリペプチド抗原、免疫学的に反応性のペプチドまたはハプテンである請求項25記載の複合体。

【請求項27】

免疫学的検出法または核酸ハイブリダイゼーション法における請求項22~24記載の化合物または請求項25または26記載の複合体の使用。

【請求項28】

発光法における請求項27記載の使用。

【請求項29】

電気化学発光法における請求項27または28記載の使用。

【請求項30】

複合体の標識基またはエフェクター基の可溶性を改善するための請求項29記載の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/11118
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/58 C07F15/00 C07K14/18 C07K14/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 981 286 A (FROMMBERGER BRUNO ET AL) 9 November 1999 (1999-11-09) the whole document	1-28
A	KING H D ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODY CONJUGATES OF DOXORUBICIN PREPARED WITH BRANCHED LINKERS: A NOVEL METHOD FOR INCREASING THE POTENCY OF DOXORUBICIN IMMUNOCONJUGATES" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 10, no. 2, March 1999 (1999-03), pages 279-288, XP000804254 ISSN: 1043-1802 the whole document	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search: 11 April 2002		Date of mailing of the international search report: 03/05/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer: Stricker, J-E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/11118

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 53951 A (ENZON INC) 28 October 1999 (1999-10-28) the whole document -----	

1

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

II. INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 01/11118

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5981286	A	09-11-1999	DE 4430998 A1	01-02-1996
			DE 4439346 A1	01-02-1996
			AT 187732 T	15-01-2000
			AT 193294 T	15-06-2000
			AT 214073 T	15-03-2002
			AU 682278 B2	25-09-1997
			AU 3164995 A	22-02-1996
			AU 689626 B2	02-04-1998
			AU 3165095 A	22-02-1996
			AU 688953 B2	19-03-1998
			AU 3220495 A	22-02-1996
			AU 690315 B2	23-04-1998
			AU 3220595 A	22-02-1996
			AU 684992 B2	08-01-1998
			AU 3220695 A	22-02-1996
			CA 2195648 A1	08-02-1996
			CA 2195752 A1	08-02-1996
			CA 2195753 A1	08-02-1996
			CN 1130910 A	11-09-1996
			CN 1134154 A	23-10-1996
			CN 1152923 A	25-06-1997
			CN 1157655 A	20-08-1997
			DE 4430972 A1	01-02-1996
			DE 4430973 A1	01-02-1996
			DE 4439345 A1	01-02-1996
			DE 4439347 A1	01-02-1996
			DE 59507438 D1	20-01-2000
			DE 59508391 D1	29-06-2000
			DE 59510092 D1	11-04-2002
			WO 9603650 A1	08-02-1996
			WO 9603651 A1	08-02-1996
			WO 9603652 A1	08-02-1996
			WO 9603409 A1	08-02-1996
			WO 9603423 A1	08-02-1996
			WO 9603410 A1	08-02-1996
			EP 0772616 A1	14-05-1997
			EP 0774119 A1	21-05-1997
			EP 0774120 A1	21-05-1997
			EP 0772774 A1	14-05-1997
			EP 0720614 A1	10-07-1996
EP 0723551 A1	31-07-1996			
ES 2143059 T3	01-05-2000			
ES 2148540 T3	16-10-2000			
FI 961349 A	25-03-1996			
FI 961350 A	25-03-1996			
FI 970299 A	24-01-1997			
FI 970300 A	24-01-1997			
FI 970301 A	24-03-1997			
JP 9508473 T	26-08-1997			
JP 10506708 T	30-06-1998			
WO 9953951	A	28-10-1999	US 6153655 A	28-11-2000
			AU 3648399 A	08-11-1999
			CA 2328922 A1	28-10-1999
			EP 1071455 A1	31-01-2001
			WO 9953951 A1	28-10-1999

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
// C 0 7 F 15/00	C 1 2 N 15/00	A
	C 0 7 F 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ヘス, エーファ

ドイツ連邦共和国 ミュンヒェン 8 1 4 7 6 ツイツェルスベルガーシュトラッセ 1 3 アー

(72) 発明者 ヘルマン, ルーペルト

ドイツ連邦共和国 ワイルハイム 8 2 3 6 2 イン デル アウ 2 3

(72) 発明者 フォン デル エルツ, ヘルベルト

ドイツ連邦共和国 ワイルハイム 8 2 3 6 2 イン デル アウ 2 1

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 CA11 CA20 HA13 HA14 HA20

4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR38 QR56 QS34 QX02

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17

BA41 BA50 BA55 BA57 CA05 DA86 EA50 EA61 EA65 FA33

FA41 FA44 FA51 FA52 FA58 GA05 GA25

4H050 AA01 AB20 AB84 WB14 WB21

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004510160A5	公开(公告)日	2005-03-03
申请号	JP2002530643	申请日	2001-09-26
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	アンドレスヘルベルト ヨーゼルハンスペーター ヘスエーファ ヘルマンルーベルト フォンデルエルツヘルベルト		
发明人	アンドレス,ヘルベルト ヨーゼル,ハンス-ペーター ヘス,エーファ ヘルマン,ルーベルト フォン デル エルツ,ヘルベルト		
IPC分类号	G01N33/543 C07F15/00 C07K1/107 C07K5/02 C07K7/02 C07K14/00 C07K14/16 C07K19/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/547 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6845 C07K1/1075 C07K1/1077 C07K14/001 G01N33/5306 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/543.525.G G01N33/543.525.E C07K5/02.ZNA C07K7/02 C07K14/16 C07K19/00 C12Q1/68.A C12N15/00.A C07F15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR38 4B063/QR56 4B063/QS34 4B063/QX02 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA41 4H045/BA50 4H045/BA55 4H045/BA57 4H045/CA05 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/EA61 4H045/EA65 4H045/FA33 4H045/FA41 4H045/FA44 4H045/FA51 4H045/FA52 4H045/FA58 4H045/GA05 4H045/GA25 4H050/AA01 4H050/AB20 4H050/AB84 4H050/WB14 4H050/WB21		
优先权	10048417 2000-09-29 DE		
其他公开文献	JP3647845B2 JP2004510160A		

摘要(译)

本发明涉及包含支链接头的新化合物，其用于产生用于诊断或治疗方法的复合物，及其用途。

