

(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2004-510162

(P2004-510162A)

(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 33/531	GO 1 N 33/531	A
// GO 1 N 30/88	GO 1 N 30/88	J
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 91 頁)

(21) 出願番号	特願2002-530645 (P2002-530645)	(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28日 (2003.3.28)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/011101		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02002/027317		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)		グレンツァーヘルストラツセ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	ヘス, ユーファ
(31) 優先権主張番号	01107491.1		ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 814
(32) 優先日	平成13年3月29日 (2001.3.29)		76 ツィツェルスベルガーシュトラッセ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		13アー

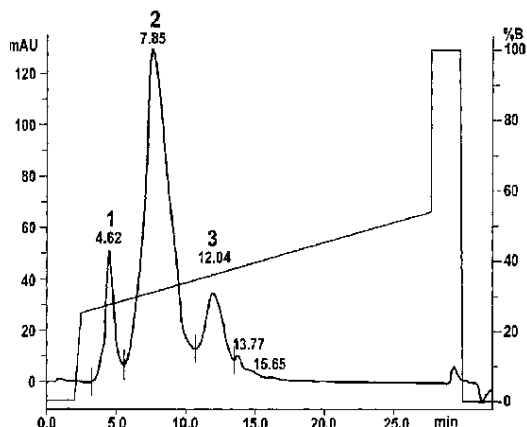
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 規定した化学量論の結合体

(57) 【要約】

本発明は、化学量論が均一である生体分子-リンカー結合体の生成プロセスに関する。特に、5 k Dから500 k D の分子量の生体分子ならびに1から15 k Dの分子量および4から60個の荷電した残基を有する親水性リンカー分子からなり、化学量論が均一である生体分子リンカー産物を少なくとも一つ予め選択された量で含むことを特徴とする結合体に関する。

Mono Q® chromatograph of a crude BSA-Ru(SK)₄MH conjugate



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

結合体が 5 k D ~ 5 0 0 k D の分子量の生体分子および親水性リンカー分子からなり、リンカーが 1 k D ~ 1 5 k D の分子量、4 ~ 6 0 個の荷電した残基を有してなり、

- a) 生体分子およびリンカー分子が互いに共有結合され、
 - b) 化学量論が均一である異なる生体分子 - リンカー産物がクロマトグラフィーによって分画され、
 - c) 化学量論が均一であるカップリング産物を含んでなる画分が収集される、
- ことに特徴を有する、化学量論が均一である少なくとも 1 つの生体分子 - リンカー産物を予め選択された量で含んでなる結合体の生成のためのプロセス。

10

【請求項 2】

親水性リンカーが 4 ~ 6 0 個の負に荷電した残基を含んでなることにさらに特徴を有する請求項 1 記載のプロセス。

【請求項 3】

親水性リンカーが 4 ~ 6 0 個の正に荷電した残基を含んでなることにさらに特徴を有する請求項 1 記載のプロセス。

【請求項 4】

親水性リンカーが 6 ~ 5 0 個の荷電した残基を含んでなることにさらに特徴を有する請求項 1 ~ 3 いずれか記載のプロセス。

【請求項 5】

リンカーがペプチド骨格を含んでなることにさらに特徴を有する請求項 1 ~ 4 いずれか記載のプロセス。

20

【請求項 6】

生体分子がポリペプチドであることにさらに特徴を有する請求項 1 ~ 5 いずれか記載のプロセス。

【請求項 7】

クロマトグラフィー分離が生体分子リンカー産物の見かけ分子量の差に基づくことにさらに特徴を有する請求項 1 ~ 6 いずれか記載のプロセス。

【請求項 8】

親水性リンカーが生体分子の見かけ分子量の > 2 0 % かつ < 5 0 0 % の見かけ分子量を有してなることにさらに特徴を有する請求項 1 または 7 記載のプロセス。

30

【請求項 9】

クロマトグラフィー分離が生体分子 - リンカー産物の電荷の差に基づくことにさらに特徴を有する請求項 1 ~ 6 いずれか記載のプロセス。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 いずれかに従って生成された結合体。

【請求項 11】

緩衝成分、安定化剤、および請求項 1 ~ 9 いずれかに従って生成された結合体を含んでなる試薬組成物。

【請求項 12】

適切な緩衝剤および試薬および少なくとも 1 つの請求項 11 記載の試薬組成物を含んでなる、サンプル中の被検体の生化学的または免疫学的検出用のテストキット。

40

【請求項 13】

免疫アッセイにおける請求項 1 ~ 9 いずれか記載の結合体または請求項 11 記載の試薬組成物の使用。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、化学量論が均一である生体分子リンカー結合体の生成プロセスに関する。特に、5 k D から 5 0 0 k D の分子量の生体分子ならびに 1 から 1 5 k D の分子量および 4 から 6 0 個の荷電した残基を有する親水性リンカー分子からなり、予め選択された量の化

50

学量論が均一である生体分子リンカー産物を少なくとも一つ含むことを特徴とする結合体に関する。

【0002】

結合アッセイは、現在では、研究環境ならびに臨床の日常的な業務、特に薬剤の感染モーターの診断または正常なもしくは異常な代謝を評価するための診断において広く使用されている。

【0003】

結合アッセイの使用は、約30年前にさかのぼる(Engvall, E. と Perlman, P., *Immunochemistry* 8 (1971) 871-4; van Weemen, B.K. と Schuures A.H.W.M. (1971), *FEBS Letters* 15, 232)。その後、大きな発展がなされ、特定の結合アッセイならびにその実用的な適用を行う方法は、当業者にとって一般的な知識となっている。関連する教科書に要約されている方法や手法は、参照により本明細書に包含され、ほんの少しの例のみが、特に、「*Methods in Enzymology*」(1992) Academic PressのTijssenによる「*Practice and theory of enzyme immunoassays*」; および免疫学的検出方法を取り扱った「*Methods in Enzymology*」, Colowick S. P., Caplan N.O., 編、Academic Pressの多くの版、特に第70, 73, 74, 84, 92および121巻でのみ言及されているだろう。

10

【0004】

非常にわずかな同種または沈降型アッセイを除いて、これら全てのアッセイは、生体分子(たとえば抗体)と、調査中の分析物の測定を促進するのに必要な第二の分子との間の結合体を必要としている。この第二の分子についての周知の例は、たとえば、酵素、放射性同位体、発光団、フルオロフォアなどのようなマーカー基または標識基、あるいはハプテンである。

20

【0005】

生体分子と、たとえばマーカー基またはハプテン基との結合体は、2つの異なる分子実体の直接の化学的カップリングによってまたは現在の技術水準の手法に従って、リンカーまたは架橋分子を用いることによって合成され得る(たとえば、Tijssen または *Methods in Enzymology*、上記)。

30

【0006】

しかしながら、従来の結合体は、はっきりした限定をもつ。かかる結合体のうち2または3成分、すなわち、生体分子、リンカー(もし、存在すれば)、およびマーカー基はお互いに相互にかつ逆に作用するという周知の問題がある。これは、頻繁に凝集またはバックグラウンドの問題を生じる。

【0007】

選ばれたカップリング化学反応またはリンカー化学反応に依存して、多くの場合、たとえば、マーカー基を有するまで終了しないポリペプチドのアミノ酸基も修飾される。これは、再び、予測できない結果を生じ、たとえば、不安定性、凝集のような問題または免疫アッセイにおける非特異的結合に対する生体分子の物理化学的特性の変化を経る。

40

【0008】

かかる結合体の種々の成分、たとえば、生体分子、リンカー分子およびマーカー分子ならびにこれら由来の異なるカップリング産物が統計的量で存在している。平均の標識化指標を有する純粋な統計的混合物が得られる。平均の標識化指標は、反応条件および選ばれた個々の分子の実体の割合を調整することによってある程度までコントロールされ得る。

【0009】

かかる統計的混合物は、異なる化学量論の異なる結合体産物を多く含む。リンカー構造またはマーカー構造を完全に持たない生体分子、1:1の化学量論、1:2の化学量論(すなわち、2個のリンカー分子またはマーカー分子を有する生体分子)、1:3の化学量論およびさらにより高い化学量論の結合体は、かかる結合体中に存在し得る。かかる産物は

50

すべてが所望されるわけではなく、たとえば、結合体の再現性に関して問題を引き起こすものではないことは明らかである。また、標識されていない生体分子は、標識された生体分子を妨げる。「過剰標識」、すなわち、多すぎるハプテン構造またはマーカ-構造で標識された生体分子が非特異的な相互作用、たとえば、バックグラウンドの現象として知られた問題についての主要な理由であることも既知である。

【0010】

米国特許第5,958,783号明細書は、親水性リンカーの実体を用いることにより、マーカ-基として金属キレート複合体で引き起こされるバックグラウンドの問題を減少することができることを開示している。しかしながら、米国特許第5,958,783号明細書に記載の結合体は、種々の異なる生体分子-リンカー-マーカ-産物の統計的混合物も示している。これらの統計的結合体の再現性にも問題が残っている。

10

【0011】

WO96/03423およびWO96/03651には、合成中に予め決定された位置にマーカ-基を導入することができることが記載されている。この方法では、化学量論が均一であるペプチドリンカー(マーカ-)産物を合成することができる。しかしながら、ペプチド合成の限界は、分子量5kD(kD=キロダルトン)未満のペプチドに対応する40~50個のアミノ酸の範囲である。5kDを超えるポリペプチドは、通常、適切な宿主系における組み換え発現によって産生され、統計的組成物の結合体を生じるように、化学的にカップリングされる必要がある。WO96/03423およびWO96/03657のリンカーは、1kD未満であり、荷電した残基を含まない。

20

【0012】

大きな生体分子、たとえば、40~50個のアミノ酸からなるポリペプチドは、通常、標準的なカップリング化学反応の一つに敏感に反応する反応基を一つより多く有する。

【0013】

化学的カップリングの形態およびストラテジーは、必要な場合に選択され得る。生体分子がチロシンの-SH、-NH₂または-COO⁻残基ならびに-OH基を標的とする化学反応をカップリングするポリペプチドである場合、ヒスチジンのイミダゾール基またはトリプトファンのヘテロ環イミノ基がすぐ近くにある。いくつかの適切なカップリング化学反応は、これらの官能基のそれぞれに関して当該分野から公知である(Aslam, M. Dent, A. The preparation of protein-protein conjugates in 「Bioconjugation」(1998) 216-363, London, McMillan)。

30

【0014】

1より多くの反応基が生体分子化学製品に存在するときは必ず、リンカーまたはマーカ-とのカップリングが、異なる生体分子-リンカー産物または生体分子-マーカ-産物の統計的混合物を生じる。

【0015】

もっとも発展したリンカーおよびカップリング化学反応についてでさえ、得られる結合体は多くの異なる結合体の統計的混合物であり、かつかかる結合体の全ての結果は、大いに変動して予期できない。結果として、数多くのものからかかる結合体の全ての特性を再生するのは非常に難しい。

40

【0016】

したがって、本発明の課題は、生体分子およびリンカー分子との間の結合体により再現可能でかつ規定された方法で得られるかどうかを調査することにあった。また、プロセスが発見され得るかどうかも調査され、化学量論が均一である予め選択された生体分子-リンカー産物の少なくとも一つを含む結合体を得る方法も記載された。

【0017】

おどろくべきことに、当該分野で既知の問題が、本発明の結合体、それらの生成様式および適当な試薬、キットおよび手法におけるそれらの使用によって解決され得ることがわかった。

50

【0018】

予め選択された量の化学量論が均一である生体分子-リンカー産物を少なくとも1つ含む結合体の生成プロセスであり、結合体が5 kDから500 kDの分子量の生体分子および1 kDから15 kDの分子量かつ4から60個の荷電した残基を有する親水性リンカー分子からなり、a) 生体分子とリンカー分子とがお互いと共有結合され、b) 化学量論が均一である異なる生体分子-リンカー産物がクロマトグラフィーにより分画され、ならびにc) 化学量論が均一であるカップリング産物を含む画分が集められることを特徴とする生成プロセスが開示されている。

【0019】

本発明はまた、5 kDから500 kDの分子量の生体分子かつ1から15 kDの分子量および4~60個の荷電した残基を有する親水性リンカー分子からなる結合体であり、該結合体が予め選択された量の化学量論が均一である生体分子-リンカー産物を少なくとも一つ含有することを特徴とする結合体に関する。 10

【0020】

本発明の結合体は、サンプル中の分析物の検出のための生物学的または免疫学的アッセイを行うのに特に有用である。したがって、本発明は、前記結合体を含む試薬の組成物、試薬組成物の一部としてかかる結合体を含有する試験キットならびにかかる結合体に基づく免疫アッセイにも関する。

【0021】

発明の詳細な説明

本発明の好ましい態様は、予め選択された量の化学量論が均一である生体分子-リンカー産物を少なくとも一つ含有する結合体の生成プロセスであり、該結合体が5 kDから500 kDの分子量の生体分子かつ、1 kDから15 kDの分子量および4から60個の荷電した残基を有する親水性リンカー分子からなり、
a) 生体分子とリンカー分子とがお互いと共有結合され、
b) 化学量論が均一である異なる生体分子-リンカー産物がクロマトグラフィーにより分画され、ならびに
c) 化学量論が均一であるカップリング産物を含む画分が集められることを特徴とする生成プロセスである。 20

【0022】

「結合体」という用語は、生体分子とリンカー分子との間のカップリング産物を記載するのに使用される。本発明の結合体は、予め選択された量の化学量論が均一である生体分子-リンカー産物を少なくとも一つ含有する。 30

【0023】

本発明の意味における生体分子とは、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、脂質、および/または糖のような生物学的分子から構成される、5から500 kDの分子量を有する任意の天然分子または合成的に生成された分子であり得る。好ましくは、生体分子は、ポリペプチド、多糖、およびリポ多糖からなる群より選ばれる。好ましくは、生体分子は10 kD~500 kDの範囲の分子量を有する。より好ましくは、生体分子は15 kD~400 kDの範囲、最も好ましくは20 kD~200 kDの範囲の分子量を有する。 40

【0024】

生体分子は、好ましくは、標準的なカップリング化学反応に敏感に反応する基を少なくとも2つ有する。反応基、官能基、またはカップリング部位として当該分野で公知であるこれらの基の例は、さらに以下に記載される。

【0025】

好ましい態様において、生体分子は、ポリペプチドである。好ましくはかかるポリペプチドは50~5000個のアミノ酸、より好ましくは100~4000個のアミノ酸を有する。

【0026】

本発明のリンカーは、1 kD ~ 15 kD の分子量を持ちかつ少なくとも4つの荷電した残基を有する。所定の分子量の範囲は、活性基またはマーカース基を持たない塩基性リンカー分子に適用される。

【0027】

前記リンカーの分子量は、少なくとも1000D であるのは、該リンカーの利点が特に明らかとなるからである。リンカーの分子量は、1000 ~ 15,000D の範囲であるのが好ましく、1000 ~ 12,000D の範囲が特に好ましく、1000 ~ 10,000D の範囲であるのが最も好ましい。また、リンカー分子の分子量の範囲については、1500から15000Dの間、また1500から10000Dの間であることが好ましい。

10

【0028】

本発明の結合体を生成するのに使用されるリンカーは、好ましくはペプチド骨格を有する。

【0029】

本発明の意味において「荷電キャリアー」という用語は、6 ~ 8の範囲のpH値でイオンの形で主に存在する基を意味する。リンカーは、好ましくは4 ~ 60個、特に好ましくは6 ~ 50個、最も好ましくは9 ~ 40個のかかる荷電キャリアーを含む。

【0030】

すべての荷電キャリアーは正または負に荷電されることが好ましい。しかしながら、両方、すなわち正および負に荷電した残基を有するリンカー分子を使用することもできる。かかる場合において、正に荷電した残基の数は、負に荷電した残基の数に比べて少なくとも4つまで高いまたは低いいずれかである。

20

【0031】

リンカーは、好ましくは負の荷電キャリアーを少なくとも4つ含む。適当な負の荷電キャリアーの例には、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シキレート基があり、カルボシキレート基およびホスフェート基が最も好ましい。

【0032】

さらに好ましくは、リンカーが少なくとも4つの正に荷電した残基を有する。正電荷キャリアーの例としては、アルキルが1 ~ 6個のC原子を有する直鎖または分枝アルキル残基あるいは3 ~ 6個のC原子を有する環状アルキル残基、グアニジニル基（たとえば、アルギニンの）、もしくは正に荷電したヘテロ芳香族窒素基（たとえば、ヒスチジンに見られるような）を示す、モノ、ジまたはトリアルキルアミノ基等のアミノ基およびモノ置換化もしくはポリ置換化アミノ基がある。正の荷電キャリアーは、好ましくはリジンなどの塩基性アミノ酸またはジエチルリジンなどの置換化アミノ酸から選択される。

30

【0033】

リンカーは、荷電キャリアーのかわりとしてまたは荷電キャリアーに加えて荷電していない親水性基も含み得る。荷電していない親水性基の好ましい例としては、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エチレンオキシド基または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一級アミド基、特に好ましくはアミノ酸側鎖基中のカルボン酸アミド残基（たとえば、アミノ酸であるアスパラギンおよびグルタミン）である。エステルは、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由来のものが好ましい。

40

【0034】

本発明のリンカーは、好ましくはさらなる化学構造を有するように修飾される。最も好ましくはかかる修飾リンカーは、式(Z-L-X_n)で示されかつ1つのZ基と1または数個のX基(n = 1 ~ 10)を有する(式中、Lは該リンカーのコア構造である)。

50

【0035】

反応基Zは、生体分子に対してリンカーを化学的に共有するのに用いられる。Z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、カルボン酸アジドまたは活性エステル（たとえば、N-ヒドロキシ-スクシンイミド、p-ニトロフェニル、ペンタフルオロフェニル、イミダゾリルまたはN-ヒドロキシベンゾトリアゾリルエステル）、アミン、マレイミド、チオール、パラアミノベンゾイル基または光活性基（たとえば、アジド）などの活性化カルボン酸基である。

【0036】

いずれかのX基は、上記Zについて規定されたような反応基であるか、またはXはマーカ-基である。Xが反応基である場合、一倍だけ存在し、かつリンカーはヘテロ二機能性リンカーである。当業者が、XについておよびZについての反応基の適切な組み合わせを選択することは何ら困難ではない。ヘテロ二機能性リンカーにおける適当な活性基の例としては、たとえば、Aslam, M. Dent, A. に挙げられる。タンパク質-タンパク質の調製は、「Bioconjugation」(1998) 216-363, London, McMillan または「Macromolecule conjugation」(1985) 258-268 におけるTijssen 研究所テクニクに活用される。Xがマーカ-基である場合、10倍まで、好ましくは4倍まで存在する。また、好ましいマーカ-基は2倍または1倍存在する。

10

【0037】

本発明に使用されるリンカーは、「直鎖」または「分枝」リンカーであってもよい。荷電した直鎖リンカーは、米国特許第5,958,783号明細書から公知である。かかる直鎖リンカーは、好ましくは15~350個の原子の鎖長を有し、アミド機能などのヘテロ原子の組み込みにより修飾されたアルキレン鎖である。遊離荷電キャリアーを含有する直鎖リンカーは、好ましくはアミノカルボン酸単位で少なくとも部分的に構成される。かかるアミノカルボン酸単位は、好ましくは、ペプチド結合を介して共に結合される。リンカーは、天然アミノ酸単位ならびに合成アミノ酸単位を含み得る。好ましくは、リンカーは、ジペプチド-アラニン-グルタミン酸を繰り返し含有する。好ましいリンカー構造は、5から70倍、より好ましくは10から60倍、最も好ましくは15から50倍のジペプチド-アラニン-グルタミン酸を含む。

20

【0038】

さらに好ましい態様におけるリンカーは、分枝リンカーである。

30

【0039】

分枝リンカーは、好ましくは、上記のような、1または数個の荷電していない親水性基特にカルボン酸アミド基および/またはポリエチレングリコール基を含有する1つの主鎖を含み、一方、1つまたは数個の側鎖において少なくとも4つの荷電キャリアーがある。この場合、たとえば、側鎖あたり1~10個の荷電キャリアー、特に1~5個の荷電キャリアーが存在し得る。

【0040】

あるいは、また、分枝リンカーは、主鎖に荷電キャリアーおよび1つまたは数個の側鎖に荷電していない親水性基を含み得る。さらなる態様では、主鎖および側鎖は荷電していない親水性基ならびに荷電キャリアーを含むことも考えられる。

40

【0041】

分枝リンカーは、いくつかのマーカ-基を有するように合成され得るというさらなる利点を有する。かかるリンカー(マーカ-)構造の共有的カップリングは、生体分子あたりおよびカップリング事象あたり数個のマーカ-基の導入を引き起こす。好ましいリンカー(マーカ-)構造は、2または4個のマーカ-基を有する。

【0042】

分枝リンカーの主鎖の長さは、好ましくは7~200原子、特に好ましくは7~100原子であり、その場合、主鎖は、ヘテロ原子(たとえば、O原子)またはアミド基の組み込みにより修飾されたアルキレン鎖であり、かつ少なくとも1つの分枝部位を含み、分枝

50

部位で形成された側鎖は、好ましくは4～100原子の長さを有する。荷電キャリアーは、主鎖および/または側鎖のアルキレン単位のH原子が荷電キャリアー（たとえば、 NH_3^+ または CO_2^- または グアニジル基）を含む基で置換されるような様式でリンカーにあることが好ましい。

【0043】

遊離荷電キャリアーまたは/および親水性基を含む分枝リンカーは、ペプチド結合により共に結合されるアミノカルボン酸単位で少なくとも部分的に構成されるのが好ましい。かかるリンカーにおいて、一つの官能基は側鎖合成のための開始点として使用され得る主鎖に組み込まれた後もなお存在するように、分枝点は、少なくとも3つの官能基（たとえば、アミノ基またはカルボキシレート基）を含む多機能性アミノカルボン酸から誘導され得る。分枝鎖は、特に好ましくはリジン、オルニチン、ヒドロキシリジン、 α -ジアミノプロピオン酸などのジアミノカルボン酸で生じる。

10

【0044】

分枝リンカーの荷電キャリアーは、好ましくは2つの荷電した基のリンカーへの組み込み、およびその付随反応の後、少なくとも1つの遊離荷電キャリアーがまだ存在するように、少なくとも3つの荷電した基（たとえば、アミノ基、カルボキシレート基またはホスフェート基）の全部を含む多機能性アミノカルボン酸の遊離した正および/または負に荷電した基から誘導され得る。たとえば、荷電キャリアーは、(a)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む、三機能性アミノカルボン酸から誘導され得る。かかる三機能性アミノカルボン酸の例としては、リジン、オルニチン、ヒドロキシリジン、 α -ジアミノプロピオン酸、アルギニン、アスパラギン酸およびグルタミン酸、カルボキシグルタミン酸および欧州特許第0618192号明細書もしくは米国特許第5,519,142号明細書に記載のような対称三機能性カルボン酸がある。あるいは、三機能性アミノカルボン酸(a)中のカルボキシレート基の1つは、ホスフェート基、スルホネート基または硫酸基で置換され得る。かかる三機能性アミノ酸の例としては、ホスホセリンがある。

20

【0045】

あるいは、分枝リンカーは、また、ホスフェート-糖単位（たとえば、核酸塩基を持たないDNA骨格）で少なくとも部分的に構成され得るかグリコペプチド構造で構成され得る。さらに、リンカーは、また、糖類単位で少なくとも部分的に構成され得る。任意の場合に、リンカーの側鎖は、三機能性単位で形成された主鎖の分枝鎖にあるのが好ましく、側鎖の長さは、合成に使用される基礎単位（たとえば、天然または合成アミノ酸あるいはエチレングリコールなどの他の成分）の少なくとも2つである。

30

【0046】

本発明によれば、1～15kDの分子量を有するリンカー分子を5～500kDの生体分子にカップリングし、化学量論が均一であるカップリング産物を単離または選択することができる。単離された画分は、次いで、第2の分子を第一の結合体にカップリングするのに最適に使用することができる。

【0047】

本発明のプロセスのさらに好ましい態様において、生体分子への化学的カップリングに使用される荷電したリンカー分子は、1または数個のマーカ-基をすでに有している。マーカ-基の例としては、標識基およびエフェクター基がある。いくつかの場所では、マーカ-基が既にリンカーに付着され得るという事実が、リンカー（マーカ-）を書き込むこと（write）によりさらに示されている。

40

【0048】

マーカ-基が小さくなればなるほど、現在の技術水準の手法による生体分子とマーカ-との間での化学量論が均一であるカップリング産物の分離はより難しくなる。

【0049】

好ましくは、マーカ-基（標識基またはエフェクター基）は、15000D未満、より好ましくは10000D未満の分子量を有する。最も好ましくは、マーカ-基は5000D

50

よりさらに小さい。好ましい態様において、リンカーに付着したマーカー基は、3000 D 以下の分子量を有する。

【0050】

かかるリンカー（マーカー）、すなわち、1または数個のマーカー基をいっしょに持つリンカーの完全な分子量は、好ましくは20kD以下、より好ましくは15kD以下、最も好ましくは10kD以下である。

【0051】

標識基は、任意の検出可能な既知の基（たとえば、染料）、化学発光基などの発光標識基（たとえば、アクリジニウムエステルまたはジオキシエタン）、または蛍光染料（たとえば、フルオレセイン、クマリン、ローダミン、オキサジン、レゾルフィン、シアニン）およびそれらの誘導體から選択され得る。標識基の他の例には、ルテニウム複合体またはユーロピウム複合体などの発光金属複合体、CEDIA（クローン化酵素ドナー免疫アッセイ、たとえば欧州特許第0061888号明細書）に使用される酵素、および放射性同位体がある。

10

【0052】

エフェクター基は、たとえば、バイオアフィン（bioaffine）結合対の1つのパートナーを含む。アッセイを行いながら、エフェクター基は、バイオアフィン結合対の他のパートナーと特異的に、かつ好ましくは非共有結合的に相互作用する。適当な結合パートナーの例には、ハプテンまたは抗原/抗体、ビオチンまたはアミノビオチンなどのビオチンアナログ、イミノビオチンまたはデスチオビオチン（desthiobiotin）/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/相補的核酸、レセプター/リガンド（たとえば、ステロイドホルモンレセプター/ステロイドホルモン）がある。好ましくは、リンカー（マーカー）が生体分子にカップリングされる前、より低分子量の結合対メンバーが、そのリンカーにカップリングされる。標識基について記載したように、好ましい分子量の範囲は、エフェクター基にも適用される。

20

【0053】

好ましい結合対メンバーは、ハプテン、抗原およびホルモンを含む。特に好ましくは、ジゴキシンおよびビオチンのようなハプテンならびにそれらのアナログである。

【0054】

荷電した直鎖リンカー分子 - またはマーカーをすでに有するリンカー構造 - は、米国特許第5,958,783号明細書に記載のように本質的に合成される。

30

【0055】

荷電した分枝リンカー分子またはリンカー（マーカー）分子は、たとえば、固相合成法により得られる。固相合成法の第一段階では、アミノ酸がそのカルボキシレート基を介して、固相支持体にカップリングされ、次いで所望のリンカーがさらなるアミノ酸を続けてカップリングすることにより合成される。このプロセスで、側鎖基（たとえば、アミノ基またはカルボキシレート基）として荷電した基を含む少なくとも1つのアミノ酸と、分枝部位として作用し、任意に保護された形である少なくとも1つのアミノ酸とが、本発明のリンカーを調製するのに使用される。所望のリンカーシーケンスの完了後、リンカーを固相支持体からはずす（cleave off）または活性化マーカー（たとえば、活性エステルを有するマーカー）を固相に結合したペプチドの遊離N末端アミノ基にカップリングすることができる。固相からはずした後、反応基Zをペプチドリンカーのカルボキシ末端にカップリングすることができるまたは、カルボキシ末端自体を反応基Zとして作用させるのに使用する。存在し得る保護基ははずす。

40

【0056】

固相合成の別の形式において、保護されたアミノ基およびカルボキシル基（例えば、Fmoc-Lys-(-Ru(ピピリジル)₃-OH)を含むアミノ酸マーカー結合体は、遊離カルボキシル基によって固相へアンカーされ得、ペプチドリンカーが、ブロックされたアミノ基の解離後に合成され得る。所望のリンカー配列の完成後、この複合体は、固相から切断される。反応基Zは、生じたペプチドリンカーのアミノ末端にカップリングされ

50

得るか、または自身のアミノ末端を使用して反応基 Z として機能する。

【0057】

一方で生体分子と、他方ではリンカー分子との化学カップリングは、種々の生体分子 - リンカー産物の統計的混合物を誘導する。言い換えれば、このような粗結合体は、多くの異なるカップリング産物（すなわち、全く結合体化されていない生体分子、1つのリンカー構造を含む生体分子、2つのリンカー構造を含む生体分子など）を統計的量で含む。これらの生体分子 - リンカー産物サブグループのそれぞれは、均一な化学量論によって特徴付けられる。これは、例えば、1つの生体分子あたり1つのリンカー構造を含むこのサブグループが 1 : 1 の均一な化学量論を有することを意味する。

【0058】

例えば、ハプテン - タンパク質 - 結合体は、予め規定したモル比で化学的に活性なハプテンをタンパク質とインキュベートすることによって合成され得る。特定のカップリング化学反応は、種々の機能のアミノ酸基（-SH ; -NH₂ ; -COO⁻ ; -OH ; チロシンのイミノ基、ヒスチジンのイミダゾール基）を標的とすることが公知である。通常、これらの基は、タンパク質に繰り返し存在する。結果として、このハプテンは、一様には分布されないが、むしろこのハプテンは、ポワソン分布でタンパク質に結合される。ポワソン分布は、以下のように表され得る：

【数1】

$$P(r) = m^r x e^{-m} / r!$$

【0059】

P (r) は、1分子あたりに結合された r (0、1、2、3 など) 個のハプテンを有するタンパク質分子の関数 (f r a c t i o n) であり ; m は反応混合物におけるハプテンとタンパク質との間の平均モル比であり ; e = E u l e r 数、かつ r ! は r の階乗 (f a c u l t y) (例えば、r = 3 の場合、r ! = 3 × 2 × 1) を示す。これは、例えば、1つのタンパク質分子あたりに結合された平均1つのハプテン分子を含むカップリング産物の粗混合物について、統計的にかつおおよそ 36 . 7 % のタンパク質分子は全く標識化されず、36 . 7 % は1つのハプテン分子を所有し、18 . 3 % は2つのハプテン分子を所有し、6 . 1 % は3つのハプテン分子を所有し、残りはいっそう高く標識されていることを意味する。

【0060】

ここで例えば、生体分子とリンカー分子によって一緒に連結された小さいマーカース基（さらにそれ自身が例えば、免疫学的 (i m m u n o l g i c a l) アッセイにおけるバックグラウンドの減少に有利な効果を有する）との間の結合体が、予め測定され、予め規定された組成物においてすぐに利用可能であることは、本発明のきわめて魅力的な特徴である。

【0061】

当該分野から公知の結合体は、通常、標識化指標によって特徴付けられる。この標識化指標は、1生体分子あたりの標識（またはリンカー（マーカース基）の平均量を示す。従って、2 . 3 の標識化指標は、生体分子 - 標識産物の全混合物において1つの生体分子あたり 2 . 3 個の標識が存在することを示す。複雑な手法（例えば、M A L D I - T O F (マトリクス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間) 質量分光学) によって化学量論が均一であるカップリング産物の相対量を測定することは、方法を精巧にすることで可能である。しかし、このような方法は、化学量論が均一である画分を分離するのに適切ではない。本発明の手法は、化学量論が均一である少なくとも1つの予め選択された生体分子リンカー産物を非統計的量で含む結合体の生成を可能にする。

【0062】

用語「予め選択された」は、本発明の結合体が生体分子とリンカー分子との間の化学的結合体化の単なる統計的な結果ではなく、むしろ適切な画分の予め選択された結果であることを示すように使用される。化学量論が均一である1つのカップリング産物、または所望の場合、数個のカップリング産物は、随意に（必要な場合）すぐに選択され得、この結合

10

20

30

40

50

体が意図される適用のために適切に構成され得る。

【0063】

化学カップリングの形式およびストラテジーは、要求されるように選択され得る。生体分子が官能基として -SH、-NH₂ または -COO⁻ 残基を含むポリペプチドである場合、いくつかの適切なカップリング化学反応は、これらの官能基のそれぞれについて当該分野から公知であり、いくつかのみが言及されるべきである。注意深い読み手は、Aslam, M. Dent, A. The preparation of protein-protein conjugates, 「Bioconjugation」(1998) 216 ~ 363, London, McMillan に必要な詳細の全てを見出す。

【0064】

生体分子のアミノ基（リジン側鎖の末端 -NH₂ 基または NH₂ 基およびジアミノカルボン酸のアミノ基）は、「アミノ化学反応」に基づくそれらへのマーカースの化学的カップリングのために使用され得る。アミノ化学反応の周知の例は、特に活性化基と呼ばれる、例えば、NHS-エステル、他の活性化エステル、酸塩化物およびアジドとアミノ基との反応を含む。

10

【0065】

生体分子上のカルボキシル基（末端 COO⁻ 基、グルタミン酸またはアスパラギン酸のカルボキシ官能基）は、「カルボキシ化学反応」に基づく化学的カップリングのために使用される。カルボキシ化学反応の周知の例は、特に上記の活性化基を所有するためにこれらのカルボキシ基の活性化を含む。次いで、例えば、マーカース上のアミノ基へのカップリングが容易に実施される。

20

【0066】

あるいは、生体分子上のスルフヒドリル基（例えば、システインの遊離 SH- 基またはジスルフヒドリル結合を還元することによって得られる -SH 基）は、「スルフヒドリル化学反応」に基づく化学的カップリングのために使用される。スルフヒドリル化学反応の周知の例は、特にマレイミド (maleimido) 基と -SH 基の反応、またはハロゲンカルボン酸またはチオエーテルを用いるアルキル化を含む。

【0067】

チロシン残基のヒドロキシル基またはヒスチジンのイミダゾール基はまた、生体分子へマーカースを共有結合するために助け（例えば、ジアゾニウム基の）として使用される。

30

【0068】

生体分子をリンカーまたはリンカー（マーカース）へカップリングするための化学的反応は、実行され、必要な場合、当該分野から公知のように停止される。一方、当該分野において、通常、結合体化されていない小さいリンカーまたはリンカー（マーカース）分子のみが、高分子量の生体分子-リンカー画分から分離されるが、結合体化生体分子からの遊離生体分子の分離は非常に困難であるか、または不可能である。この分離およびまたその化学量論に従うカップリング産物の分離選択は、現在可能であり、クロマトグラフィー手法によって実施される。結合体化産物は、リンカー構造に起因する特性に基づいて、化学量論が均一である画分へ分離される。

【0069】

新規な生体分子-リンカー産物の特に魅力的な特徴は、見かけ分子量、疎水性、および電荷における違いである。異なる化学量論を有する種々のカップリング産物の違いは、単純に1つの生体分子あたりのリンカーの数に依存する。

40

【0070】

好ましい態様において、クロマトグラフィー分画が、（見かけ）分子量に基づく分離手法によって実施される。特有であるが異なる化学量論を有する種々のカップリング産物の分画は、分子量に基づいて可能であり、よく言えば、この分離は見かけ分子量の差に基づく。分子量における絶対的な差が、異なる化学量論のカップリング産物間で比較的の小さいにもかかわらず、見かけ分子量の差は、事実上明白である。これは、本発明において使用されるリンカー分子によって引き起こされる。これらの分子は1 ~ 15 kDの分子量を有

50

しているが、これらの分子は、非常に異常なかつ非常に高い見かけ分子量を有するように移動する。

【0071】

本発明に従って、現在、例えば、リンカー（標識）分子を所有しない、2つ、3つ、またはそれより多いリンカー（標識）分子を所有するFab'フラグメント由来の1つのリンカー（標識）分子を所有する約50kDの分子量を有する抗体のFab'フラグメントを容易に分離し、所望の場合、分画することは可能である。これは、実施例4および実施例5にならびに図10および11に例示される。このような分離は可能である。なぜならば、本発明に従う生体分子-リンカー結合体のリンカー構造は、その実際の分子量よりずっと高い見かけ分子量を有することが見出されているからである。

10

【0072】

より大きな生体分子（例えば、F(ab')₂フラグメント（約100kD）、BSAまたは免疫グロブリンGおよび一旦適切なリンカーもしくはリンカー（マーカー）にカップリングされたリンカーまたはリンカー（マーカー）分子）間で均一な化学量論のカップリング産物を分離することは可能である。

【0073】

生体分子についての見かけ分子量は、当該分野で公知の手法に従って容易に測定され得る。慣用的に使用されるものは、例えば、分子篩クロマトグラフィーである。目的の分子は、クロマトグラフィーされ、見かけ分子量は、この分子に対する保持時間を1つまたはいくつかの分子量マーカーの保持時間と比較することによって測定される。

20

【0074】

見かけ分子量は測定に使用された手法によって非常に影響を及ぼされるので、生体分子の見かけ分子量およびリンカーまたはリンカー（マーカー）構造の見かけ分子量は共に、同じ手法によって測定される。

【0075】

分子量クロマトグラフィーによる容易な分離のために、生体分子の見かけ分子量にマッチするリンカーが選択される。好ましくは、リンカー（マーカー）の見かけ分子量は、生体分子の少なくとも20%および多くとも500%の分子量である。それによって、以下のような特徴を有する、化学量論が均一である少なくとも1つの生体分子-リンカー産物を予め選択された量で含む結合体（この結合体は5kD~500kDの分子量の生体分子および疎水性リンカー分子からなり、このリンカーは1kD~15kDの分子量、4~60個の荷電した残基および上記生体分子の見かけ分子量の20%~500%の見かけ分子量を有する）の生成のためのプロセスが、本発明の好ましい態様を表す。このプロセスは、

30

(a) この生体分子およびこのリンカー分子が互いに共有結合され、
(b) 化学量論が均一である異なる生体分子-リンカー産物がこの生体分子-リンカー産物の見かけ分子量の違いに基づいてクロマトグラフィーによって分画され、
(c) 化学量論が均一であるカップリング産物を含む画分が収集されることに特徴を有すること、
ことに特徴を有する。より好ましくは、リンカーまたはリンカー（マーカー）の見かけ分子量は、生体分子の見かけ分子量の25%~400%であり、最も好ましくは30%~330%である。

40

【0076】

（見かけ）分子量による分離は、好ましくは、Sephadex S 200HR（登録商標）のようなクロマトグラフィー材料を用いる分子篩クロマトグラフィーにより行われる。

【0077】

本発明により使用されるリンカー構造のさらに著しく、かつ特徴的な特性は、それらが、1分子当たり少なくとも4つの荷電した残基を有するという事実である。リンカー内の多数の荷電した残基はまた、生体分子-リンカー産物の正味の荷電における差異を導き、こ

50

これらの荷電の差異は、生体分子当たりのリンカーの数に依存する。例えば、生体分子当たり1つのリンカーを有する生体分子-リンカー産物(均一な1:1の化学量論)は、今や驚くべきことに、かつ容易に、異なる化学量論の生体分子-リンカー産物から、または荷電の差異に基づいて付着したいかなるリンカーをも必要とすることなく生体分子から分離されうる。

【0078】

好ましい態様では、本発明は、予め選択された量の化学量論が均一である少なくとも1つの生体分子-リンカー産物を含む結合体の生成のためのプロセスに関し、該結合体は、5 kD ~ 500 kD の分子量の生体分子および親水性リンカー分子からなり、該リンカーは1 kD ~ 15 kD の分子量、4 ~ 60 個の荷電した残基を有し、

10

a) 生体分子およびリンカー分子が、互いに共有結合する
b) 化学量論が均一である異なる生体分子-リンカー産物が、該生体分子-リンカー産物の荷電における差異に基づいて、クロマトグラフィーにより分画される、および
c) 化学量論が均一であるカップリング産物を含む画分が回収される
という特徴を有する。

【0079】

好ましくは、イオン交換クロマトグラフィーのような標準的なクロマトグラフィー材料および手法(例えば、Amersham-Pharmacia BioetchからのMono Q(登録商標)、Mono S(登録商標)、Source Q(登録商標)またはSource S(登録商標)を使用することは、荷電の差異に基づく化学量論が均一である生体分子-リンカー産物を分離するために使用される。所望の産物を含む画分が回収される。予め選択された化学量論の個々の生体分子リンカー産物または予め選択された化学量論のいくつかの産物の混合物が予め選択された相対量で得られる。所望される場合、高純度レベルが再クロマトグラフィーによって得られる。結合体の任意の所望の予め選択された比は、適切な画分をプールすることにより得られる。

20

【0080】

上記のように、異なる化学量論のカップリング産物はまた、それらの親水性に関して異なる。親水性リンカー構造は、カップリング産物の全体の親水性または疎水性に影響する。好ましい態様における異なる化学量論の産物はまた、Phenyl Sepharose HP(登録商標)、Butyl Sepharose 4 fast flow(登録商標)等の現在の技術水準の樹脂を用いて疎水性相互作用クロマトグラフィーにより分離される。必須の材料および手法は、Aslam, M. Dent, A. The preparation of protein-protein conjugates 「Bioconjugation」(1998) 216-363, London, McMillanに記載されている。逆相クロマトグラフィーもまた使用されうる。

30

【0081】

本明細書中に記載される手法に従って生成された結合体は、所望される量の生体分子とリンカー分子との間の少なくとも1つの均一なカップリング産物を含む。化学量論が均一である各々のカップリング産物の相対量は、必要とされる場合、予め選択されうる。化学量論が均一である個々のカップリング産物の予め決定した、所望の相対量は、正確に、かつ再現性よく調整されうる。

40

【0082】

さらに好ましい態様では、予め選択された結合体は、非結合体生体分子を本質的に含まない。

【0083】

現在可能である分画に基づいて、本発明の結合体は、1:5およびそれより多い化学量論で生体分子-リンカー産物を含まない。

【0084】

好ましい態様では、本発明は、5 kD ~ 500 kD の分子量の生体分子および親水性リンカー分子(該リンカーは分子量1 ~ 15 kDおよび4 ~ 60 個の荷電した残基を有する

50

)からなる結合体に関し、該結合体は予め選択された量の化学量論が均一である少なくとも1つの生体分子-リンカー産物を含むことを特徴とする。

【0085】

化学量論が均一である任意の所望される純度の個々のカップリング産物は、今や生成され、再現されうる。必要とされる比(相対量)で化学量論が均一である種々のカップリング産物を含む混合物は、容易に生成され、再現されうる。それゆえ、本発明の結合体は、化学量論が均一である少なくとも1つの他の生体分子-リンカー産物と比べて予め選択された相対量で化学量論が均一である少なくとも1つの生体分子-リンカー産物を含む。

【0086】

より小さな化学量論が均一である生体分子-リンカー産物が結合体の一部を形成するほど、より容易に生成され、再現される。好ましい結合体は、本質的に、1~3の化学量論が均一である個々の生体分子-リンカー産物を含む。より好ましい結合体は、本質的に、化学量論が均一である2つの異なるカップリング産物を含む。最も好ましい態様では、本発明の結合体は、1:1化学量論の生体分子-リンカー産物を本質的に含む。

【0087】

さらに好ましい態様では、本発明の結合体は、化学量論が均一である唯一の生体分子リンカー産物を本質的に含む。

【0088】

種々のカップリング産物の中で、1:1~1:4の均一な化学量論を有するものが好ましい。特に好ましいものは、1:2および1:1の化学量論を有する生体分子リンカー産物であり、後者は、化学量論が均一である最も好ましいカップリング産物を表す。

【0089】

用語「本質的に含む」は、他のカップリング産物の相対量と比べて、化学量論が均一である1つのカップリング産物(または3つまでのカップリング産物の混合物(各々))の相対量をいう。言い換えると、かかる結合体における全てのカップリング産物の少なくとも80%が予め選択された化学量論である。好ましくは、本質的に、少なくとも80%の均一なカップリング産物(またはカップリング産物の所望の混合物)を含む結合体に関する。90%の予め選択されたカップリング産物またはカップリング産物の混合物を含む結合体がより好ましい。最も好ましいのは、他のカップリング産物と比べて、選択された結合体(単数または複数)について95%の相対純度である。

【0090】

別の好ましい態様では、本発明の結合体は、他のカップリング産物と比べた相対量において少なくとも80%の化学量論が均一である2つの生体分子-リンカー産物を含み、最も好ましくは少なくとも80%の化学量論が均一である1つのみの生体分子-リンカー産物を含む。

【0091】

非常に好ましい結合体は、5kD~500kDの分子量を有する生体分子と親水性リンカー分子(該リンカーは1~15kDの分子量および4~60個の荷電した残基を有する)との間の均一な1:1の化学量論のカップリング産物を相対純度80%以上で含む。すなわち、この1:1結合体は、他の生体分子-リンカー産物の合計と比べて80%またはそれより多くの相対量で存在する。

【0092】

より好ましくは、90%またはそれより多くの相対量で1:1の化学量論を有するカップリング産物を含む結合体であり、さらに好ましくは、異なる化学量論のカップリング産物と比べて、95%またはそれより多くの相対量で1:1の化学量論のカップリング産物を含む結合体である。

【0093】

今日、市販のアッセイは、可能な限り少ない取り扱いステップで済むように生成されている。これは、簡便であり、取り扱いのエラーの機会を減らす。もちろん、本発明の結合体を、例えば凍結、または凍結乾燥したものとしてカスタマーに提供することができる。

10

20

30

40

50

【0094】

結合体が試薬組成物の一部であることが好ましい。多くの場合、結合体は、希釈形態および液体形態で存在し、それゆえ、安定化剤（例えば、ウシ血清アルブミンおよび/または種々の糖）、また任意に保存剤および/または界面活性剤等の試薬が存在する。さらに好ましい態様では、本発明は、緩衝液成分、安定化剤、および予め選択された量で化学量論が均一である少なくとも1つの生体分子-リンカー産物を含む結合体を含む試薬の組成物に関する。

【0095】

好ましくは、本発明により生成された結合体は、試験片タイプの免疫学的デバイスにおいて使用される。

10

【0096】

通常、単一試薬ではなく、むしろ少なくとも分析物特異的アッセイ試薬を含む完全なキットがカスタマーに提供される。好ましい態様では、本発明は、サンプル中の分析物の生化学的または免疫学的検出のための試験キットに関し、該キットは適切な緩衝液および試薬ならびに本発明の結合体を含む試薬の少なくとも1つの組成物を含む。

【0097】

新規結合体に基づく免疫アッセイは、従来技術の方法で産生される結合体に基づくアッセイと比べて優位な特徴を有する。アッセイ自身におけるこのポジティブな効果は、実施例のセクションに示される。新規結合体が、別の比較可能なアッセイ条件化で使用される場合、著しく、バックグラウンドの問題は有意に低減される。免疫アッセイにおいて本発明に記載されるような特異的結合対のメンバーを生体分子として含む結合体の使用は、それゆえ、本発明の別の好ましい態様を表す。

20

【0098】

好ましくは、新規結合体は、分析物特異的結合パートナーと分析物との間の反応に基づく分析物の検出、および得られる分析物結合パートナー複合体の測定に使用される。特異的結合アッセイの最も知られている例は免疫アッセイである。生体分子-リンカー（マーカ-）結合体に基づく免疫アッセイにおいて、新規プロセスおよび試薬は、結合体の再現性に貢献する。より再現性の高い結合体であるほど、それに基づくアッセイはより良好な再現性を有する。

【0099】

考察されるように、結合体の質および現在の技術水準の手法による再現性の両方は、限られた程度までだけ影響しうる。例えば、最終結合体から凝集体または沈殿物を除去することができる。生体分子とリンカー分子との間の異なる化学量論のカップリング産物の相対量を調整することは現在の技術水準の手法では不可能である。意図される適用に最も適した化学量論が均一であるカップリング産物を含む画分を選択することは非常に困難であるかまたは不可能である。これらの欠点は、本発明により解消された。

30

【0100】

以下の実施例、参考文献、および図は、本発明、添付の特許請求の範囲に示される真の範囲の理解を補助するために提供される。本発明の意図を逸脱することなく示される手法に修飾が行われうるということが理解される。

40

【0101】

実施例1：現在の技術水準に従うウシ血清アルブミンのルテニウム化（*ruthenylation*）

当該分野で公知のウシ血清アルブミンおよびリンカー（図1を参照のこと）を、5つの結合体混合物を提供するために使用している。ロットサイズ、試薬濃度、緩衝組成物、反応時間、試薬温度およびクロマトグラフ分離手法などの全ての変数を、一定に保っている。

【0102】

BSAを、20mg/mlの濃度で100mMのリン酸カリウム緩衝液（pH 8.0）に溶解した。hy-BPRuリンカー（標識；cf. 図1、上）を47mg/mlの濃度でDMSOに溶解した。5倍モルを超過するhy-BPRuをBSA溶液に添加

50

し、試薬を入念に混合し、反応を25にて75分間実施した。反応を、10 mMの最終濃度までのリジンの添加および25にてさらに30分間攪拌下でのインキュベートによって停止した。

【0103】

遊離未結合誘導試薬を、pH 7.5にて50 mMリン酸、150 mM塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)(500倍過剰で使用されている)に対する透析(20時間、4にて)によって完全に除去した。

【0104】

図1におけるO-ヒドロキシスクシニミドエステルの活性基は、統計的にBSAの異なるNH₂-基と反応する。生じた粗結合体を、pH 6.5にて0.05 mmol/lリン酸ナトリウム、0.05 mmol/l塩化ナトリウムおよび5%メタノールの緩衝条件を使用してSuperdex 200 HR(登録商標)クロマトグラフィーによってクロマトグラフィーしている。溶出をモニタリングする。適切な画分をプールする。産物ピークをエレクトロスプレーイオン化質量分光学(electrospray-ionization mass-spectroscopy)(ESI-MS)によって分析した。このような分析の結果を、表1および2に要約する。

10

【0105】

【表1】

表1：分子量に従うBSAルテニウム結合体の分布

ロット	標識化指標 BSA : BPRu	化学量論 1 : 0	化学量論 1 : 1	化学量論 1 : 2	化学量論 1 : 3	化学量論 1 : 4
BSA 未修飾	0	66500 D				
結合体 Ch1	1 : 2, 3		68300 D	69400 D	70400 D	71300 D
結合体 Ch2	1 : 2, 3	66500 D	68300 D	69500 D	70500 D	
結合体 Ch3	1 : 2, 8		68500 D	69600 D	70700 D	71800 D
結合体 Ch4	1 : 2, 9		68000 D	69200 D	70300 D	
結合体 Ch5	1 : 3, 1			69400 D	70600 D	71500 D

20

30

【0106】

【表2】

表2：異なるカップリング産物の相対量

(最も豊富なカップリング産物は、1に設定されており、他はその相対量として表している。)

ロット	標識化指標 BSA : BPRu	化学量論 1 : 0	化学量論 1 : 1	化学量論 1 : 2	化学量論 1 : 3	化学量論 1 : 4
BSA 未修飾	0	1,00				
結合体 Ch1	1 : 2, 3		0,77	1,00	0,57	0,40
結合体 Ch2	1 : 2, 3	0,48	0,48	1,00	0,71	
結合体 Ch3	1 : 2, 8		0,38	0,78	1,00	0,62
結合体 Ch4	1 : 2, 9		0,59	1,00	0,57	
結合体 Ch5	1 : 3, 1			0,54	1,00	0,56

10

【0107】

同一の条件下で生成されたにもかかわらず、5ロット全てが明らかに互いに異なることが、表1および2から明らかである。ロット1および2は、2.3の同じ全標識化指標（これは、1つのBSA分子あたりに見出される平均2.3個のルテニウム標識を意味する）を有する。それにもかかわらず、両調製物は、表2から明らかなように個々の結合体化産物の相対量において有意に異なる。全標識化指標はまた、かなり有意に変わる。Superdex 200 HR（登録商標）カラムを使用する標準的なクロマトグラフ手法によって、全ての反応産物が同質のピークとして溶出することは図2から明らかである。例えば、1:1結合体を均等に含む画分へのカップリング産物の分別は、不可能である。

20

【0108】

実施例2：リンカー構造の合成

分枝リンカー構造の合成

固相ペプチド合成による分枝リンカーの調製

分枝リンカーを、バッチペプチドシンセサイザー（例えば、Applied Biosystems製A433）でのフルオレニルメチルオキシカルボニル-（Fmoc）-固相ペプチド合成によって合成した。各場合において、表3に示すアミノ酸誘導体の4.0当量を使用した。

30

【0109】

【表3】

表 3 :

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-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

10

20

30

【 0 1 1 0 】

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(S. - S. Wang, J. Am. Chem. Soc. 95 (1973) 1328)。この樹脂を、0.2 ~ 0.4 mmol/g で充填する。カップリング反応を、反応培地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ジメチルホルムアミド中で20分間実行した。Fmoc基を、20分間ジメチルホルムアミド中で20%ピペリジンを用いた合成の各工程の後、切断した。樹脂の量を選択し、その結果、最終分枝の後、アミノ基に対して4当量のFmoc-アミノ酸を使用する。Fmoc-Lys(Fmoc)-OHを、2つの同一アームの分枝および続く合成のために使用する。非対称の分枝を、直交する側鎖保護基(例えば、Fmoc-Lys(Dde)またはFmoc-Lys(Alloc))を有するアミノ酸誘導体によって達成する。これらの直交する保護基を、文献において公知の方法によって樹脂上で切断する(B. W. Bycroftら(1993), J. Chem. Soc., Chem. Commun., 778; A. Merzoukら(1992) Tetrahedron Lett. 33, 477)。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するかまたはスクシニル化する。

40

50

【0111】

誘導体が固相合成の間に安定である場合、ハプテン、標識または官能基は、すでに樹脂上（例えば、ペプチドのN-末端アミノ酸上）に導入されている。

【0112】

例えば、金属キレート標識の導入を、キャリア結合ペプチドの遊離N-末端アミノ基で適切な活性エステル誘導体を介して実施した。この遊離1級アミノ官能基あたり4当量のルテニウム（ビピリジル）3複合体（BPRU）に対して、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、少量のDMSOに溶解し、これを滴状添加し、室温にて2時間攪拌した。

【0113】

マーカーはまた、例えば、金属キレートまたはビオチンカップリングアミノ酸誘導体の直接組み込みによってすでに固相合成の間にC-末端で導入され得る（WO96/03409に記載される）。

【0114】

ペプチドを支持体から解離し、酸不安定な保護基を、20mlのトリフルオロ酢酸、0.5mlのエタジオール、1mlのチオアニゾール、1.5gのフェノールおよび1mlの水を用いて室温にて40分以内に切断する。使用するアミノ酸誘導体に依存して、ラジカル捕獲をほとんど含まないカクテルをまた使用し得る。300mlの冷却ジソプロピルエーテルを、反応溶液に引き続き添加し、この混合物をペプチドを完全に沈殿するために40分間0にて維持した。沈殿物を濾過し、ジソプロピルエーテルを用いて洗淨し、少量の50%酢酸に溶解し、凍結乾燥した。得られた粗物質を、適切な勾配（溶出液A：水、0.1%トリフルオロ酢酸、溶出液B：アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸）にわたってDelta-PAKPRC18カラム（50×300mm、100；15μ）上で分離用HPLCによって約120分以内に精製した。溶出された物質を質量分光測定法によって同定した。

【0115】

あるいは、マーカー基をまた、樹脂からの切断後に導入し得る。このために、固相ペプチド合成の間および切断の間、安定な保護基で誘導されるべきでない他の基をブロックする必要があり得る。例えば、フェニルアセチル（Phac）を、使用し、保護基をPenGアミダーゼを用いて酵素的に除去し得る（PCT/EP95/02921に記載される）。

【0116】

b) 荷電した直鎖リンカー構造の合成

荷電した直鎖リンカー構造を、米国特許第5,958,783号に記載されるように本質的に合成している。

【0117】

c) 研究したリンカー構造の例

表4は、使用したいくつかのリンカー構造に関する概略を提供する。構造1および10は、当該分野で既知の構造であり、一方、他の全ての構造は、さらなる特徴（例えば、著しく高い見かけ分子量）を含む。

【0118】

利用可能なように、研究室名をまた提供している。これらの構造（またはMH活性化またはDSS活性化のために使用する基本構造）を提供する図を参考にする。

【0119】

【表4】

10

20

30

40

表 4 : リンカー構造物の概要 (直鎖または分枝)

No.	研究室名	図	MW[D]	MW[a]
1	hy-BPRu	1	1773	約 2 kD
2	BPRu (UE) ₂₅ K	3	5802	約 50 kD
3	BPRu (UE) ₅₀ K	3	10807	約 70 kD
4	BPRu (UE) ₂₅ -K-MH	[3]	5996	約 50 kD
5	BPRu (UE) ₂₅ -K-DSS	[3]	6056	約 50 kD
6	BPRu (UE) ₅₀ -K-MH	[3]	11001	約 70 kD
7	BPRu-SK (2) 荷電	4	3004	約 18 kD
8	BPRu (UE) ₂₅ -K-MH 分枝	5	8010	約 70 kD
9	BPRu (UE) ₂₅ -K-DSS 分枝	5	8072	約 70 kD
10	BPRu-SK (2) 非荷電	6	3392	3.5 kD
11	BPRu (UE) ₂₅ -K-MH	[7]	5570	約 50 kD
12	BPRu (UE) ₂₅ -K-DSS	[7]	5630	約 50 kD
13	BPRu (SK) ₄ -DSS 多様分枝リンカー	8	6457	約 60 kD

(a) 見かけ分子量

n. d. 未測定

n. s. 示さない

MH 活性化マレインイミド (maleimide)

DSS N-ヒドロキシスクシンイミジルスベレート (N-hydroxysuccinimidylsuberate)

Bi ビオチン

[] 図 [] に示される基本構造

10

20

30

40

50

【 0 1 2 0 】

図 9 は、B S A と比較したリンカー (マーカー) 構造の Superdex 200 HR (登録商標) クロマトグラフを示す。荷電した残基の劇的な影響が、上パネルから明らかになり、荷電していないリンカーは、約 3 , 5 0 0 D の分子量で移動するが、荷電したリンカーは、約 1 8 , 0 0 0 D の見かけ分子量で見出される。図 9 下パネルは、長い荷電した骨格のリンカー分子が見かけ分子量に差を有するという顕著な効果を示す。5 , 8 0 2 の分子量を有する構造 2 (B P R u - (U E) _{2 5}) は、例えば、約 5 0 , 0 0 0 D の見かけ分子量で移動する。

【 0 1 2 1 】

表 4 にすでに示されたように、リンカー分子は活性化され得る。活性化のための例は、マレインイミド官能基の導入である。マレインイミド官能基を導入するために、リンカー (例えば、実施例 2 に従って生成される) を、0 . 1 M リン酸カリウム緩衝液 pH 7 . 0 に溶解し、1 当量のマレインイミドヘキサ酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (D M S O に溶解される) と混合し、2 5 にて 1 6 時間攪拌する。この調製物を、R P C 1 8 カラム (上記参照) を使用して分離用 H P L C によって精製する。溶出された物質の同一性を質量分光測定法によってチェックする。

【 0 1 2 2 】

実施例 3 : 新規ウシアルブミンリンカー結合体

W O 9 6 / 0 3 6 5 2 に記載されるように、多重結合抗原を含むキャリア分子は、抗ウイルス抗体の検出において顕著に有益である。ポリハプテンの生成のために、キャリア分子のアミノ基を、活性エステル基を用いて最初に活性化する。この活性エステル基を、使用するマーカー基上の対応する活性基とマッチするように選択する。好ましい活性基は、マレインイミドヘキシル (M H S) またはマレインイミドプロピル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (M P S) である。結果として、キャリア中の 1 級アミノ基 (例えば、リジン残基の - アミノ側鎖) を、所望のマレインイミド基を所有するように部分的に誘導体化する。マーカー基を活性化キャリアにカップリングした後、このキャリアの N H ₂ 基は、修飾されていないか、または M H S 基を所有するか、または M H S リン

カーを介する標識を所有するかのいずれかで存在する。

【0123】

図3 (DSS 活性化) および8に模式的に示されるリンカー(マーカー)構造を、同一条件下でBSAにカップリングさせている。

【0124】

BSAを、0.1 mmol/lのリン酸カリウム緩衝液pH7.5に10 mg/mlの濃度で溶解する。リンカー(マーカー)を、1モルのBSAあたり4.5のモル比で添加する。反応を室温にて3時間実施する。反応産物をイオン交換クロマトグラフィーに供する。均一な化学量論を有するカップリング産物の分離を、Source 15 Q (登録商標) またはMono Q (登録商標) カラムを使用することによって達成する。

10

【0125】

多様に分枝したリンカーの粗結合体(図8および表1の構造13を参照)を、Mono Q (登録商標) クロマトグラフィーを用いて分画した。溶出を、20 mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.5) (= 溶出液A) から20 mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.5) 中に1 M塩化ナトリウム (= 溶出液B) への塩勾配を使用して実施した。溶出を280 nmでモニタリングする。図10に示す勾配は、25~54%の溶出液Bの範囲にわたり、30分の溶出に相当する。適切な画分をプールする。画分をMALDI-TOF-MSによって分析する。MSデータは、3つのピークそれぞれが純粋な形態のBSA(図10中の1) および1または2個のリンカー(マーカー) 基を所有するBSA分子(それぞれ図10中の2および3) を含むことを確認した。

20

【0126】

長く、かつ強力に負に荷電した直鎖リンカーを用いて得られた粗結合体(表4の構造12および図3)を、Source 15 Q (登録商標) クロマトグラフィーによって分離している。溶出を、20 mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.5) (= 溶出液A) から20 mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.5) 中に1 M塩化ナトリウム (= 溶出液B) への塩勾配を使用して実施した。溶出を280 nmでモニタリングする。図10に示す勾配は、30~40%の溶出液Bの範囲にわたり、30分の溶出に相当する。適切な画分をプールする。画分をMALDI-TOF-MSによって分析する。MSデータは、4つのピークそれぞれが純粋な形態のBSA(図11中の1) および1、2または3個のリンカー(マーカー) 基を所有するBSA分子(それぞれ図11中の2、3および4) を含むことを確認した。

30

【0127】

実施例4: 第一の新規Fab'-リンカー-結合体の生成

1. 手法の説明

1.1. IgG由来のFab'の調製

ジゴキシンに対するモノクローナル抗体(抗Dig)をペプシンによって切断して、F(ab')₂を形成した。定量的切断後、このペプシンを、pHを増加してペプスタチンを添加して不活化した。このF(ab')₂を前精製なしにシステアミンによってFab'へ還元した。システアミンは、ほとんど選択的にヒンジ領域におけるジスルフィド結合を切断する。その後、透析する。これは、ペプシンによって生成されたほとんどのFc切断産物を除去する。なぜならば、Fc切断産物は、透析チューブの細孔を通るのに十分小さい(>10,000ダルトン)からである。

40

【0128】

1.2. Fab'-BPRUリンカー結合体

結合体合成を、過剰なBPRU-リンカー-MHとFab'を反応させることによる-SH基化学的反応を介して実施した。このプロセスにおいて、ヒンジ領域におけるSH基を主に変換した。少量のポリルテニウム化Fab'を、軽鎖およびFd鎖における分子内ジスルフィド結合を還元した結果として副反応として形成した。

【0129】

1.3. 粗結合体の精製

50

粗結合体を分子篩によって精製した。このプロセスにおいて、モノルテニウム化合物をポリルテニウム化合物から分離した。

【0130】

2. 手法

2.1. $F(ab')_2$ を形成するための抗体の切断

モノクローナル抗体抗DIG-M19.11 IgGの凍結乾燥品 (lyophilisate) を、 20 mg/ml の濃度を得るように H_2O を用いて還元した。 $20\ \mu\text{l}$ の 1 M クエン酸塩 $\text{pH} 3.5$ を溶液 1 ml あたりに添加した (クエン酸塩の最終濃度 = 20 mM)。pHを HCl を用いて 3.60 に調節した。 $0.45\ \mu\text{m}$ フィルターを通して濾過した。この濃度を $\text{OD} 280\text{ nm}$ で測定した ($1\text{ OD} 280\text{ nm} = 1.4\text{ mg/ml}$)。 20 mM クエン酸塩 $\text{pH} 3.60$ を用いて 10 mg/ml に調整した。この溶液を 37°C まで水浴で加熱した。 $100\ \mu\text{l}$ のペプシン溶液 (3 mg/ml) を抗体溶液 1 ml あたりに添加し、 37°C にて水浴中でインキュベートした。完全な切断後、反応を、pH値を増加させてペプスタチンを添加することで停止した。

10

【0131】

2.2. Fab' への還元

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

20

【0132】

2.3. Fab' - BPRu - リンカー結合体の合成

BPRu - リンカー - MH (図8の分枝リンカーであるが、MH基の代わりにDSSを所有する) をDMSOに溶解した。化学量論Fab' : BPRu - リンカー - MH は、 $1 : 3$ (モル/モル)であった。混合物中のFab' の最終濃度は、 3.9 mg/ml であった。混合物中の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。

【0133】

2.4. 精製

粗結合体をAmicon PM 10を使用して $2 \sim 3$ 倍に濃縮し、Superdex 200 HR (登録商標) (緩衝液: 25 mM のMOPS / NaOH $\text{pH} 6.5$ 、 50 mM の NaCl 、 10% のDMSO; 適用量: ゲル層の最大 1.5% 、画分: ゲル層の 0.5%) によって精製した。Fab' - BPRu - リンカー結合体を含む画分をプールした。必要な場合、再クロマトグラフィーを実施し得る。

30

【0134】

粗結合体は、主に、ヒンジ領域における -SH 基の1つでリンカーが結合されるFab' - フラグメントからなるカップリング産物を含む。より低い程度 (extend) まで多様に標識されたFab' - フラグメントがまた存在する (図12において、それぞれピークIII、II、およびIを参照)。

【0135】

実施例5: 第二の新規Fab' - BPRu (UE) $_{2.5}$ 結合体の生成

1. $F(ab')_2$ およびFab' - フラグメントを抗HIV p24 モノクローナルから調製した切断を実施例4に記載されるように本質的に実施する。 $F(ab')_2$ - 溶液を、 $\text{pH} 7.5$ の 50 mM のリン酸カリウム、 150 mM の塩化ナトリウム緩衝液に対して透析する。

【0136】

5 mg/ml の $F(ab')_2$ - フラグメントを含む $F(ab')_2$ - 溶液にシステアミンを最終濃度 25 mM で添加する。この溶液を 37°C にて 60 分間インキュベートする。反応を、 50 mM リン酸ナトリウム、 150 mM 塩化ナトリウム緩衝液を含む $\text{pH} 6.0$ までのPD10 - カラム緩衝液を用いる緩衝液変更を介して停止する。

50

【0137】

2. Fab' - フラグメントのルテニウム化

リンカー-BPRu-(UE)₂₅-MHを、25mg/mlの濃度でDMSOに溶解する。Fab'-フラグメント対BPRu-(UE)₂₅-MHリンカー(マーカー)のモル比を1:2に設定する。反応混合物を、50mMリン酸カリウム、150mM塩化ナトリウム溶液(pH7.1)中で25℃にて90分間インキュベートする。この反応を、2mMシステインの添加および25℃にて30分間のこの溶液のインキュベーションによって停止する。N-メチル-マレインイミドを5mMで添加し、55℃にて60分間インキュベートする。

【0138】

3. 精製

粗結合体をCENTRICON10を用いて約3倍に濃縮し、50mMリン酸カリウム、150mM塩化ナトリウムでpH7.5に緩衝化したSuperdex 200 HR(登録商標)カラムによって精製した。図11に示し得るように、粗混合物は非結合体化Fab'-フラグメント、非結合体化リンカー(マーカー)および1:1、1:2および1:3の化学量論が均一である結合体を含むことが見出されている(それぞれ、図13のピーク5および4、3、2、および1を参照)。

【0139】

実施例6: F(ab')₂-フラグメントのルテニウム化

1. 手法の説明

1.1. IgGのF(ab')₂フラグメントの生成

実施例5から既知の同じモノクローナル抗体をF(ab')₂フラグメントの生成のために使用する。ペプシンによるIgGの消化を実施例5に記載されるように実施する。定量的切断の後、ペプシンをpHを増加することによっておよびペプスタチンを添加することによって不活化する。F(ab')₂-フラグメントをSuperdex 200 HR(登録商標)カラムクロマトグラフィーを使用して精製する。

【0140】

1.2. F(ab')₂-BPRu-(UE)₂₅-DSSの合成

結合体化を、BPRu-(UE)₂₅-DSSの活性基(DSS基を所有する図3のリンカー)をF(ab')₂-フラグメントのアミノ基にカップリングすることによって実施する。試薬の初期濃度およびF(ab')₂-フラグメントとリンカー(マーカー)分子との間で選択される化学量論に依存して、より高いまたはより低い平均標識化指標で粗結合体を得る。言い換えると、種々の量のリンカー構造を所有するFab'分子のランダムポアソン分布を得る。

【0141】

1.3. 粗結合体の精製

粗結合体を濃縮して慣用的な分子篩クロマトグラフィーを用いて精製する。

【0142】

異常な高い見かけ分子量に起因して、各個体のリンカー分子によって寄与されるように、異なる化学量論のカップリング産物を互いに分離し得る。

【0143】

2. 手法

2.1. IgGのF(ab')₂への切断

Mab<p24>M-6D9-F(ab')₂へのMab<p24>M-6D9-IgGの切断。HIVのp24に対するモノクローナル抗体の凍結乾燥IgGを、最終濃度20mg/mlまでH₂Oを用いて還元する。切断を実施例5に記載するように実施する。

【0144】

2.2. Superdex 200 HR(登録商標)クロマトグラフィーによるF(ab')₂-フラグメントの精製

10

20

30

40

50

記載するように生成した $F(a b')_2$ - フラグメントを、以下の緩衝液および条件を用いて精製する：

カラム物質 Superdex 200 HR (登録商標)

緩衝液 10 mM リン酸ナトリウム

(pH 7.5 に調整した緩衝液)

30 mM 塩化ナトリウム

フッ化物 10 ml / cm² / h

サンプル体積 カラム体積の 1.5 %

サンプル濃度 20 mg / ml

溶出液光度計のモニタリング 280 nm

10

$F(a b')_2$ - フラグメントを含む画分をプールして、濃縮して、同一条件下で再度クロマトグラフィーする。

【0145】

2.3. BPRu - (UE)₂₅ - DSS を用いる $F(a b')_2$ - フラグメントの標識化

BPRu - (UE)₂₅ - DSS を、5 mg / ml で DMSO に溶解する。カップリング化学量論を、

1 : 5 (mol / mol) = $F(a b')_2$ - フラグメント : リンカー

で選択する。

【0146】

20

この反応混合物を、室温にて1時間インキュベートする。反応を10 mM の最終濃度でリジンを追加して停止する。

【0147】

2.4. BPRu - UEEK - DSS を用いる $F(a b')_2$ - フラグメントのカップリング

リンカー (標識) BPRu - UEEK - DSS を 5 mg / ml の濃度で DMSO に溶解する。カップリングについて選択した化学量論は、

1 : 5 (mol / mol) = $F(a b')_2$ - フラグメント : BPRu - UEEK - DSS

である。

30

【0148】

この反応混合物を、室温にて1時間インキュベートする。反応を10 mM の最終濃度でリジンを追加して停止する。

【0149】

2.5. 粗カップリング産物の精製

精製を Superdex 200 HR (登録商標) クロマトグラフィーによって実施する。両方の $F(a b')_2$ 結合体のクロマトグラフィーを、pH 7.5 に調整した 100 mM Hepes 緩衝液 (1 mM EDTA および 5 % DMSO を含む) 中で実施する。流速を、5 ml / cm² / h に設定する。検出を 280 nm で実施する。サンプル体積は、カラム体積の 1.5 % である。

40

【0150】

図 14 および 15 から明らかなように、強力に負に荷電したリンカー hy - BPRu - (UE)₂₅ - DSS で生成されるカップリング産物 (図 14) のみを、同一の化学量論のカップリング産物を含む画分に分離し得、一方従来のリンカーを用いたカップリング産物 (図 15) は全て、1つのピークとして溶出する。1 : 1 化学量論を有する主要なカップリング産物を含むプールされた画分 (おおよそ 107 分 ~ 125 分; 図 14 では 111 分のピーク) を、一度、再クロマトグラフィーし、純度および分子量を MALDI - TOF MS で確認している。

【0151】

実施例 7 : 異なる抗体 - リンカー 結合体を用いる免疫学的検定

50

例えば、H I V に対する特異的抗体の検出において使用される二重抗体試験を、モデル系として使用している。このサンプル（H I V に対する抗体を含むと推測される）を、ストレプトアビジンコート固相の存在下でのビオチン化抗原およびジゴキシゲニン標識抗原ならびにジゴキシンに対する B P R u 標識抗体と共にインキュベートする。サンプル中の抗 H I V 抗体の存在下で、ストレプトアビジンコート固相、ビオチン化抗原、検出対象の抗体、ジゴキシン化 (d i g o x i n y l a t e d) 抗原およびジゴキシンと反応するルテニウム標識抗体を含む検出複合体を形成する。抗 H I V 抗体の検出を、標準的な電気化学発光手法に従って固相に結合された電気化学発光シグナルを測定することによって実施する。

【 0 1 5 2 】

このモデル系において、H I V 1 の g p 4 1 領域由来の N 末端標識 H I V ペプチドを使用している。このペプチドおよびこのペプチドの標識化に関する詳細は、W O 9 6 / 0 3 4 2 3 に記載される。両抗原を 2 0 n g / m l の濃度で使用している。

【 0 1 5 3 】

この系の全ての成分を、一定に維持し、検出系のみ（すなわち、ルテニウム標識抗ジゴキシン試薬）を変更している。表 5 および 6 に列挙した全ての結合体について、抗 D I G の F a b ' - フラグメントを同じ濃度のルテニウム標識で使用している。

【 0 1 5 4 】

【表 5】

表 5 : 測定された絶対計数

実験 [計数]	結合体 E	結合体 F	結合体 G	結合体 H
陰性サンプル	488	895	394	282
陽性サンプル 1	65108	74993	59379	68469
陽性サンプル 2	119557	138898	113507	134360

【 0 1 5 5 】

【表 6】

表 6 : 陰性サンプルに対する反応標準化

実験	結合体 E	結合体 F	結合体 G	結合体 H
陽性/陰性血清				
陰性サンプル	1, 0	1, 0	1, 0	1, 0
陽性サンプル 1	133, 4	83, 8	150, 7	242, 8
陽性サンプル 2	245, 0	155, 2	288, 1	476, 5

【 0 1 5 6 】

結合体 E および F を、それぞれ 1 : 2 および 1 : 6 (F a b ' 対リンカー) のモル比を使用して欧州特許第 7 2 0 6 1 4 号に従って生成している。使用したリンカーは、K E E U - B P R u であった。

【 0 1 5 7 】

結合体 G および H は、本発明に従って生成し、精製した精製 1 : 1 カップリング産物（それぞれ、図 3 ((U E) ₂ ₅ および活性化 M H) および 4 に示すリンカー（マーカー）構造を含む）を含んでいた。

【 0 1 5 8 】

新規な 1 : 1 結合体は、陰性サンプルからの陽性サンプルのより良い分離を可能にする。これは、陽性血清について得たシグナルを、陰性血清に対して標準化した表 6 から最も容易に見出される。

【 0 1 5 9 】

10

20

30

40

50

実施例 8 : ビオチン化リンカー (Bi - (UE)₂₅ - DSS) へのモノクローナル抗体 (MAB) < フェリチン > M - 4 . 184 の結合体化

この実施例において、IgG クラスの完全な MAB (約 150 kD の MW) を、結合体化のために使用している。(Bi - (UE)₂₅ - DSS) を使用するリンカー (マーカー) の基本構造体を図 3 に与える。ルテニウムキレート複合体の代わりに、このリンカーはビオチン化基 (Bi -) を所有し、その C 末端で DSS 基を所有するように修飾されている。

【 0160 】

結合体化の方式

DMSO に 15 mg / ml の濃度で溶解した Bi - (UE)₂₅ - DSS を、MAB < フェリチン > M - 4 . 184 の精製 IgG (pH 8 . 5 の 100 mM リン酸カリウム緩衝液中 10 mg / ml) へ添加し、1 : 1 (IgG 対リンカー) の最終モル比を生じる。この反応混合物を 25 ℃ にて 60 分間インキュベートし、その後、結合体化を 10 mM の最終濃度までリジンを添加して停止する。

10

【 0161 】

反応産物を、pH 7 . 5 の 20 mM リン酸カリウム緩衝液に対して透析する。

【 0162 】

MAB < フェリチン > M - 4 . 184 - IgG - Bi ((UE)₂₅ - DSS) の精製

精製を Source 30 Q (登録商標) クロマトグラフィーによって実施している。溶出を、緩衝液 (A) として 20 mM リン酸カリウム (pH 6 . 5)、緩衝液 (B) として 1 M NaCl を含む 20 mM リン酸カリウム (pH 6 . 5) を使用する塩勾配を適用することによって実施している。得られる結果を、図 16 に示す。この手法によっておよび適切なプールによって、たった 1 つのリンカー (マーカー) を所有する免疫グロブリン (モノビオチン化 IgG) を容易に得ることができることが明らかである。

20

【 0163 】

参考文献の一覧

Aslam, M. Dent, A. The preparation of protein-protein conjugates, 「Bioconjugation」(1998) 216-363, London, McMillan

30

B. W. Bycroft ら (1993), J. Chem. Soc., Chem. Commun., 778

Engvall, E. および Perlman, P., Immunochimistry 8 (1971) 871-4

Merzouk A. ら, (1992) Tetrahedron Lett. 33, 477

Methods in Enzymology, Colowick S. P., Caplan N. O., 編, Academic Press

Tijssen 「Methods in Enzymology」(1992) Academic Press

40

Tijssen Laboratory techniques 「Macromolecule conjugation」(1985) 258-268

Wang S. - S., J. Am. Chem. Soc. 95 (1973) 1328

van Weemen, B. K. および Schuures A. H. W. H. (1971), FEBS letters 15, 232

PCT / EP 95 / 02921

欧州特許第 0 061 888 号

米国特許第 5, 958, 783 号

WO 96 / 03409

WO 96 / 03423

50

W O 9 6 / 0 3 6 5 1

W O 9 6 / 0 3 6 5 2

W O 9 6 / 0 3 6 5 7

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、カップリング B S A および h y - B P R u - リンカーの模式図である。B S A に関する模式図は、いくつかの - N H₂ 基が h y B P R u - リンカー（マーカー）への結合に利用可能である事実を示す。

【図 2】

図 2 は、B S A - h y - B P R u - 結合体の S u p e r d e x 2 0 0 H R（登録商標）クロマトグラフを示す。このクロマトグラフは、異なる化学量論を有するカップリング産物が単一の均一なピークとして移動することを示す。この単一のピークは、カップリング産物の統計的混合物を表す。

10

【図 3】

図 3 は、B P R u - (U E)_{2 5} K および B P R u - (U E)_{5 0} K の模式図である。これらのリンカー構造は、ジ - ペプチド - アラニン - グルタミン酸 (U E) をしばしば含む。

【図 4】

図 4 は、短い骨格鎖を有する分枝リンカーを示す図である。この分枝リンカーは、短い骨格、および側鎖の両方で荷電した残基を含む。

20

【図 5】

図 5 は、長い骨格鎖を有する分枝リンカーを示す図である。この分枝リンカーは、長い骨格、および側鎖の両方で荷電した残基を含む。

【図 6】

図 6 は、荷電した残基を有さない分枝リンカーを示す図である。このリンカーは、図 4 のリンカーに非常に類似しているが、グルタミン酸の荷電した残基を有さず、代わりにグルタミンが使用されている。見かけ分子量は、図 4 のリンカーに関する 1 8 k D と比べて約 3 , 5 k D であることが見出された。

【図 7】

図 7 は、ビオチン化リンカー分子の模式図である。これらの N - 末端のビオチン化 (B i -) リンカー分子が C - 末端に - M H および - D S S 基をそれぞれ有し、これらは生体分子へのカップリングのために使用される。

30

【図 8】

図 8 は、多数分枝リンカーを示す図である。この模式図は、2 つのルテニウム標識 (B P R u) を保有する分枝側鎖を有する多数分枝リンカーを示す。

【図 9】

図 9 は、種々のリンカー分子の S u p e r d e x 2 0 0 H R（登録商標）クロマトグラフィーを示す図である。B S A および異なるリンカー分子は、同一の条件下でクロマトグラフィーされている。上パネルは、図 4 および 6 に従うリンカー構造を示す。下パネルは、図 3 に従うリンカー構造を示す。

40

【図 10】

図 10 は、粗 B S A - R u (S K)₄ - M H 結合体の M o n o Q（登録商標）クロマトグラフである。クロマトグラフは、B S A (1) ならびにそれぞれ均一な 1 : 1 (2) および 1 : 2 (3) 化学量論の結合体産物のベースライン分離を示す。

【図 11】

図 11 は、粗 B S A - R u (U E)_{2 5} - M H 結合体の S o u r c e 1 5 Q（登録商標）クロマトグラフである。均一な化学量論 1 : 1、1 : 2 および 1 : 3 の 3 つの結合体（それぞれ、2、3 および 4）は、互いにおよび非結合体化 B S A (1) とはっきり分離される。

【図 12】

50

図12は、第一のFab'-Ru(UE)₂₅-MHカップリング産物のSuperdex 200 HR (登録商標)クロマトグラフである。粗結合体は、3つの主なピークに分離される。50kDの見かけ分子量で移動するピークIIIは、未反応Fab'および未反応リンカー(Ru-(UE)₂₅-MH)の両方を含む。100kDの見かけ分子量で移動するピークIIは、Fab'とリンカー(マーカー)との間の1:1カップリング産物を本質的に純粋な形態で含む。ピークIは、1:2カップリング産物(150kDの見かけ分子量)を含む。各プールの組成物は、MALDI-TOF MSによって確認されている。

【図13】

図13は、第二のFab'-Ru(UE)₂₅-MHカップリング産物のSuperdex 200 HR (登録商標)クロマトグラフである。ピーク1、2および3は、それぞれ1:3、1:2および1:1の化学量論の結合体を含む画分に対応する。ピーク4および5は、未結合体化開始物質(リンカーおよびFab'-フラグメント)を含む。全ての構造は、MALDI-TOF-MSによって確認されている。

【図14】

図14は、F(ab')₂-BPRu-(UE)₂₅-DSSカップリング産物の精製を示す図である。粗結合体は、Superdex 200 HR (登録商標)クロマトグラフィーによって分離される。1:2および1:1カップリング産物を含むピークは、別々にプールされ、再クロマトグラフィーされる。これらのカップリング産物の組成物は、MALDI-TOF-MSによって確認されている。

【図15】

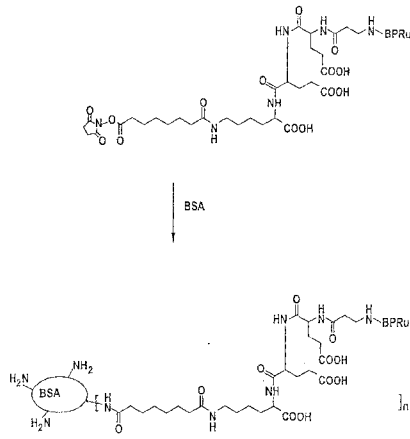
図15は、F(ab')₂-BPRu-UEEK-DSSカップリング産物の精製を示す図である。粗結合体は、Superdex 200 HR (登録商標)クロマトグラフィーによって分離される。異なる化学量論を有するカップリング産物の統計的混合物を含むたった1つの対称「産物ピーク」がみられる。

【図16】

図16は、IgG-(Bi-(UE)₂₅-DSS)カップリング産物の精製を示す図である。粗結合体は、Source 30 (登録商標)クロマトグラフィーによって分離される。未結合体化IgG(プール1)は、カラムから容易に溶出される。モノ-ビオチン化IgGはプールされ(プール2)、ジ-ビオチン化IgG(プール3)と明らかに分離される。

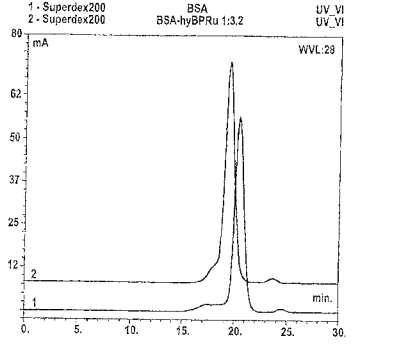
【 図 1 】

図 1: BSA および hy-BPRu へのその結合の模式図



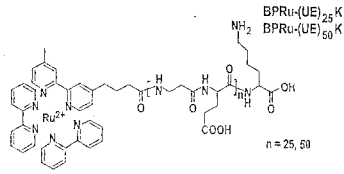
【 図 2 】

図 2: BSA-hy-BPRu-結合体の Superdex 200 HR (登録商標) クロマトグラフ



【 図 3 】

図 3: BPRu-(UE)₂₅K および BPRu-(UE)₅₀K の模式図



【 図 4 】

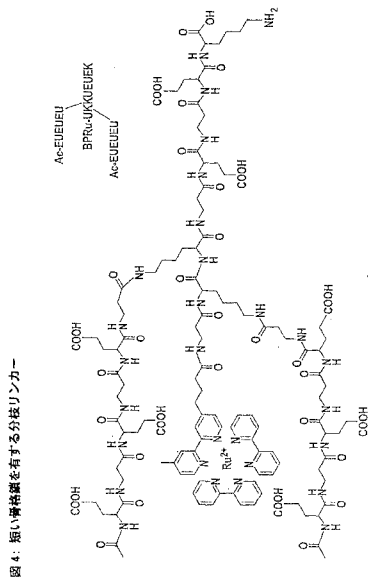
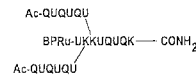


図 4: 短い骨格鎖を有する分枝リンカー

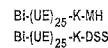
【 図 6 】

図 6: 荷電残基を有さない分枝リンカーの模式図



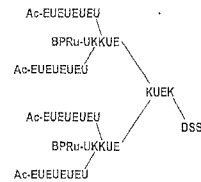
【 図 7 】

図 7: ビオチン化リンカー分子の模式図



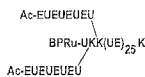
【 図 8 】

図 8: 2つのマーカ-基を有する多数分枝リンカーの模式図



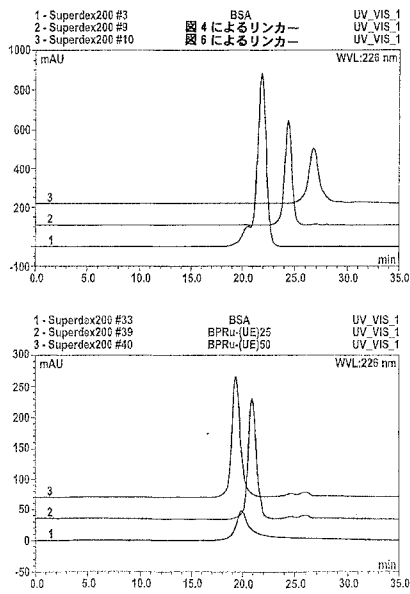
【 図 5 】

図 5: 長い骨格鎖を有する分枝リンカー



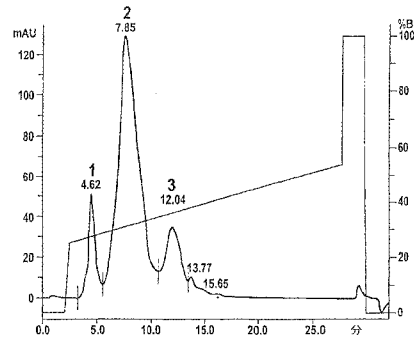
【 図 9 】

図 9: 種々のリンカー分子の Superdex 200 HR (登録商標) クロマトグラフィー



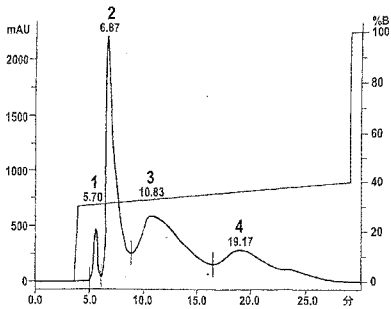
【 図 10 】

図 10: 粗 BSA-Ru(SK)₄-MH 結合体の MonoQ (登録商標) クロマトグラフ



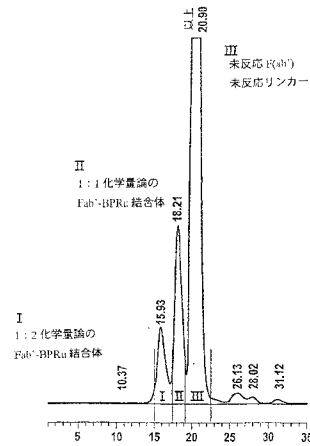
【 図 11 】

図 11: 粗 BSA-Ru(UE)₂₅-MH 結合体の Source15Q (登録商標) クロマトグラフ



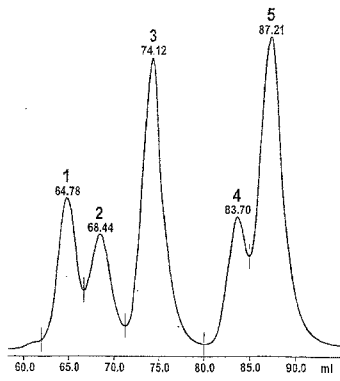
【 図 12 】

図 12: 第一の Fab'-rUE)₂₅-MH カップリング産物の Superdex200HR (登録商標) 10/30 クロマトグラフ



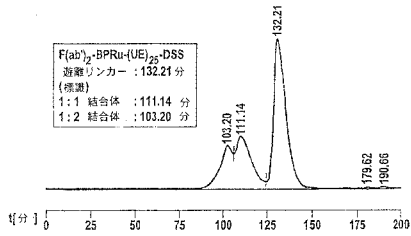
【 図 1 3 】

図 13 : 第二の Fab²-(UE)₂₅ カップリング産物の Superdex200HR (登録商標) 10/30 クロマトグラフ



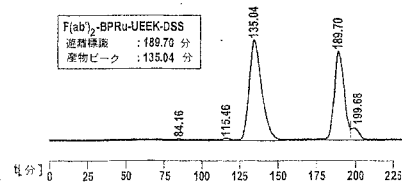
【 図 1 4 】

図 14 : F(ab)₂-BPRu-(UE)₂₅-DSS カップリング産物の精製



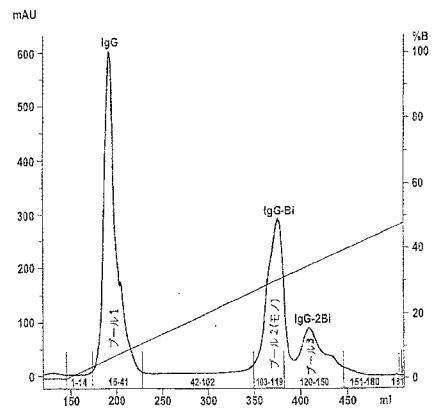
【 図 1 5 】

図 15 : F(ab)₂-BPRu-UEEK-DSS カップリング産物の精製



【 図 1 6 】

図 16 : IgG-(Bi)-(UE)₂₅-DSS カップリング産物の精製



【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 02/27317 A2

(51) International Patent Classification: G01N 33/531

(21) International Application Number: PCT/EP01/11101

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

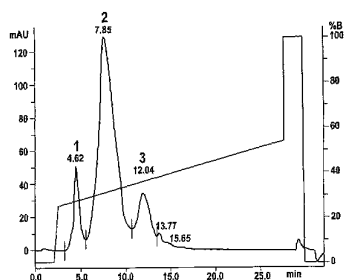
(30) Priority Data:
100 48 417.4 29 September 2000 (29.09.2000) DE
01107491.1 29 March 2001 (29.03.2001) EP(71) Applicant (for DE only): ROCHE DIAGNOSTICS
GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, 68305
Mannheim (DE).(71) Applicant (for all designated States except DE, US):
F.HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacher-
strasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HOESS, Eva
[DE/DE]; Zitzelsbergerstrasse 13a, 81476 Muenchen
(DE). ANDRES, Herbert [DE/DE]; Kapellenwiese 39,
82377 Penzberg (DE). DONIE, Frederic [DE/DE]; In der
Au 10, 82377 Penzberg (DE). VOGEL, Rudolf [DE/DE];
Am Eselsberg 7, 82362 Weilheim (DE). JOSEL, Hans-Pe-
ter [DE/DE]; Ulmenstrasse 28, 82362 Weilheim (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,
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,

[Continued on next page])

(54) Title: CONJUGATES OF DEFINED STOICHIOMETRY

Mono Q® chromatograph of a crude BSA-Ru(SK)₄MH conjugate

(57) Abstract: The invention relates to a process for the production of a biomolecule-linker conjugate of uniform stoichiometry. It especially relates to a conjugate consisting of a biomolecule of a molecular weight between 5 kD and 500 kD and a hydrophilic linker molecule said linker having a molecular weight between 1 and 15 kD and between 4 and 60 charged residues, characterized in that said conjugate comprises at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected amount.

WO 02/27317 A2

WO 02/27317 A2



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).

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(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DE, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, 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, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 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,

— 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
 — 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 02/27317

PCT/EP01/11101

Conjugates of defined stoichiometry

The invention relates to a process for the production of a biomolecule-linker conjugate of uniform stoichiometry. It especially relates to a conjugate consisting of a biomolecule of a molecular weight between 5 kD and 500 kD and a hydrophilic linker molecule said linker having a molecular weight between 1 and 15 kD and between 4 and 60 charged residues, characterized in that said conjugate comprises at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected amount.

Binding assays nowadays are widely used in research settings as well as in clinical routine, especially in diagnosis of an infection monitoring of drugs or for assessing normal or abnormal metabolism.

- 10 The use of binding assays dates back about 30 years (Engvall, E. and Perlman, P., *Immunochemistry* 8 (1971) 871-4; van Weemen, B.K. and Schuures A.H.W.M. (1971), *FEBS letters* 15, 232). Since then enormous progress has been made and methods for carrying out specific binding assays as well as practical applications thereof have become general knowledge to the skilled artisan. Methods and procedures summarized in related text books are herewith included by reference and only few examples shall be specifically
- 15 mentioned: "Practice and theory of enzyme immunoassays" by Tijssen - in "Methods in Enzymology" (1992) Academic Press; and various editions of "Methods in Enzymology", Colowick S.P., Caplan N.O., Eds., Academic Press, dealing with immunological detection methods, especially volumes 70, 73, 74, 84, 92 and 121.
- 20 With the exception of very few homogeneous or precipitation type assays, all these assays require conjugates between a biomolecule, e.g. an antibody, with a second molecule necessary to facilitate the measurement of an analyte under investigation. Well-known examples for this second molecule, e.g., are marker or label groups, like enzymes, radio isotopes, luminophores, fluorophores, etc. or haptens.
- 25 Conjugates between a biomolecule and e.g. a marker or hapten group can be synthesized by direct chemical coupling of the two different molecular entities or by using a linker or bridging molecule according to state of the art procedures (e.g. Tijssen or Methods in Enzymology, supra).

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 2 -

present), and the marker group may mutually and adversely effect each other. This frequently leads to aggregation or background problems.

Dependent on the coupling or linker chemistry chosen, in many cases e.g. amino acid groups of polypeptide which do not end up to carry a marker group, are also modified.

5 This again leads to unpredictable results and through changes in the physico-chemical properties of the biomolecule to problems, like e.g. instability, aggregation or to non-specific binding in immunoassays.

The various components of such a conjugate, e.g., the biomolecule, the linker molecule, and the marker molecule as well as the different coupling products derived thereof are present in statistical amounts. A mere statistical mixture with an average labeling index is obtained. The average labeling index may be controlled to some extent by adjusting the reaction conditions and ratios of the individual molecular entities chosen.

Such statistical mixtures comprise a lot of different conjugation products in different stoichiometries. Biomolecules completely free of a linker or marker structure, conjugates of a 1:1 stoichiometry, 1:2 stoichiometry (i.e. a biomolecule carrying 2 linker or marker molecules, 1:3 stoichiometry and even higher stoichiometry may be present in such conjugates. It is obvious that not all such products are desired and cause problems e.g. with respect to reproducibility of conjugation. In addition, non-labeled biomolecules interfere with labeled biomolecules. It is also known that "over-labeling", i.e. biomolecules labeled with too many hapten or marker structures is the major reason for problems known as non-specific interactions, e.g. background phenomena.

US 5,958,783 discloses that it is possible to reduce background problems caused by a metal chelate complex as marker group by using a hydrophilic linker entity. However, the conjugates according to US 5,958,783 still represent statistical mixtures of various different biomolecule-linker-marker products. Reproducibility of these statistical conjugates still remains a problem.

WO 96/03423 and WO 96/03651 describe that it is possible to introduce marker groups at predetermined positions during synthesis. This way it is possible to synthesize a peptide-linker (marker) product of uniform stoichiometry. However, the limits of peptide synthesis are in the range of 40 to 50 amino acids corresponding to peptides of a molecular weight below 5 kD (kD = kilo Dalton). Polypeptides of more than 5 kD usually are produced by recombinant expression in appropriate host systems and need to be chemically coupled

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 3 -

resulting in a conjugate of statistical compositions. The linkers of WO 96/03423 and WO 96/03657 are below 1 kD and do not contain charged residues.

Large biomolecules, e.g. polypeptides of 40 to 50 amino acids usually comprise more than one reactive group amenable to one of the standard coupling chemistries.

- 5 The mode and strategy of chemical coupling can be selected as required. In case the biomolecule is a polypeptide coupling chemistries targeting -SH, -NH₂ or -COO⁻ residues as well as the -OH group of tyrosines, the imidazol group of histidines or the heterocyclic imino groups of tryptophanes are at hand. Several appropriate coupling chemistries are known from the art for each of these functional groups (Aslam, M. Dent, A. The preparation of protein-protein conjugates in "Bioconjugation" (1998) 216-363, London, McMillan).
- 10

Whenever more than one reactive group is present on a biomolecule chemical, coupling with a linker or marker results in a statistical mixture of different biomolecule-linker or biomolecule-marker products.

- 15 Even with the most advanced linkers and coupling chemistries the resulting conjugate is a statistical mixture of many different conjugates and the overall result of such conjugation is highly variable and unpredictable. As a consequence it is very difficult to reproduce the overall properties of such conjugates from lot to lot.

- 20 It was therefore the task of the present invention to investigate whether a conjugate between a biomolecule and a linker molecule may be obtained in a more reproducible and defined manner. It was also investigated whether processes can be found and described how to obtain a conjugate comprising at least one pre-selected biomolecule-linker product of uniform stoichiometry.

- 25 It surprisingly has been found that problems known in the art can be overcome by the conjugates according to the present invention, their mode of production and their use in appropriate reagents, kits and procedures.

- Disclosed is a process for the production of a conjugate comprising at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected amount, said conjugate consisting of a biomolecule of a molecular weight between 5 kD and 500 kD and
- 30 a hydrophilic linker molecule, said linker having a molecular weight between 1 kD and

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 4 -

15 kD and between 4 and 60 charged residues, characterized in that a) the biomolecule and the linker molecule are covalent coupled to each other, b) the different biomolecule-linker products of uniform stoichiometry are fractionated by chromatography, and c) fractions containing a coupling product of uniform stoichiometry are collected.

- 5 The invention also relates to a conjugate consisting of a biomolecule of a molecular weight between 5 kD and 500 kD and a hydrophilic linker molecule said linker having a molecular weight between 1 and 15 kD and between 4 and 60 charged residues, characterized in that said conjugate comprises at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected amount.
- 10 The conjugates according to the present invention are especially useful for performing a biochemical or immunological assay for detection of an analyte in a sample. The invention therefore also relates to a composition of reagents comprising the described conjugate, a test kit comprising such a conjugate as part of a reagent composition and to an immunoassay based on such a conjugate.

15 Detailed description of the invention

A preferred embodiment according to the present invention is a process for the production of a conjugate comprising at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected amount, said conjugate consisting of a biomolecule of a molecular weight between 5 kD and 500 kD and a hydrophilic linker molecule, said linker
20 having a molecular weight between 1 kD and 15 kD, between 4 and 60 charged residues, characterized in that

- a) the biomolecule and the linker molecule are covalent coupled to each other,
- b) the different biomolecule-linker products of uniform stoichiometry are fractionated by chromatography, and
- 25 c) fractions containing a coupling product of uniform stoichiometry are collected.

The term "conjugate" is used to describe a coupling product between a biomolecule and a linker molecule. A conjugate according to the present invention comprises at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected amount.

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 5 -

Biomolecule in the sense of the present invention may be any naturally occurring or synthetically produced molecule with a molecular weight between 5 and 500 kD composed of biological molecules like amino acids, nucleotides, nucleosides, lipids, and/or sugars. Preferably, the biomolecule is selected from the group consisting of polypeptides, polysaccharides, and lipopolysaccharides. Preferably the biomolecule has a molecular weight in the range of 10 kD to 500 kD. More preferred the biomolecule has a molecular weight in the range of 15 kD to 400 kD, most preferred in the range of 20 kD to 200 kD.

The biomolecule preferably has at least two groups which are amenable to standard coupling chemistry. Examples of such groups which in the art are known as reactive groups, functional groups, or coupling sites are described further below.

In a preferred embodiment the biomolecule is a polypeptide. Preferably such polypeptide comprises 50 to 5000 amino acids, or more preferred 100 to 4000 amino acids.

The linker according to the present invention has a molecular weight of 1 kD to 15 kD and carries at least four charged residues. The molecular weight range given applies for the basic linker molecule without active groups or marker groups.

The molecular weight of the linker is at least 1000 D, because then the advantages of the linker become particularly apparent. The molecular weight of the linker is preferably in the range of 1000 to 15,000 D, particularly in the range of 1000 to 12,000 D and most preferably in the range of 1000 to 10,000 D. Also preferred are molecular weight ranges for the linker molecule between 1500 and 15000 D and also between 1500 and 10000 D.

Preferably the linker used to produce the conjugate according to the present invention comprises a peptidic backbone.

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 from 6 to 8. The linker preferably contains 4 to 60, particularly preferred 6 to 50 and most preferred 9 to 40 such charge carriers.

It is preferred that all charge carriers are either positively or negatively charged. It is, however, also possible to use linker molecules which carry both, positively and negatively

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 6 -

charged residues. In such case the number of positively charged residues is either higher or lower by at least four as compared to the number of negatively charged residues.

The linker preferably comprises at least four negative charge carriers. Examples of suitable negative charge carriers are phosphate, phosphonate, sulphinate, sulphonate, sulphate and 5 carboxylate groups, carboxylate groups and phosphate groups being most preferred.

It is further preferred, that the linker comprises at least four positively charged residues. Examples of positive charge carriers are amino and mono-substituted or poly-substituted amino groups such as mono, di- or trialkyl amino groups, in which alkyl denotes a straight- 10 chained or branched alkyl residue with 1 to 6 C atoms or a cyclic alkyl residue with 3 to 6 C atoms, guanidiny groups, e.g. of arginine or positively charged heteroaromatic nitrogen groups, as, e.g. found in histidine. The positive charge carriers preferably are selected from basic amino acids such as lysine or substituted amino acids such as diethyllysine.

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 15 ethylene oxide or polyethylene oxide groups with preferably at least three ethylene oxide units, sulphoxide, 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 20 amide residues in amino acid side groups e.g. the amino acids asparagine and glutamine. The esters are preferably derived from hydrophilic alcohols, in particular C₁-C₃ alcohols or diols or triols.

The linker according to the present invention preferably is modified to carry additional chemical structures. Most preferred such modified linker is of the formula (Z - L - X_n) and 25 comprises one group Z and one or several groups X (n = 1 - 10), wherein L is the core structure of said linker.

The reactive group Z is used for chemically coupling the linker to the biomolecule. The group Z 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 30 or an active ester e.g. an N-hydroxy-succinimide, a p-nitrophenyl, pentafluorophenyl,

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 7 -

imidazolyl or N-hydroxybenzotriazolyl ester, an amine, a maleimide, a thiol, a para-aminobenzoyl group or a photoactivatable group e.g. an azide.

The group X either is a reactive group as defined for Z above, or X is a marker group. In case X is a reactive group it is present only once and the linker is a heterobifunctional linker. The skilled artisan has no difficulty in selecting appropriate combinations of reactive groups for X and for Z. Examples for appropriate active groups in heterobifunctional linkers are e.g. given in Aslam, M. Dent, A. The preparation of protein-protein conjugates in "Bioconjugation" (1998) 216-363, London, McMillan or in Tijssen Laboratory techniques in "Macromolecule conjugation" (1985) 258-268. In case X is a marker group it is present up to ten times, preferably up to four times. Also preferred the marker group is present twice or once.

The linker used in the present invention may be a "linear" or a "branched" linker. Linear charged linkers are known from US 5,958,783. Such a linear linker preferably has a chain length of 15 - 350 atoms and is an alkylene chain modified by the incorporation of heteroatoms such as amide functions. The linear linker containing the free charge carriers is preferably at least partially composed of aminocarboxylic acid units. Such aminocarboxylic acid units preferably are linked together via peptide bonds. The linker may contain naturally occurring as well as synthetic amino acid units. Preferably, the linker comprises repeatedly the dipeptide β -alanine-glutamic acid. A preferred linker structure comprises between 5 and 70 more preferred between 10 and 60 and most preferred between 15 and 50 times the dipeptide β -alanine-glutamic acid.

The linker in a further preferred embodiment is a branched linker.

The branched linker preferably contains a main chain which contains one or several uncharged hydrophilic groups as mentioned above in particular carboxylic acid amide groups or/and polyethylene glycol groups while there are at least four 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 branched linker can also contain charge carriers in the main chain and uncharged hydrophilic groups in one or several side chains. Furthermore embodiments are

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 8 -

also conceivable in which the main chain and the side chains contain uncharged hydrophilic groups as well as charge carriers.

The branched linker has the additional advantage that it can be synthesized to carry several marker groups. Covalent coupling of such a linker (marker) structure brings about the
5 introduction of several marker groups per biomolecule and per coupling event. Preferred linker (marker) structures carry two or four marker groups.

The length of the main chain of the branched linker is preferably 7 to 200 atoms, particularly preferably 7 to 100 atoms, in which case the main chain is an alkylene chain modified by the incorporation of heteroatoms e.g. O atoms or amide groups and contains
10 at least one branch site, the side chains formed by the branching site preferably have 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^- or a guanidyl group.

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
15 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 the main chain which can be used as the starting point for the synthesis of the side chain.
20 The branches are particularly preferably generated with diaminocarboxylic acids such as lysine, ornithine, hydroxylysine, α,β -diamino propionic acid etc.

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
25 after incorporation into the linker and the concomitant reaction of two of the charged 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, α,β -diamino
30 propionic acid, arginine, aspartic acid and glutamic acid, carboxy glutamic acid and

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 9 -

symmetric trifunctional carboxylic acids like those described in EP-A-0 618 192 or US-A-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.

- 5 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. 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 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
- 10 blocks used for the synthesis e.g. natural or synthetic amino acids or other components such as ethylene glycol.

According to the present invention it is possible to couple a linker molecule having a molecular weight of 1 to 15 kD to a biomolecule of 5 to 500 kD and to isolate or select coupling products of uniform stoichiometry. The isolated fractions then optimally can be

15 used to couple a second molecule to the first conjugate.

In a further preferred embodiment of a process according to the present invention the charged linker molecule used in the chemical coupling to a biomolecule already carries one or several marker groups. Examples of marker groups are labeling groups and effector groups. At some places the fact that the marker group may already be attached to the linker

20 is additionally indicated by writing linker (marker).

The smaller the marker group the more difficult is the separation of conjugation products of uniform stoichiometry between a biomolecule and a marker according to the state of the art procedures.

Preferably, the marker group (labeling groups or effector groups) has a molecular weight

25 below 15000 D, more preferred of less than 10000 D. Most preferred the marker group is even smaller than 5000 D. In a preferred embodiment the marker group attached to the linker has a molecular weight of 3000 D or less.

The complete molecular weight of such linker (marker), i.e. a linker together with the one or several marker groups preferably is 20 kD or less, more preferred 15 kD or less and most

30 preferred 10 kD or less.

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 10 -

The labeling group 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-A-0 061 888), and radioisotopes.

Effector groups comprise for example one partner of a bioaffine binding pair. While performing an assay the effector group interacts specifically and preferably non-covalent with the other partner of the bioaffine binding pair. Examples of suitable binding partners are hapten or antigen/antibody, biotin or biotin analogues such as aminobiotin, iminobiotin or desthiobiotin/avidin or streptavidin, sugar/lectin, nucleic acid or nucleic acid analogue/complementary nucleic acid, receptor/ligand e.g. steroid hormone receptor/steroid hormone. Preferably, the binding pair member of lower molecular weight is coupled to the linker before the linker (marker) is coupled to the biomolecule. Preferred molecular weight ranges as described for labeling groups also apply to the effector groups.

Preferred binding pair members comprise hapten, antigen and hormone. Especially preferred are haptens like digoxin and biotin and analogues thereof.

Charged linear linker molecules - or linker structures already carrying a marker - are synthesized essentially as described in US 5,958,783.

Branched charged linker molecules or linker (marker) molecules are e.g. obtained by solid phase synthesis. In a first step 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 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 the linker is either cleaved off the solid phase support or an activated marker, e.g. a marker carrying 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 a reactive group Z can be coupled to the carboxy terminus of the peptide linker or the carboxy terminus itself is used to function as reactive group Z. Protective groups that may be present are cleaved off.

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 11 -

In another mode of solid phase synthesis an amino acid marker 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. After completion of the desired linker sequence, the complex is cleaved from the solid phase. The reactive group Z can be coupled to the amino terminus of the resulting peptide linker, or the amino terminus itself is used to function as reactive group Z.

Chemical coupling of the biomolecule on the one hand to a linker molecule on the other hand leads to a statistical mixture of various biomolecule-linker products. With other words, such crude conjugate comprises in statistical amounts many different coupling products, i.e., biomolecules which are not conjugated at all, biomolecules comprising one linker structure, biomolecules comprising two linker structures and so on. Each of these biomolecule-linker product subgroups is characterized by a uniform stoichiometry. This means that, e.g., the subgroup comprising one linker structure per biomolecule has a uniform stoichiometry of 1:1.

For example, hapten-protein-conjugates can be synthesized by incubating a chemically activated hapten with a protein in a predefined molar ratio. Specific coupling chemistries are known targeting different functional amino acid groups (-SH; -NH₂; -COO⁻; -OH; imino groups of tyrosine, imidazole groups of histidine). Usually these groups are repeatedly present in the protein. As a consequence, the hapten will not be evenly distributed but rather the hapten will be bound to the protein in a Poisson distribution. A Poisson distribution can be expressed as:

$$P(r) = m^r x e^{-m} / r!$$

$P(r)$ is the fraction of protein molecules with r (0,1,2,3, etc.) haptens bound per molecules; m is the average molar ratio between hapten and protein in the reaction mixture; e = Euler's number and $r!$ represents faculty of r (e.g. in case of $r = 3$, $r! = 3 \times 2 \times 1$). This means for example for a crude mixture of coupling products comprising in the average 1 hapten molecule bound per protein molecule that statistically and roughly 36,7 % of the protein molecules are not labeled at all, 36,7% carry one hapten molecule, 18,3 % carry two hapten molecules, 6,1% carry three hapten molecules and the rest is even higher labeled.

It is an extremely attractive feature of the present invention that now for example conjugates between a biomolecule and a small marker group linked together by a linker

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 12 -

molecule – which in itself in addition has advantageous effects on, e.g., background reduction in immunological assays – are now available in pre-determined and pre-defined composition.

5 Conjugates known from the art are usually characterized by a labeling index. This labeling index indicates the average amount of labels (or linker (marker) groups) per biomolecule. A labeling index of 2.3 therefore signifies that in the overall mixture of biomolecule-label products per biomolecule 2.3 labels are present. It is possible by sophisticated methods to determine the relative amounts of coupling products of uniform stoichiometry by complicated procedures, for example, MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption
10 ionization- time of flight) mass-spectroscopy. However, such methods are not appropriate for separating out fractions of uniform stoichiometry. The inventive procedures allow for the production of a conjugate comprising at least one pre-selected biomolecule linker product of uniform stoichiometry in non-statistical amounts.

15 The term "pre-selected" is used to indicate that the inventive conjugate is not the mere statistical result of a chemical conjugation between a biomolecule and a linker molecule but rather that it is a result of pre-selection of appropriate fractions. One coupling product, or if required, several coupling products, of uniform stoichiometry can now be selected at will (as required) and the conjugate be composed as appropriate for the intended application.

20 The mode and strategy of chemical coupling can be selected as required. In case the biomolecule is a polypeptide comprising –SH, –NH₂ or –COO⁻ residues as functional groups, several appropriate coupling chemistries are known from the art for each of these functional groups and only some shall be mentioned. The careful reader will find all required details in Aslam, M. Dent, A. The preparation of protein-protein conjugates in "Bioconjugation" (1998) 216-363, London, McMillan.

25 Amino groups of biomolecules (the terminal –NH₂ group or the NH₂ group of a lysine side chain, as well as ω-amino groups of diamino carboxylic acids) can be used for chemical coupling of a marker group thereto based on "amino chemistry". Well-known examples of amino chemistry comprise amongst others the reaction of amino groups with so-called activated groups, like NHS-esters, other activated esters, acid chlorides and azides.

30 Carboxyl groups on biomolecules (the terminal COO⁻ - group, the carboxy functions of glutamic acid or aspartic acid) are used for chemical coupling based on "carboxy

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 13 -

chemistry". Well-known examples of carboxy chemistry comprise amongst others the activation of these of carboxy groups to carry the above mentioned activated groups. Coupling to e.g., amino groups on the marker is then easily performed.

Alternatively sulfhydryl groups on biomolecules (e.g. free-SH-groups of cysteine or -SH groups obtained by reducing di-sulfhydryl bridges) are used for chemical coupling based on "sulfhydryl chemistry". Well-known examples of sulfhydryl chemistry comprise amongst others the reaction of -SH groups with maleimido groups, or alkylation with α -halogen carboxylic group or thioethers.

The hydroxyl group of tyrosine residues or the imidazol group of histidine also may be used to covalent link markers to a biomolecule by aid, e.g., of diazonium groups.

The chemical reaction for coupling the biomolecule to the linker or the linker (marker) is performed and if required, stopped as known from the art. Whereas in the art usually only the non-conjugated small linker or linker (marker) molecules are separated from the high molecular weight biomolecule-linker fraction, the separation of free biomolecule from conjugated biomolecule is very difficult or impossible. This separation and also the separation and selection of coupling products according to their stoichiometry is now possible and is performed by chromatographic procedures. The conjugation products are separated into fractions of uniform stoichiometry based on properties contributed by the linker structure.

Especially attractive properties of the novel biomolecule-linker products are differences in apparent molecular weight, hydrophobicity, and in charge. The differences for the various coupling products with different stoichiometry simply depend on the number of linker structures per biomolecule.

In a preferred embodiment the chromatographic fractionation is performed by a separation procedure based on (apparent) molecular weight. It was a very surprising finding that fractionation of the various coupling products with uniform but different stoichiometry is possible based on molecular weight, better said this separation is based on differences in apparent molecular weight. Despite absolute differences in molecular weight are comparatively small between coupling products of different stoichiometry, the differences in apparent molecular weight are quite pronounced. This is brought about by the linker molecules used in this invention. Although these molecules have a molecular

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 14 -

weight of 1 to 15 kD, they migrate as having a very unusual and very high apparent molecular weight.

5 According to the invention it now is possible to easily separate and if required, fractionate, e.g., Fab'-fragments of antibodies, which have a molecular weight of about 50 kD carrying one linker (label) molecule from Fab'-fragments carrying none, two, three, or more linker (label) molecules. This is exemplified in Examples 4 and 5 and in Figures 10 and 11. Such separation is possible, because the linker structures of the biomolecule-linker conjugates according to the present invention have been found to have apparent molecular weight which is much higher as their real molecular weight.

10 It is possible to separate the coupling products of uniform stoichiometry between even larger biomolecules, like e.g., F(ab')₂-fragments (about 100 kD), BSA or immunoglobulin G and a linker or a linker (marker) molecule once coupled to an appropriate linker or a linker (marker).

15 The apparent molecular weight for a biomolecule can easily be determined according to procedures known in the art. Routinely used is, e.g., molecular sieve chromatography. The molecule of interest is chromatographed and the apparent molecular weight determined by comparing the retention time for this molecule to the retention time or times of one or several molecular weight markers.

20 Since the apparent molecular weight is greatly influenced by the procedures used for determination, the apparent molecular weight of the biomolecule and the apparent molecular weight of the linker or linker (marker) structure both are determined by the same procedure.

25 For ease of separation by molecular weight chromatography, linkers are chosen which match the apparent molecular weight of the biomolecule. Preferably, the apparent molecular weight of the linker (marker) is at least 20 % and at most 500 % of the molecular weight of the biomolecule. A process for the production of a conjugate comprising at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected amount, said conjugate consisting of a biomolecule of a molecular weight between 5 kD and 500 kD and a hydrophilic linker molecule, said linker having a molecular weight between 1 kD and 15 30 kD, between 4 and 60 charged residues and an apparent molecular weight between 20 % and 500 % of the apparent molecular weight of said biomolecule, characterized in that

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 15 -

- a) the biomolecule and the linker molecule are covalent coupled to each other,
- b) the different biomolecule-linker products of uniform stoichiometry are fractionated by chromatography based on the differences in apparent molecular weight of said biomolecule-linker products, and
- 5 c) fractions containing a coupling product of uniform stoichiometry are collected,

therefore represents a preferred embodiment of the invention. More preferred the apparent molecular weight of the linker or the linker (marker) is between 25 % and 400 %, most preferred between 30 % and 330 % of the apparent molecular weight of the biomolecule.

Separation by (apparent) molecular weight preferably is performed by molecular sieve chromatography using chromatography materials like Sephadex S 200 HR®.

A further striking and characteristic feature of the linker structures used according to the present invention is the fact that they carry at least four charged residues per molecule. The high number of charged residues within the linker also leads to differences in net charge of the biomolecule-linker products, these charge differences being dependent on the number of linkers per biomolecule. E.g. biomolecule-linker products with one linker per biomolecule (of uniform 1:1 stoichiometry) can now surprisingly and easily be separated from biomolecule-linker products of different stoichiometry or from biomolecules without any linker attached based on differences in charge.

In a preferred embodiment the invention relates to a process for the production of a conjugate comprising at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected amount, said conjugate consisting of a biomolecule of a molecular weight between 5 kD and 500 kD and a hydrophilic linker molecule, said linker having a molecular weight between 1 kD and 15 kD, between 4 and 60 charged residues, characterized in that

- a) the biomolecule and the linker molecule are covalent coupled to each other,
- 25 b) the different biomolecule-linker products of uniform stoichiometry are fractionated by chromatography, based on differences in charge of said biomolecule-linker products, and
- c) fractions containing a coupling product of uniform stoichiometry are collected.

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 16 -

Preferably, standard chromatography materials and procedures, like ion exchange chromatography, e.g., employing Mono Q[®], Mono S[®], Source Q[®] or Source S[®] from Amersham-Pharmacia Biotech, are used to separate biomolecule-linker products of uniform stoichiometry based on charge differences. Fractions containing the desired products are collected. Individual biomolecule linker products of pre-selected stoichiometry or mixtures of several products of pre-selected stoichiometry and in pre-selected relative amounts are obtained. If desired, high purity levels are obtained by re-chromatography. Any desired pre-selected ratio of conjugates is obtained by pooling appropriate fractions.

10 As mentioned above the coupling products of different stoichiometry also are different with respect to their hydrophilicity. The hydrophilic linker structures influence the overall hydrophilicity or hydrophobicity of the coupling products. Products of different stoichiometry in a preferred embodiment also are separated by hydrophobic interaction chromatography using state of the art resins, like Phenyl Sepharose HP[®], Butyl Sepharose 4 fast flow[®] or others. Essential materials and procedures are described in Aslam, M. Dent, A. 15 The preparation of protein-protein conjugates in "Bioconjugation" (1998) 216-363, London, McMillan. Reversed phase chromatography may also be used.

The conjugate produced according to the procedures described herein contains at least one uniform coupling product between a biomolecule and a linker molecule in the amounts 20 desired. The relative amounts of each coupling product of uniform stoichiometry can be pre-selected as required. Pre-determined, desired relative amounts of individual coupling products of uniform stoichiometry can be exactly and reproducibly adjusted.

In a further preferred embodiment the pre-selected conjugate is essentially free of non-conjugated biomolecules.

25 It is also preferred that based on the fractionation now possible, the inventive conjugate does not contain biomolecule-linker products in a stoichiometry of 1:5 and above.

In a preferred embodiment the invention relates to a conjugate consisting of a biomolecule of a molecular weight between 5 kD and 500 kD and a hydrophilic linker molecule said linker having a molecular weight between 1 and 15 kD and between 4 and 60 charged 30 residues, characterized in that said conjugate comprises at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected amount.

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 17 -

Any desired purity of individual coupling products of uniform stoichiometry can now be produced and reproduced. Mixtures containing various coupling products of uniform stoichiometry in ratios (relative amounts) as required can easily be produced and reproduced. The inventive conjugate therefore comprises at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected relative amount as compared to at least one other biomolecule-linker product of uniform stoichiometry.

The less biomolecule-linker products of uniform stoichiometry form part of the conjugate the more easy it is produced or reproduced. A preferred conjugate essentially comprises 1 to 3 individual biomolecule-linker products of uniform stoichiometry. Even more preferred the conjugate comprises essentially two different coupling products of uniform stoichiometry. In a most preferred embodiment the conjugate according to the present invention essentially comprises a biomolecule-linker product of 1:1 stoichiometry.

In a further preferred embodiment the conjugate according to the present invention essentially comprises only one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry.

Amongst the various coupling products those with a uniform stoichiometry between 1:1 and 1:4 are preferred. Especially preferred are the biomolecule linker products with 1:2 and 1:1 stoichiometry, the latter representing the most preferred coupling product of uniform stoichiometry.

The term "essentially comprises" refers to the relative amount of one coupling product (or a mixture of up to three coupling products (each) of uniform stoichiometry as compared to the relative amount of other coupling products. With other words at least 80 % of all coupling product in such a conjugate are of the pre-selected stoichiometry. Preferably essentially comprises relates to conjugates containing at least 80 % of the uniform coupling product (or the desired mixture of coupling products). More preferred are conjugates comprising 90 % of the pre-selected coupling-product or mixture of coupling products. Most preferred is a relative purity of 95 % for the selected conjugate(s), as compared to the other coupling products.

In another preferred embodiment the inventive conjugate comprises in a relative amount as compared to other coupling products at least 80 % of two and most preferred at least 80 % of only one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry.

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 18 -

A very preferred conjugate comprises the coupling product of uniform 1:1 stoichiometry between a biomolecule with a molecular weight between 5 kD and 500 kD and a hydrophilic linker molecule said linker having a molecular weight between 1 and 15 kD and between 4 and 60 charged residues, in a relative purity of 80% or more. I.e. this 1:1 conjugate is present in a relative amount of 80 % or above as compared to the sum of other biomolecule-linker products.

More preferred is a conjugate comprising the coupling product with 1:1 stoichiometry in a relative amount of 90 % or above, even more preferred are conjugates comprising the coupling product of 1:1 stoichiometry in a relative amount of 95 % or above as compared to coupling products of different stoichiometry.

Nowadays, commercial assays are manufactured to require as little handling steps as possible. This is convenient and reduces the chances of handling errors. Of course, it is possible to provide the conjugate of the invention as such, e.g., frozen, or lyophilized to the customer.

It is preferred that the conjugate is part of a reagent composition. In many cases the conjugate is present in dilute and liquid form and therefore stabilizers, e.g. bovine serum albumin and/or various sugars and optionally as well reagents like preservatives and/or detergents are present. In a further preferred embodiment the invention relates to a composition of reagents comprising buffer components, a stabilizing reagent and a conjugate containing at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected amount.

Preferably the conjugate as produced according to the present invention is used in a test strip type immunological device.

Usually, not a single reagent but rather complete kits, containing at least the analyte-specific assay reagents are provided to the customer. In a preferred embodiment the invention relates to a test kit for biochemical or immunological detection of an analyte in a sample, said kit comprising appropriate buffers and reagents and at least one composition of reagents comprising a conjugate according to the present invention.

Immunoassays based on the novel conjugates have superior characteristics, as compared to assays based on conjugates produced with methods in the art. This positive effect on the assay itself is shown in the Examples section. Strikingly, the background problem is

significantly reduced if the novel conjugate is used under otherwise comparable assay conditions. The use of a conjugate comprising as biomolecule a member of a specific binding pair as described in the present invention in an immunoassay therefore represents another preferred embodiment of the invention.

- 5 Preferably, the novel conjugate is used in the detection of an analyte which is based on the reaction between an analyte specific binding partner and the analyte and the determination of the resulting analyte binding partner complex. Best known examples of specific binding assays are immunoassays. In immunoassays based on a biomolecule-linker (marker) conjugate the novel processes and reagents contribute to reproducibility of conjugates. The
10 more reproducible the conjugates, the better reproducible are the assays based thereon.

As discussed, both quality of conjugate as well as reproducibility according to state of the art procedures can only be influenced to a limited extent. It is, e.g., possible to remove aggregates or precipitates from the final conjugate. It is not possible with state of the art procedures to adjust the relative amounts of the coupling products of different
15 stoichiometry between the biomolecule and the linker molecule. It is very difficult or not possible to select the fraction(s) containing those coupling product(s) of uniform stoichiometry which is (are) best suited for the intended application. These disadvantages have been overcome with the present invention.

The following examples, references, and figures are provided to aid the understanding of
20 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.

Legend to the Figures:

Figure 1: Schematic representation of coupling BSA and the hy-BPRu-linker

- 25 The schematic for BSA illustrates the fact that several $-NH_2$ groups are available for binding to the hy BPRu-linker (marker).

Figure 2: Superdex 200 HR® chromatograph of a BSA-hy-BPRu-conjugate

This chromatograph demonstrates that the coupling products with different stoichiometries migrate as a single uniform peak. This single peak represents a statistical mixture of coupling products.

5 Figure 3: Schematic of BPRu-(UE)₂₅ K and BPRu-(UE)₅₀ K

These linker structures repeatedly contain the di-peptide β -alanine-glutamic acid (UE).

Figure 4: Branched linker with short backbone chain

This branched linker contains charged residues both in the short backbone, as well as in the side chains.

10 Figure 5: Branched linker with long backbone chain

This branched linker contains charged residues both in the long backbone, as well as in the side chains.

Figure 6: Branched linker without charged residues

15 This linker is very similar to the linker of Fig. 4 but does not carry charged residues of glutamic acid, instead glutamine is used. The apparent molecular weight has been found to be about 3,5 kD as compared to 18 kD for the linker of Fig. 4.

Figure 7: Schematic of biotinylated linker molecules

These N-terminally biotinylated (Bi-) linker molecules carry at the C-terminus -MH and -DSS groups respectively, which are used for coupling to a biomolecule.

20 Figure 8: Multiply branched linker

This schematic depicts a multiply branched linker with branched side chains, carrying two ruthenium labels (BPRu).

Figure 9: Superdex 200 HR® chromatography of various linker molecules

BSA and the different linker molecules have been chromatographed under identical conditions. The upper panel shows linker structures according to Figures 4 and 6. The lower panel shows linker structures according to Figure 3.

5 Figure 10: Mono Q® chromatograph of a crude BSA-Ru(SK)₄-MH conjugate

The chromatograph shows baseline separation of BSA (1) and conjugation products of uniform 1:1 (2) and 1:2 (3) stoichiometry, respectively.

Figure 11: Source 15 Q® chromatograph of a crude BSA-Ru(UE)₂₅-MH conjugate

10 Three conjugates of uniform stoichiometry 1:1; 1:2 and 1:3 (2, 3 and 4, respectively) are clearly separated from one another, as well as from non-conjugated BSA (1).

Figure 12: Superdex 200 HR® chromatograph of a first Fab'-Ru(UE)₂₅-MH coupling product

15 The crude conjugate is separated into three major peaks. Peak III which migrates with an apparent molecular weight of 50 kD comprises both the non-reacted Fab' as well as non-reacted linker (Ru-(UE)₂₅-MH). Peak II, which migrates with an apparent molecular weight of 100 kD comprises in essentially pure form the 1:1 coupling product between Fab' and linker (marker). Peak I comprises the 1:2 coupling product (apparent molecular weight of 150 kD). Compositions of each pool has been confirmed by MALDI-TOF MS.

20 Figure 13: Superdex 200 HR® chromatograph of a second Fab'-Ru(UE)₂₅ coupling product.

Peaks 1, 2 and 3 correspond to fractions containing conjugates of 1:3, 1:2 and 1:1 stoichiometry, respectively. Peaks 4 and 5 contain the un-conjugated starting materials (linker and Fab'-fragments). All structures have been confirmed by MALDI-TOF-MS.

Figure 14: Purification of F(ab')₂-BPRu-(UE)₂₅-DSS coupling products

Crude conjugate is separated by Superdex 200 HR[®] chromatography. The peaks containing the 1:2 and the 1:1 coupling products are pooled separately and re-chromatographed. The composition of these coupling products has been confirmed by MALDI-TOF-MS.

5 Figure 15: Purification of F(ab')₂-BPRu-UEEK-DSS coupling products

Crude conjugate is separated by Superdex 200 HR[®] chromatography. Only one symmetric „product peak“ is found, comprising a statistical mixture of coupling products with different stoichiometries.

Figure 16: Purification of IgG-(Bi)-(UE)₂₅-DSS coupling products

- 10 Crude conjugate is separated by Source 30[®] chromatography. Non-conjugated IgG (pool 1) is easily eluted from the column. Mono-biotinylated IgG is pooled (pool 2) and clearly separated from the di-biotinylated IgG (pool 3).

Example 1: Ruthenylation of bovine serum albumine according to the state of the art

- 15 Bovine serum albumine and a linker known in the art (see Figure 1) have been used to set up 5 conjugation mixtures. All variables like lot-size, concentrations of reagents, buffer compositions, time of reaction, temperature of reagents as well as chromatographic separation procedures have been kept constant.

- BSA was dissolved in a 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0) at a concentration of 20 mg/ml. The hy-BPRu linker (label; cf. Fig.: 1, top) was dissolved in DMSO at a concentration of 47 mg/ml. A 5-fold molar excess of hy-PBRu was added to the BSA solution, the reagents thoroughly mixed and reaction performed for 75 min at 25°C. The reaction was stopped by addition of lysine to a final concentration of 10 mM and incubation under stirring for further 30 min at 25°C.

- 25 Free non-bound derivatization reagents were completely removed by dialysis (20 hours at 4°C) against phosphate buffered saline with 50 mM phosphate 150 mM sodium chloride at pH 7.5 (PBS), which has been used in 500-fold excess.

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 23 -

The active groups the O-hydroxysuccinimide ester in Figure 1 react statistically with the different NH₂-groups of BSA. The resulting crude conjugate has been chromatographed by Superdex 200 HR[®] chromatography using buffer conditions of 0.05 mmol/l sodium phosphate, 0.05 mmol/l sodium chloride and 5 % methanol at pH 6.5. Elution is monitored. Appropriate fractions are pooled. The product peak was analyzed by electro-spray-ionization mass-spectroscopy (ESI-MS). The results of such analysis are summarized in Tables 1 and 2.

Table 1: Distribution of BSA-Ruthenium conjugates according to molecular weight

Lot	Labeling index RSA:BP Ru	Stoichiometry 1:0	Stoichiometry 1:1	Stoichiometry 1:2	Stoichiometry 1:3	Stoichiometry 1:4
BSA unmodified	0	66500 D				
Conjugate Ch1	1: 2,3		68300 D	69400 D	70400 D	71300 D
Conjugate Ch2	1:2,3	66500 D	68300 D	69500 D	70500 D	
Conjugate Ch3	1:2,8		68500 D	69600 D	70700 D	71800 D
Conjugate Ch4	1:2,9		68000 D	69200 D	70300 D	
Conjugate Ch5	1:3,1			69400 D	70600 D	71500 D

10 Table 2: Relative amounts of the different coupling products

(the most abundant coupling product has been set to 1 and the others are expressed as relative amounts thereto).

Lot	Labeling index RSA:BP Ru	Stoichiometry 1:0	Stoichiometry 1:1	Stoichiometry 1:2	Stoichiometry 1:3	Stoichiometry 1:4
BSA unmodified	0	1,00				
Conjugate Ch1	1: 2,3		0,77	1,00	0,57	0,40
Conjugate	1:2,3	0,48	0,48	1,00	0,71	

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 24 -

Ch2						
Conjugate	1:2,8		0,38	0,78	1,00	0,62
Ch3						
Conjugate	1:2,9		0,59	1,00	0,57	
Ch4						
Conjugate	1:3,1			0,54	1,00	0,56
Ch5						

- It is obvious from tables 1 and 2 that all 5 lots, though produced under identical conditions clearly are different from one another. Lot 1 and 2 have the same overall labeling index of 2.3 (this means in the average 2.3 ruthenium labels are found per BSA molecule).
- 5 Nonetheless, both preparations differ significantly in the relative amounts of the individual conjugation products as is evident from Table 2. Also the overall labeling indices vary quite significantly. It is evident from Figure 2 that by standard chromatographic procedures using a Superdex 200 HR® column, all reaction products elute as a homogeneous peak.
- 10 Fractionation of coupling products e.g., into a fraction containing uniformly a 1:1 conjugate, is not possible.

Example 2: Synthesis of linker structures

Synthesis of branched linker structures

- 15 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 3 were used.

Table 3:

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

The amino acids and amino acid derivatives were dissolved in N-methyl-pyrrolidone. The peptide is synthesized on Wang resin (S.-S. Wang, J. Am. Chem. Soc. 95 (1973) 1328). 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

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 26 -

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. Non-symmetric 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 (B.W. Bycroft et al. (1993), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 778; A. Merzouk et al., (1992) *Tetrahedron Lett.* 33, 477). Terminal amino groups on the solid phase are optionally acetylated or succinylated with acetic anhydride or succinic anhydride.

10 The hapten, label or functional group in those cases where the 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 drop-wise and stirred for 2 h at room temperature.

The marker 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 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 the mixture 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. 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.

Alternatively the marker 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) may be used and the protective group removed enzymatically with PenG amidase (described in PCT/EP 95/02921).

b) Synthesis of linear charged linker structures

Linear charged linker structures have been synthesized essentially as described in US 5,958,783 .

c) Examples of linker structures investigated.

Table 4 gives an overview over some of the linker structures used. Structure 1 and 10 are structures known from the art, whereas all other structures comprise additional features, e.g., a strikingly high apparent molecular weight.

15 Where available, laboratory names have also been given. References are made to the Figures in which these structures (or basic structures used for MH- or DSS-activation) are given.

Table 4: Overview of linker structures (linear or branched)

No.	Lab-name	Fig	MW [D]	MW (a)
1	hy-BPRu	1	1773	~ 2 kD
2	BPRu(UE) ₂₅ K	3	5802	~ 50 kD
3	BPRu(UE) ₅₀ K	3	10807	~ 70 kD
4	BPRu(UE) ₂₅ -K-MH	[3]	5996	~ 50 kD
5	BPRu(UE) ₂₅ -K-DSS	[3]	6056	~ 50 kD
6	BPRu(UE) ₅₀ -K-MH	[3]	11001	~ 70 kD
7	BPRu-SK(2) charged	4	3004	~ 18 kD
8	BPRu(UE) ₂₅ -K-MH branched	5	8010	~ 70 kD
9	BPRu(UE) ₂₅ -K-DSS branched	5	8072	~ 70 kD
10	BPRu-SK(2)	6	3392	3,5 kD

not charged				
11	BPRu(UE) ₂₅ -K-MH	[7]	5570	~ 50 kD
12	BPRu(UE) ₂₅ -K-DSS	[7]	5630	~ 50 kD
13	BPRu(SK) ₄ -DSS	8	6457	~ 60 kD
	multiply branched linker			

- (a) Apparent molecular weight
n.d. not determined
n.s. not shown
MH maleimide activated
5 DSS N-hydroxysuccinimidylsuccinate
Bi biotin
[] basic structure shown in Figure []

Figure 9 shows Superdex 200 HR® chromatographs of linker (marker) structures in comparison to BSA. The dramatic influence of charged residues becomes evident from the top panel, whereas the uncharged linker migrates with a molecular weight of about 3 500 D the charged linker is found with an apparent molecular weight of about 18 000 D. Figure 9 bottom panel demonstrates the great effects which a long charged backbone of a linker molecule has on differences in apparent molecular weight. Structure 2 (BPRu-(UE)₂₅) which has a molecular weight of 5 802 for example migrates with an apparent molecular weight of around 50,000 D.

As already indicated in table 4 the linker molecules may be activated. An example for activation is the introduction of a maleinimido function. In order to introduce the maleinimide function, a linker e.g. produced according to example 2 is dissolved in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.0 and admixed with one equivalent maleinimidohexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester (dissolved in DMSO) and stirred for 16 h at 25°C. The preparation is purified by preparative HPLC using an RPC18 column (see above). The identity of the eluted material is checked by means of mass spectrometry.

Example 3: Novel bovine albumine linker conjugates

As described in WO 96/03652 carrier molecules comprising multimeric antigens are of great advantage in the detection of anti-viral-antibodies. For production of a polyhapten, the amino groups of carrier molecule first are activated using a active ester group. This active ester group is selected to match the corresponding active group on the marker group

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 29 -

used. Preferred active groups are the maleinimidoethyl (MHS) or maleinimidopropyl-N-hydroxysuccinimide ester (MPS). As a result primary amino groups in the carrier (for example the ϵ -amino side chains of lysine residues) partially are derivatized to carry the desired maleinimido groups. After coupling the marker group to the activated carrier the –

5 NH₂ groups of the carrier are present either unmodified, or carrying an MHS group, or carrying a label via the MHS-linker.

The linker (marker) structures schematically shown in Figures 3 (DSS-activated) and 8 have been coupled to BSA under identical conditions.

BSA is dissolved in 0.1 mmol/l potassium phosphate buffer of pH 7.5 in a concentration of

10 10 mg/ml. The linker (marker) is added in a molar ratio of 4.5 per mole of BSA. Reaction is performed for 3 hours at room temperature. The reaction product is subjected to ion exchange chromatography. Separation of coupling products with uniform stoichiometry is achieved by using a Source 15 Q[®] or a Mono Q[®] column.

The crude conjugate of the multiply branched linker (cf. Fig. 8 and structure 13 of table 1)

15 was fractionated with Mono Q[®] chromatography. Elution was performed using a salt gradient from 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) (= eluent A) to 1M sodium chloride in 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) (= eluent B). Elution is monitored at 280 nm. The gradient shown in Figure 10 covers the range of 25 to 54 % eluent B and corresponds to 30 min of elution. Appropriate fractions are pooled. Fractions

20 are analyzed by MALDI-TOF-MS. MS data confirmed that each of the three peaks contained in pure form BSA (1 in Fig. 10) and BSA molecules carrying 1, or 2 linker (marker) groups (2, and 3 in Fig. 10, respectively).

The crude conjugate obtained with the long and strongly negative charged linear linker (cf. structure 12 from table 4 and Fig. 3) has been separated by Source 15 Q[®] chromatography.

25 Elution was performed using a salt gradient from 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) (= eluent A) to 1M sodium chloride in 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) (= eluent B). Elution is monitored at 280 nm. The gradient shown in Figure 10 covers the range of 30 to 40 % eluent B and corresponds to 30 min of elution. Appropriate fractions are pooled. Fractions are analyzed by MALDI-TOF-MS. MS data confirmed that each of

30 the four peaks contained in pure form BSA (1 in Fig. 11) and BSA molecules carrying 1, 2 or 3 linker (marker) groups (2, 3 and 4 in Fig. 11, respectively).

Example 4: Production of a first novel Fab'-linker-conjugate**1. Description of the procedure****1.1. Preparation of the Fab' from IgG**

5 A monoclonal antibody to digoxin (anti-Dig) was cleaved by pepsin to form F(ab')₂. 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).

10 1.2. Fab'-BPRU linker conjugate

The conjugate synthesis was carried out via -SH group chemistry 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 as a result of reduced intramolecular disulphide bridges in the light and in the Fd chain.

15 1.3. Purification of the crude conjugate

The crude conjugate was purified by a molecular sieve. In this process the mono-ruthenylated material was separated from the poly-ruthenylated material.

2. Procedure**2.1. Cleavage of the antibody to form F(ab')₂**

20 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
25 solution was heated in a water bath to 37°C. 100 µl pepsin solution (3 mg/ml) was added

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 31 -

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.

2.2. Reduction to Fab'

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 dialyzed against 0.1 M NaH₂PO₄/NaOH pH 6.5, 30 mM NaCl, 2 mM EDTA.

2.3. Synthesis of the Fab'-BPRu-linker conjugate

The BPRu-linker-MH (the branched linker of Fig. 8, but carrying a DSS instead of an MH group) 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.

2.4. Purification

The crude conjugate was concentrated 2-3-fold using an Amicon PM 10 and purified by means of Superdex 200 HR® (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. If required, re-chromatography can be performed.

The crude conjugate predominantly contains coupling products consisting of Fab'-fragments to which at one of the -SH-groups in the hinge region a linker is bound. To a smaller extend also multiply labeled Fab'-fragments are present (cf. peaks III, II, and I, respectively, in Fig. 12).

Example 5: Production of a second novel Fab'-BPRu(UE)₂₅-conjugate

1. F(ab')₂ and Fab'-fragments were prepared from an anti-HIV p24 monoclonal

25 Fragmentation is essentially performed as described in Example 4. The F(ab')₂-solution is dialyzed against 50 mM potassium phosphate, 150 mM sodium chloride buffer of pH 7.5.

To an $F(ab')_2$ - solution containing 5 mg/ml $F(ab')_2$ -fragments cysteamine in a final concentration of 25 mM is added. The solution is incubated for 60 minutes at 37 °C. Reaction is stopped via buffer change using a PDI0-column buffer to pH 6.0 with a 50 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride buffer.

5 2. Ruthenylation of Fab' -fragment

The linker BPRu-(UE)₂₅-MH is dissolved in DMSO in a concentration of 25 mg/ml. The molar ratio of Fab' -fragments to BPRu-(UE)₂₅-MH linker (maker) is set at 1 to 2. The reaction mixture is incubated for 90 minutes at 25 °C in a 50 mM potassium phosphate, 150 mM sodium chloride solution (pH 7.1). The reaction is stopped by addition of 2 mM
10 cysteine and incubation of the solution for 30 minutes at 25 °C. N-methyl-maleinimid is added at 5 mM and incubated for 60 minutes at 55 °C.

3. Purification

The crude conjugate was concentrated about 3-fold using a CENTRICON 10 and purified by means of a Superdex 200 HR® column buffered to pH 7.5 with 50 mM potassium
15 phosphate, 150 mM sodium chloride. As can be seen from Figure 11, the crude mixture has been found to contain non-conjugated Fab' -fragment, non-conjugated linker (marker) as well as conjugates of uniform stoichiometries of 1:1, 1:2 and 1:3 (cf. peaks 5 and 4, 3, 2, and 1, respectively of Fig. 13).

Example 6: Ruthenylation of $F(ab')_2$ -fragments

20 1. Description of the procedure

1.1. Production of $F(ab')_2$ fragments of IgG

The same monoclonal antibody as known from Example 5 is used for production of $F(ab')_2$ -fragments. Digestion of IgG by pepsin is performed as described in Example 5. After quantitative cleavage pepsin is inactivated by increasing the pH and by adding
25 pepstatin. $F(ab')_2$ -fragments are purified using Superdex 200 HR® column chromatography.

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 33 -

1.2. Synthesis of F(ab')₂-BPRu-(UE)₂₅-DSS

Conjugation is performed by coupling the active group of BPRu-(UE)₂₅-DSS (the linker of Fig. 3 carrying a DSS group) to amino groups of the F(ab')₂-fragment. Dependent on the initial concentration of reagents as well as to the stoichiometry chosen between the F(ab')₂-fragments and the linker (marker) molecules a crude conjugate is obtained with a higher or lower average labeling index. With other words, a random Poisson distribution of Fab'-molecules is obtained which carry varying amounts of linker structures.

1.3. Purification of crude conjugates

The crude conjugate is concentrated and purified using routine molecular sieve chromatography.

Due to the unusual high apparent molecular weight, as contributed by each individual linker molecule, the coupling products of different stoichiometries can be separated from one another.

2. Procedure

2.1. Cleavage of IgG to F(ab')₂

Cleavage of Mab<p24>M-6D9-IgG to Mab<p24>M-6D9-F(ab')₂. Lyophilised IgG of a monoclonal antibody against p24 of HIV is reconstituted with H₂O to a final concentration 20 mg/ml. Cleavage is performed as described in Example 5.

2.2. Purification of F(ab')₂-fragments by Superdex 200 HR® chromatography.

The F(ab')₂-fragment produced as described are purified using the following buffers and conditions:

Column material	Superdex 200 HR®
Buffer	10 mM sodium phosphate, buffer adjusted to pH 7.5
	30 mM sodium chloride
Flow rate	10 ml/cm ² /h
Sample volume	1.5 % of that volume of the column
Concentration of sample	20 mg/ml

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 34 -

Monitoring of eluate photometer 280 nm

The fractions containing $F(ab')_2$ -fragments are pooled concentrated and re-chromatographed under identical conditions.

5 2.3. Labeling of $F(ab')_2$ -fragments with BPRu-(UE)₂₅-DSS

BPRu-(UE)₂₅-DSS is dissolved in DMSO at 5mg/ml. Coupling stoichiometry is chosen at 1:5 (mol/mol) = $F(ab')_2$ -fragments : linker

The reaction mixture is incubated for 1 h at room temperature. Reaction is stopped by addition of lysine to a final concentration of 10 mM.

10 2.4. Coupling of $F(ab')_2$ -fragments with BPRu-UEEK-DSS

The linker (label) BPRu-UEEK-DSS is dissolved in DMSO at a concentration of 5 mg/ml. The stoichiometry chosen for coupling is

1:5 (mol/mol) = $F(ab')_2$ -fragments : BPRu-UEEK-DSS.

15 The reaction mixture is incubated for 1 h at room temperature. Reaction is stopped by addition of lysine to a final concentration of 10 mM.

2.5. Purification of crude coupling products

20 Purification is performed by Superdex 200 HR[®] chromatography. Chromatography of both $F(ab')_2$ -conjugates is performed in a 100 mM Hepes-buffer adjusted to pH 7.5, containing 1 mM EDTA and 5 % DMSO. The flow rate is set to 5 ml/cm²/h. Detection is performed at 280 nm. Sample volume is 1.5 % of column volume.

25 As it is obvious from Figures 14 and 15 only the coupling products produced with the strongly negatively charged linker hy-BPRu-(UE)₂₅-DSS (Fig. 14) can be separated into fractions containing coupling products of uniform stoichiometry, whereas all coupling products using the conventional linker (Fig. 15) elute as one peak. The pooled fraction containing the majority of coupling products with 1:1 stoichiometry (ca. 107 min to 125 min; peak at 111 min in Fig. 14) has been re-chromatographed once and purity as well as molecular weight been confirmed by MALDI-TOF MS.

Example 7: Immunoassay using different antibody-linker conjugates

A double-antigen-test which is used for example in the detection of specific antibodies against HIV has been used as model system. The sample (suspected to contain antibodies against HIV) is incubated with a biotinylated antigen and a digoxigenin-labeled antigen in the presence of a streptavidin-coated solid phase and an BPRu-labeled antibody against digoxin. In the presence of anti-HIV-antibodies in a sample a detection complex is formed comprising the streptavidin-coated solid phase the biotinylated antigen the antibody to be detected, the digoxinylated antigen and the ruthenium-labeled antibody reactive with digoxin. The detection of anti-HIV-antibodies is performed by measuring the electrochemiluminescence-signal bound to the solid phase according to standard electrochemiluminescence procedures.

In this model system an N-terminally labeled HIV peptide from the gp41-region of HIV 1 has been used. Details relating to this peptide and to the labeling of this peptide are described in WO 96/03423. Both antigens have been used in a concentration of 20 ng/ml.

All components of the system have been kept constant and only the detection system, i.e., the ruthenium-labeled anti-digoxin reagent has been varied. For all conjugates listed in Tables 5 and 6 a Fab'-fragment of an anti-DIG antibody has been used at the same concentration of ruthenium label.

Table 5: Absolute counts measured

experiment [counts]	conjugate E	conjugate F	conjugate G	conjugate H
negative sample	488	895	394	282
Positive sample 1	65108	74993	59379	68469
Positive sample 2	119557	138898	113507	134360

20

Table 6: Reaction normalized to negative sample

experiment pos./neg. sera	conjugate E	conjugate F	conjugate G	conjugate H
negative sample	1,0	1,0	1,0	1,0
positive sample 1	133,4	83,8	150,7	242,8
positive sample 2	245,0	155,2	288,1	476,5

Conjugates E and F have been produced according to EP 720 614 using molar ratios of 1:2 and 1:6 (Fab' to linker), respectively. The linker used was KEEU-BPRu.

Conjugates G and H contained the purified 1:1 coupling products produced and purified according to the present invention comprising the linker (label) structures shown in Figures 3 ((UE)₂₅ and MH-activated) and 4, respectively.

The novel 1:1 conjugate allow for a better separation of positive sample from negative samples. This is most easily seen from table 6 where the signals obtained for the positive sere are normalized to the negative serum.

10 **Example 8: Conjugation of monoclonal antibody (MAB) <Ferritin>M-4.184 to a biotinylated linker (Bi-(UE)₂₅-DSS)**

In this example a complete MAB of the IgG class (MW about 150 kD) has been used for conjugation. The basic structure of the linker (marker) used (Bi(UE)₂₅-DSS) is given in Fig. 3. Instead of the ruthenium chelate complex this linker carries a biotinyl group (Bi-) and it has been modified to carry a DSS group at its C-terminal end.

Mode of conjugation

Bi(UE)₂₅-DSS dissolved to a concentration of 15 mg/ml in DMSO is added to purified IgG of MAB<Ferritin>M-4.184 (10 mg/ml in 100 mM potassium phosphate buffer of pH 8.5) to result in a final molar ratio of 1:1 (IgG to linker). The reaction mixture is incubated for 60 minutes at 25° C and conjugation stopped thereafter by addition of lysine to a final concentration of 10 mM.

The reaction product is dialyzed against a 20 mM potassium phosphate buffer of pH 7.5.

Purification of MAB<ferritin>M-4.184-IgG- Bi((UE)₂₅-DSS)

Purification has been performed by Source 30 Q[®] chromatography. Elution has been performed by applying a salt gradient using 20 mM potassium phosphate (pH 6.5) as buffer (A) and 20 mM potassium phosphate with 1 M NaCl (pH 6.5) as buffer (B). The results obtained are given in Fig. 16. It is clear that by this procedure and by appropriate pooling immunoglobulin carrying only one linker (marker) (mono-biotinylated IgG) can be easily obtained.

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 37 -

List of References

- Aslam, M. Dent, A. The preparation of protein-protein conjugates in "Bioconjugation"
(1998) 216-363, London, McMillan
- 5 B.W. Bycroft et al. (1993), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 778
- Engvall, E. and Perlman, P., *Immunochemistry* 8 (1971) 871-4
- Merzouk A. et al., (1992) *Tetrahedron Lett.* 33, 477
- Methods in Enzymology, Colowick S.P., Caplan N.O., Eds., Academic Press
- Tijssen - in "Methods in Enzymology" (1992) Academic Press
- 10 Tijssen Laboratory techniques in "Macromolecule conjugation" (1985) 258-268
- Wang S.-S., *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 1328
- van Weemen, B.K. and Schuures A.H.W.M. (1971), *FEBS letters* 15, 232
- PCT/EP 95/02921
- 15 EP 0 061 888
- US 5,958,783
- WO 96/03409
- WO 96/03423
- WO 96/03651
- 20 WO 96/03652
- WO 96/03657

Patent Claims

1. Process for the production of a conjugate comprising at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected amount, said conjugate consisting of a biomolecule of a molecular weight between 5 kD and 500 kD and a hydrophilic linker molecule, said linker having a molecular weight between 1 kD and 15 kD, between 4 and 60 charged residues, characterized in that
 - a) the biomolecule and the linker molecule are covalent coupled to each other,
 - b) the different biomolecule-linker products of uniform stoichiometry are fractionated by chromatography, and
 - 10 c) the fractions containing a coupling product of uniform stoichiometry are collected.
2. The process according to claim 1, further characterized in that said hydrophilic linker comprises between 4 and 60 negatively charged residues.
3. The process according to claim 1, further characterized in that said hydrophilic linker comprises between 4 and 60 positively charged residues.
- 15 4. The process according to any of claims 1 to 3, further characterized in that the hydrophilic linker comprises 6 to 50 charged residues.
5. The process according to any of claims 1 to 4, further characterized in that said linker comprises a peptidic backbone.
6. The process according to any of claims 1 to 5, further characterized in that said biomolecule is a polypeptide.
7. The process according to any of claims 1 to 6, further characterized in that said chromatographic separation is based on differences in apparent molecular weight of said biomolecule linker products .
- 20 8. The process according to any of claims 1 or 7 further characterized in that, said hydrophilic linker has an apparent molecular weight of > 20 % and < 500 % of the apparent molecular weight of said biomolecule.

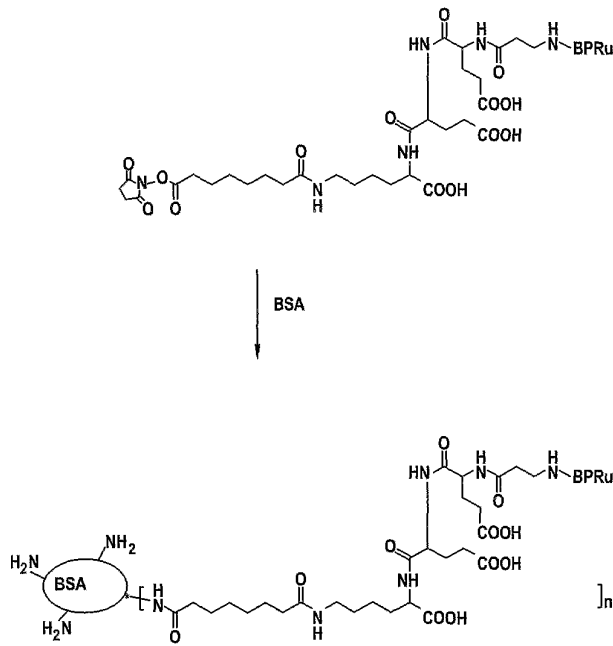
WO 02/27317

PCT/EP01/11101

- 39 -

9. The process according to any of claims 1 to 6, further characterized in that said chromatographic separation is based on differences in charge of said biomolecule-linker products.
10. Conjugate as produced according to any of claims 1 to 9.
- 5 11. Composition of reagents comprising buffer components, a stabilizing reagent, and a conjugate produced according to any of claims 1 to 9.
12. Test kit for biochemical or immunological detection of an analyte in a sample said kit comprising appropriate buffers and reagents and at least one composition of reagents according to claim 11.
- 10 13. Use of a conjugate according to any of claims 1 to 9 or a composition of reagents according to claim 11 in an immunoassay.

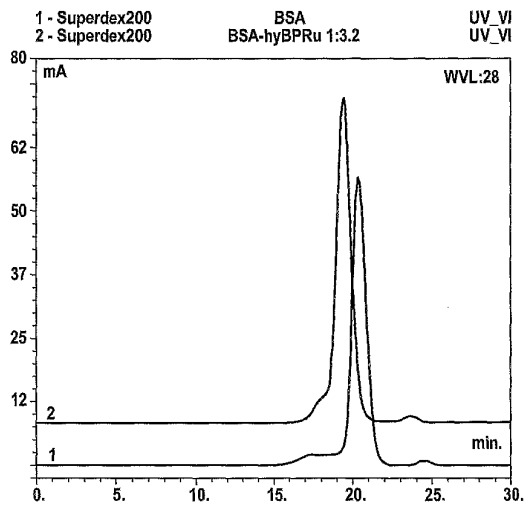
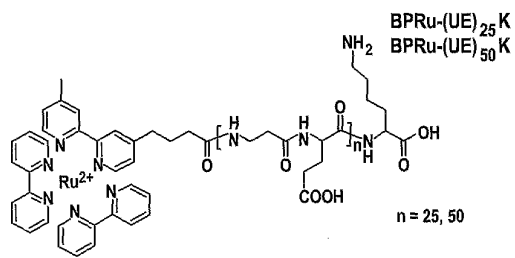
1/11

Figure 1: Schematic for BSA and its conjugation to hy-BPRu

WO 02/27317

PCT/EP01/11101

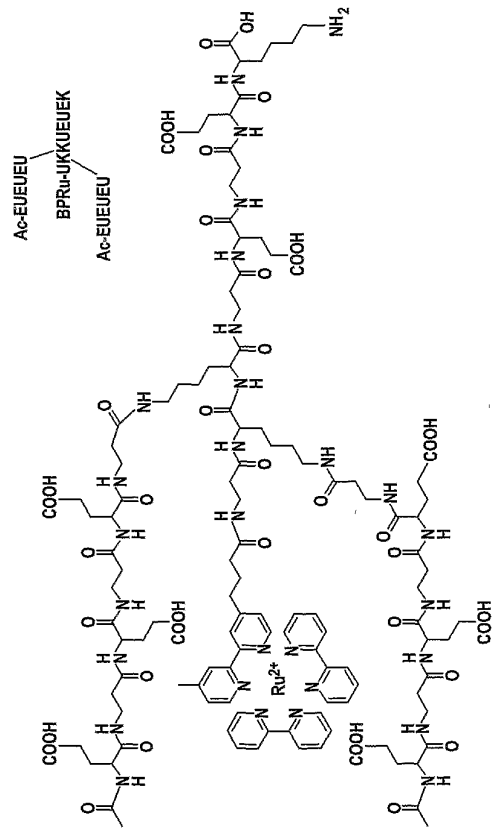
2/11

Figure 2: Superdex 200 HR® chromatograph of a BSA-hy-BPRu-conjugate**Figure 3:** Schematic of BPRu-(UE)₂₅K and BPRu-(UE)₅₀K

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

3/11

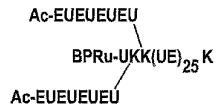
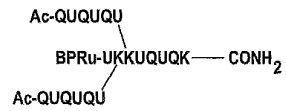
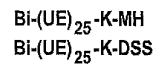
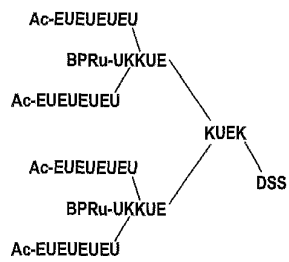
Figure 4: Branched linker with short backbone chain



WO 02/27317

PCT/EP01/11101

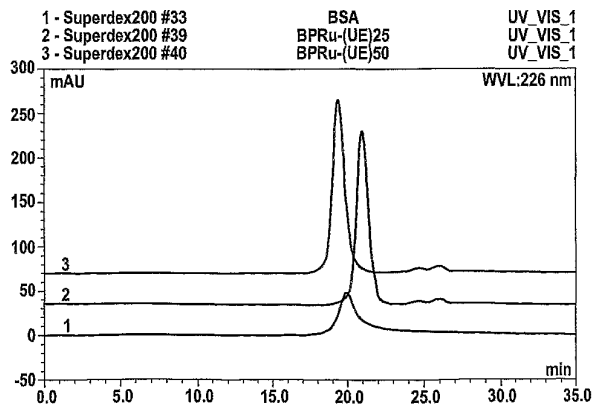
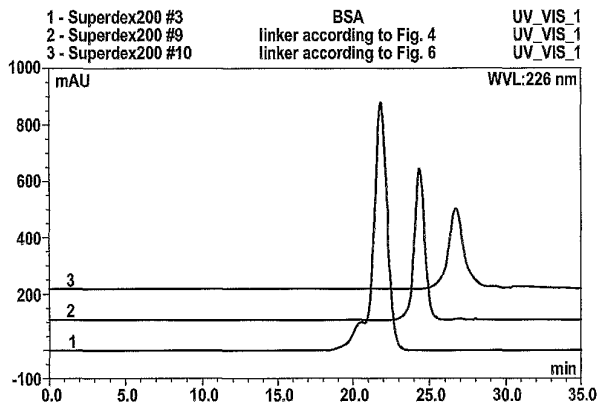
4/11

Figure 5: Branched linker with long backbone chain**Figure 6:** Schematic of a branched linker without charged residues**Figure 7:** Schematic of biotinylated linker molecules**Figure 8:** Schematic of a multiply branched linker with two marker groups

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

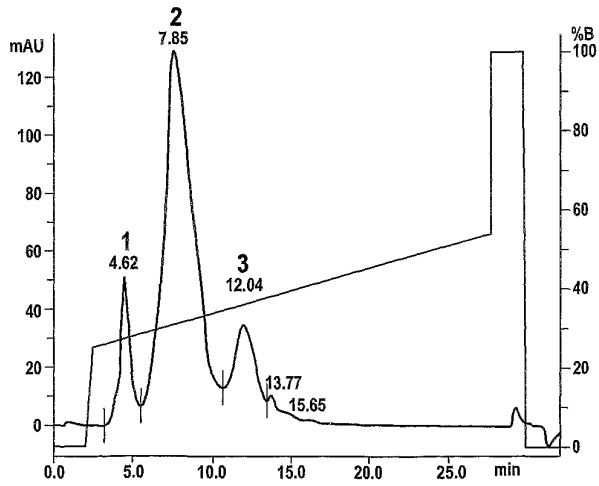
5/11

Figure 9: Superdex 200 HR® chromatography of various linker molecules



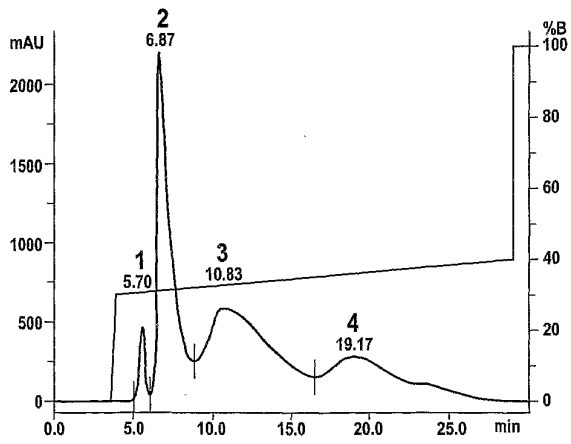
6/11

Figure 10: Mono Q® chromatograph of a crude BSA-Ru(SK)₄-MH conjugate



7/11

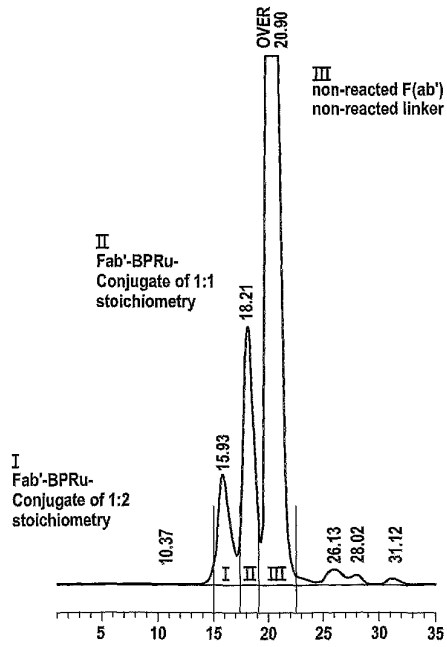
Figure 11: Source 15 Q® chromatograph of a crude BSA-Ru(UE)₂₅-MH conjugate



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

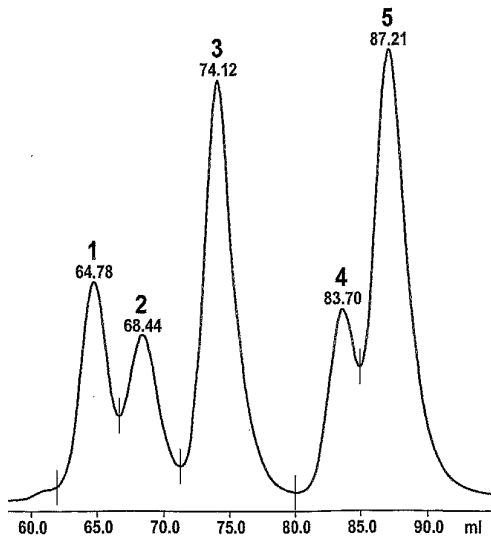
8/11

Figure 12: Superdex 200 HR® 10/30 chromatograph of a first Fab'-Ru(UE)₂₅-MH coupling product



9/11

Figure 13: Superdex 200 HR® 10/30 chromatograph of a second Fab'-Ru(UE)₂₅ coupling product.



WO 02/27317

PCT/EP01/11101

10/11

Figure 14: Purification of F(ab')₂-BPRu-(UE)₂₅-DSS coupling products

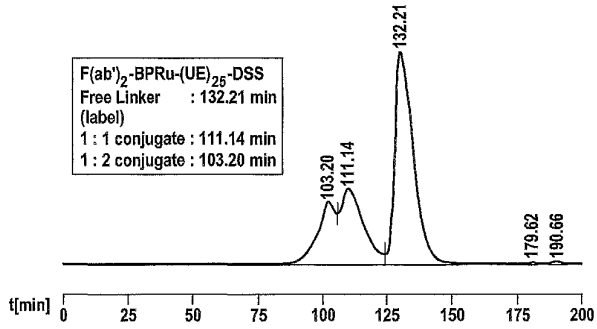
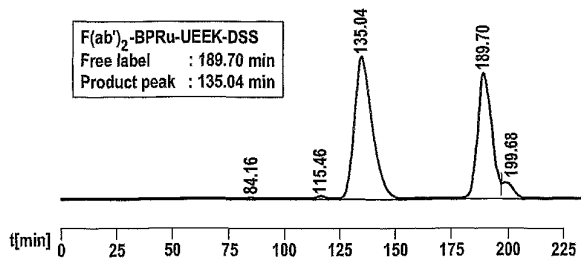
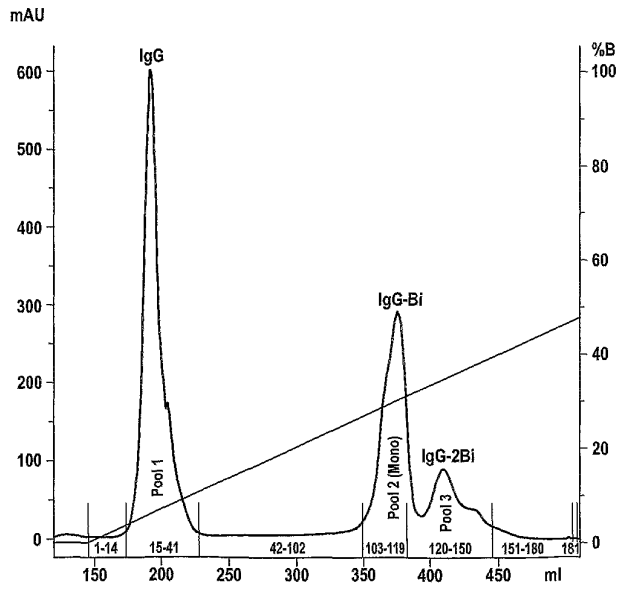


Figure 15: Purification of F(ab')₂-BPRu-UEEK-DSS coupling products



11/11

Figure 16: Purification of IgG-(Bi-(UE)₂₅-DSS) coupling products



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(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

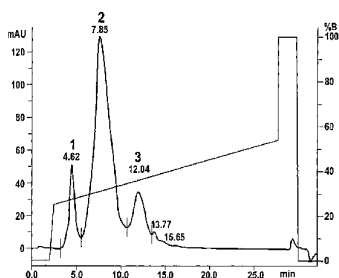
(10) International Publication Number
WO 02/027317 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/531, 33/53, 33/68
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): HOESS, Eva [DE/DE]; Zitzelsbergerstrasse 13a, 81476 Muenchen (DE); ANDRES, Herbert [DE/DE]; Kapellenwiese 39, 82377 Penzberg (DE); DONIE, Frederic [DE/DE]; In der Au 10, 82377 Penzberg (DE); VOGEL, Rudolf [DE/DE]; Am Eselsberg 7, 82362 Weilheim (DE); JOSEL, Hans-Peter [DE/DE]; Ulmenstrasse 28, 82362 Weilheim (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/EP01/11101
- (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; 01 107491.1 29 March 2001 (29.03.2001) EP
- (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): E.HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).
- (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, 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 (GI, 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).

[Continued on next page]

(54) Title: CONJUGATES OF DEFINED STOICHIOMETRY

Mono Q® chromatograph of a crude BSA-Ru(SK)₄MH conjugate



(57) Abstract: The invention relates to a process for the production of a biomolecule-linker conjugate of uniform stoichiometry. It especially relates to a conjugate consisting of a biomolecule of a molecular weight between 5 kD and 500 kD and a hydrophilic linker molecule said linker having a molecular weight between 1 and 15 kD and between 4 and 60 charged residues, characterized in that said conjugate comprises at least one biomolecule-linker product of uniform stoichiometry in a pre-selected amount.

WO 02/027317 A3

WO 02/027317 A3



IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NI, SN, TD, TG).

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, MI, MR, NF, 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 designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, 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, MY, NZ, NO, NZ, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, *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,

— of inventorship (Rule 4.17(v)) for US only
 — of inventorship (Rule 4.17(v)) for US only
 — of inventorship (Rule 4.17(v)) for US only

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:

12 September 2003

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.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor's Application No. PCT/EP 01/11101
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/531 601N33/53 601N33/68		
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 601N		
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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 958 783 A (OFENLOCH-HAEHNLE BEATUS ET AL) 28 September 1999 (1999-09-28) cited in the application column 2, line 49 -column 3, line 25 column 6, line 63 -column 7, line 64 examples 2-4 column 11, line 16,17 claims 1,12-15,20-25	1-13
X	DE 44 30 972 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 1 February 1996 (1996-02-01) cited in the application page 4, line 55 - line 59 examples 2-4	1-8, 10-13
-/-		
<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 claim or other special reason (as specified) "O" document relating 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		Date of mailing of the international search report
13 November 2001		30/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2017, D-69110 Heidelberg, Germany Tel: (+31-70) 340-3040, Tx: 551 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stricker, J-E

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/EP 01/11101

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 120 768 A (GOVINDAN SERENGULAM V ET AL) 19 September 2000 (2000-09-19) claims 1-34,40 examples 1A,1B ---	1-10
X	US 5 047 324 A (FREDRICKSON ROBERT A) 10 September 1991 (1991-09-10) column 2, line 18 column 2, line 27 - line 34 column 2, line 35 -column 3, line 25 -----	1-8,10, 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5958783	A	28-09-1999	DE 4430998 A1	01-02-1996
			DE 4439347 A1	01-02-1996
			DE 4439345 A1	01-02-1996
			AT 187732 T	15-01-2000
			AT 193294 T	15-06-2000
			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 , B	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 4439346 A1	01-02-1996
			DE 59507438 D1	20-01-2000
			DE 59508391 D1	29-05-2000
			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			
JP 10504539 T	06-05-1998			
JP 2771900 B2	02-07-1998			
DE 4430972	A	01-02-1996	DE 4430972 A1	01-02-1996
			AU 688953 B2	19-03-1998
			AU 3220495 A	22-02-1996
			CA 2195753 A1	08-02-1996
			CN 1157655 A	20-08-1997
			WO 9603652 A1	08-02-1996
			EP 0772774 A1	14-05-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 01/11101

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
DE 4430972	A	FI 970301 A	24-03-1997	
		JP 10504539 T	06-05-1998	
		KR 240514 B1	15-01-2000	
		NO 970292 A	13-03-1997	
		NZ 291153 A	28-01-1999	
		AT 187732 T	15-01-2000	
		AT 193294 T	15-06-2000	
		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 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	
		CN 1130910 A	11-09-1996	
		CN 1134154 A ,B	23-10-1996	
		CN 1152923 A	25-06-1997	
		DE 4430973 A1	01-02-1996	
		DE 4430998 A1	01-02-1996	
		DE 4439345 A1	01-02-1996	
		DE 4439346 A1	01-02-1996	
		DE 4439347 A1	01-02-1996	
		DE 59507438 D1	20-01-2000	
		DE 59508391 D1	29-06-2000	
		WO 9603650 A1	08-02-1996	
		WO 9603651 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 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			
US 6120768	A	19-09-2000	US 5736119 A	07-04-1998
			AU 1825899 A	05-07-1999
			WO 9930745 A2	24-06-1999
			AU 699216 B2	26-11-1998
			AU 6038496 A	30-12-1996
			CA 2223261 A1	19-12-1996
			EP 0837696 A1	29-04-1998
			JP 11507046 T	22-06-1999
			WO 9640245 A1	19-12-1996
			US 6228362 B1	08-05-2001
			US 5846741 A	08-12-1998
			US 5965131 A	12-10-1999
			US 5958408 A	28-09-1999
AU 4047497 A	20-02-1998			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l Application No
 PCT/EP 01/11101

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 6120768	A	WO 9804293 A1	05-02-1998	
		US 5922302 A	13-07-1999	
		AU 663893 B2	27-11-1997	
		AU 6908994 A	12-12-1994	
		CA 2163107 A1	24-11-1994	
		EP 0700304 A1	13-03-1996	
		JP 8510250 T	29-10-1995	
		KR 220864 B1	15-09-1999	
		WO 9426297 A1	24-11-1994	
		US 5047324	A	10-09-1991
AU 8200987 A	09-06-1988			
CA 1302251 A1	02-06-1992			
DK 643587 A	10-05-1988			
EP 0270930 A2	15-06-1988			
IL 84108 A	29-03-1992			
NO 874938 A	10-06-1988			
IE 333287 L	09-06-1988			
JP 63198871 A	17-08-1988			
ZA 8708431 A	05-05-1988			

フロントページの続き

(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 アンドレス, ヘルベルト
 ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 8 2 3 7 7 カペレンヴィーゼ 3 9

(72)発明者 ドニー, フレーデリック
 ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 8 2 3 7 7 イン デル アウ 1 0

(72)発明者 フォーゲル, ルドルフ
 ドイツ連邦共和国 ワイルハイム 8 2 3 6 2 アム エーゼルスベルク 7

(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 8 2 3 6 2 ウルメンシュトラッセ 2 8

(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

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004510162A5	公开(公告)日	2005-03-03
申请号	JP2002530645	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	ヘスエーファ アンドレスヘルベルト ドニーフレデリック フォーゲルルドルフ ヨーゼルハンスペーター 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	ヘス,エーファ アンドレス,ヘルベルト ドニー,フレデリック フォーゲル,ルドルフ ヨーゼル,ハンス-ペーター 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	A61K47/48 C07K1/107 G01N30/88 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	C07K1/1077 A61K47/643 A61K47/6889 G01N33/5306 G01N33/531 G01N33/68 G01N33/6845 Y10S435/961 Y10S435/962		
FI分类号	G01N33/531.A G01N30/88.J G01N33/566		
优先权	10048417 2000-09-29 DE 2001107491 2001-03-29 EP		
其他公开文献	JP3836429B2 JP2004510162A		

摘要(译)

本发明涉及由具有50至5000个氨基酸的多肽和亲水性接头分子组成的缀合物，所述接头具有1至15kD和4至60个带电残基的分子量，其特征在于所述缀合物包含至少一个预选量的均匀化学计量的多肽 - 接头产物。