

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3836429号  
(P3836429)

(45) 発行日 平成18年10月25日(2006.10.25)

(24) 登録日 平成18年8月4日(2006.8.4)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 A
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 J
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566

請求項の数 7 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2002-530645 (P2002-530645)	(73) 特許権者	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
(65) 公表番号	特表2004-510162 (P2004-510162A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成16年4月2日(2004.4.2)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/011101		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開番号	W02002/027317		グレンツアーヘルストラツセ124
(87) 国際公開日	平成14年4月4日(2002.4.4)	(74) 代理人	100095832
審査請求日	平成15年4月9日(2003.4.9)		弁理士 細田 芳徳
(31) 優先権主張番号	100 48 417.4	(72) 発明者	ヘス, エーファ
(32) 優先日	平成12年9月29日(2000.9.29)		ドイツ連邦共和国 ミュンヒェン 814
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		76 ツィツェルスベルガーシュトラーセ
(31) 優先権主張番号	01107491.1		13アー
(32) 優先日	平成13年3月29日(2001.3.29)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)		
前置審査			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) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

結合体が 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、リンカーが 1 kD ~ 15 kD の分子量、4 ~ 60 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-リンカー産物をクロマトグラフィーによって分画し、ここで、該クロマトグラフィーによる分画が、見かけ分子量の違いに基づいて又は荷電における差異に基づいてなされるものである、  
 c) 化学量論が均一である生体分子-リンカー産物を含んでなる画分を収集する、  
 ことに特徴を有する、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-リンカー産物を含んでなる結合体の生成のための方法。

【請求項2】

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記載の方法。

【請求項3】

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または2記載の方法。

【請求項4】

請求項1 ~ 3 いずれかの方法に従って生成された結合体。

【請求項5】

緩衝成分、安定化剤、および請求項1 ~ 3 いずれかの方法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6】

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5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。

【請求項7】

免疫アッセイにおける、請求項1～3いずれかの方法に従って生成された結合体または請求項5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 kDから500kDの分子量の生体分子ならびに1から15kD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、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むことを特徴とする結合体に関する。

10

【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、特に薬剤の感染モニ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。

20

【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。

30

【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)。

【0006】

しかしながら、従来は、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。

40

【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。

【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

50

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-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-分子を有する生体分子)、1:3の化学量論およびさらに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。

10

**【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。

**【0011】**

W096/03423およびW096/03651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=キログルトン)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。W096/03423およびW096/03657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。

30

**【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、-NH<sub>2</sub>または-COO<sup>-</sup>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<sup>1</sup>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)。

**【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。

40

**【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。

**【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がより再現可

50

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。

【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500kD の分子量の生体分子および1 kDから15kD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。

10

【0019】

本発明はまた、5 kDから500kD の分子量の生体分子かつ1から15kD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。

20

【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む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500kD の分子量の生体分子かつ、1 kDから15kD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、

30

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。

【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。

40

【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10kD～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15kD～400kD の範囲、最も好ましくは20kD～200kD の範囲の分子量を有する。

【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

50

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~15kD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。

20

【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。

【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。

30

【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。

【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C<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>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

50

## 【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<sub>n</sub>) 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)。

## 【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。

10

## 【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はマーカーク基である。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 研究所テクニックに活用される。Xがマーカーク基である場合、10倍まで、好ましくは4倍まで存在する。また、好ましいマーカーク基は2倍または1倍存在する。

20

## 【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。

30

## 【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。

## 【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。

40

## 【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。

## 【0041】

分枝リンカーは、いくつかのマーカーク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 (マーカーク) 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ーク基の導入を引き起こす。好ましいリンカー (マーカーク) 構造は、2または4個のマーカーク基を有する。

## 【0042】

50

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、 $\text{NH}_3^+$  または  $\text{CO}_2^-$  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、 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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。

40

#### 【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ース基をすでに有している。マーカース基の例としては、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、マーカース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（マーカース）を書き込むこと(write)によりさらに示されている。

#### 【0048】

マーカース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ース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。

50

## 【0049】

好ましくは、マーカー基（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、マーカー基は5000D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、3000D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体から選択され得る。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、C E D I A（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0 061 888号明細書）に使用される酵素、および放射性同位体がある。

## 【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(destheiotin)/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。

## 【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。

## 【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。

## 【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)<sub>3</sub>-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

10

20

30

40

50

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。

10

【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 ; -NH<sub>2</sub> ; -COO<sup>-</sup> ; -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：

20

【数1】

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

【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 ( fraction ) 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 = Euler 数、かつ r ! は r の階乗 ( faculty ) ( 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。

30

【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 ( immunological ) 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、MALDI-TOF（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。

40

【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

50

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、-NH<sub>2</sub>または-COO<sup>-</sup>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。

10

【0064】

生体分子のアミノ基(リジン側鎖の末端-NH<sub>2</sub>基またはNH<sub>2</sub>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基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。

【0065】

生体分子上のカルボキシ基(末端COO<sup>-</sup>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)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)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。

40

【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。

【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

50

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1～15kDの分子量を有しているが、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')<sub>2</sub>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

50

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、5kD~500kD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1kD~15kDの分子量、4~60個の荷電した残基を有し、

- 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。

10

【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.D ent, 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。

【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。

40

【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、5kD~500kD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1~15kDおよび4~60個の荷電した残基を有する)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。

50

## 【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。

10

## 【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。

20

## 【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。

30

## 【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。

40

## 【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。

## 【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

50

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。

【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。

10

【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。

【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。

40

【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、10mM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ションによって停止した。

【0103】

50

遊離未結合誘導試薬を、pH 7.5にて50mMリン酸、150mM 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 で）によって完全に除去した。

【0104】

図1における0-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NH<sub>2</sub>-基と反応する。生じた粗結合体を、pH6.5にて0.05mmol/lリン酸ナトリウム、0.05mmol/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法（electrospray-ionization mass-spectroscopy）（ESI-MS）によって分析した。このような分析

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

【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

40

【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

50

、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。

## 【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。

## 【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 <sub>3</sub> H)-OH

## 【0110】

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 mol/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。

10

## 【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 (ピピリジル) 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。

20

## 【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 (W096/03409 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、20 ml のトリフルオロ酢酸、0.5 ml のエタンジオール、1 ml のチオアニゾール、1.5 g のフェノールおよび 1 ml 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。300 ml 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 °C 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浄し、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-PAK PR C18 カラム (50 x 300 mm、100 μm ; 15 μm) 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。

30

## 【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)。

40

## 【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、

50

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】

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) <sub>25</sub> K	3	5802	約 50 kD
3	BPRu (UE) <sub>50</sub> K	3	10807	約 70 kD
4	BPRu (UE) <sub>25</sub> -K-MH	[3]	5996	約 50 kD
5	BPRu (UE) <sub>25</sub> -K-DSS	[3]	6056	約 50 kD
6	BPRu (UE) <sub>50</sub> -K-MH	[3]	11001	約 70 kD
7	BPRu-SK (2) 荷電	4	3004	約 18 kD
8	BPRu (UE) <sub>25</sub> -K-MH 分枝	5	8010	約 70 kD
9	BPRu (UE) <sub>25</sub> -K-DSS 分枝	5	8072	約 70 kD
10	BPRu-SK (2) 非荷電	6	3392	3, 5 kD
11	BPRu (UE) <sub>25</sub> -K-MH	[7]	5570	約 50 kD
12	BPRu (UE) <sub>25</sub> -K-DSS	[7]	5630	約 50 kD
13	BPRu (SK) <sub>4</sub> -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-hydroxysuccinimidy!suberate)

Bi ビオチン

[ ] 図 [ ] に示される基本構造

【0120】

図9は、BSA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3,500Dの分子量で移動するが、荷電したリンカーは、約18,000D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。5,802の分子量を有する構造2（BPRu-(UE)<sub>25</sub>）は、例えば、約50,000Dの見かけ分子量で移動する。

【0121】

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、0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH7.0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（DMSOに溶解される）と混合し、25℃にて16時間攪拌する。この調製物を、RPC18カラム（上記参照）を使用して分離用HPLC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。

【0122】

実施例3：新規ウシアルブミンリンカー結合体

W096/03652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

10

20

30

40

50

一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 (MHS) 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 (MPS) 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 $\alpha$ -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 $\text{NH}_2$ 基は、修飾されていないか、またはMHS基を所有するか、またはMHS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、0.1mmol/lのリン酸カリウム緩衝液pH7.5に10mg/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、Source15Q (登録商標) またはMonoQ (登録商標) カラムを使用することによって達成する。

#### 【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、MonoQ (登録商標) クロマトグラフィーを用いて分画した。溶出を、20mMリン酸カリウム緩衝液 (pH6.5) (= 溶出液A) から20mMリン酸カリウム緩衝液 (pH6.5) 中に1M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280nm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。

#### 【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、Source15Q (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、20mMリン酸カリウム緩衝液 (pH6.5) (= 溶出液A) から20mMリン酸カリウム緩衝液 (pH6.5) 中に1M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280nm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。

#### 【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、 $\text{F}(\text{ab}')_2$  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 $\text{F}(\text{ab}')_2$  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。

#### 【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。

10

20

30

40

50

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

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')<sub>2</sub> 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、20mg/ml の濃度を得るようにH<sub>2</sub>O を用いて還元した。20 μl の1Mクエン酸塩pH3.5 を溶液1ml あたりに添加した (クエン酸塩の最終濃度 = 20mM)。pHをHCl を用いて3.60に調節した。0.45 μm フィルターを通して濾過した。この濃度をOD280nm で測定した (10D280nm = 1.4mg/ml)。20 mMクエン酸塩pH3.60を用いて10mg/ml に調整した。この溶液を37 °Cまで水浴で加熱した。100 μl のペプシン溶液 (3mg/ml) を抗体溶液1ml 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。

【0131】

2.2. Fab'への還元

52.6 μl の0.1Mジチオトレイトール (DTT) を切断混合物1ml 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、0.1MのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH pH6.5、30mMのNaCl、2mM のEDTAに対して透析した。

【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、3.9mg/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 ~ 3倍に濃縮し、Superdex 200 HR (登録商標) (緩衝液 : 25mMのMOPS/NaOH pH6.5、50mM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。

【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)<sub>25</sub> 結合体の生成

1. F(ab')<sub>2</sub> 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')<sub>2</sub>-溶液を、pH7.5の50mMのリン酸カリウム、150mMの塩化ナトリウム緩衝液に対して透析する。

【0136】

5mg/mlのF(ab')<sub>2</sub>-フラグメントを含むF(ab')<sub>2</sub>-溶液にシステアミンを最終濃度25mM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、50mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム緩衝液を含むpH6.0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。

【0137】

10

20

30

40

50

## 2. Fab'-フラグメントのルテニウム化

リンカー-BPRu-(UE)<sub>25</sub>-MHを、25mg/ml の濃度でDMSOに溶解する。Fab'-フラグメント対 BPRu-(UE)<sub>25</sub>-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-マレイニミドを5mM で添加し、55 にて60分間インキュベートする。

【 0 1 3 8 】

## 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 )。

【 0 1 3 9 】

実施例 6 : F(ab')<sub>2</sub>-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')<sub>2</sub> 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')<sub>2</sub> 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')<sub>2</sub>-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。

【 0 1 4 0 】

#### 1. 2. F(ab')<sub>2</sub>-BPRu-(UE)<sub>25</sub>-DSS の合成

結合体化を、BPRu-(UE)<sub>25</sub>-DSS の活性基 ( DSS 基を所有する図 3 のリンカー ) をF(ab')<sub>2</sub>-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')<sub>2</sub>-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。

【 0 1 4 1 】

#### 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。

【 0 1 4 2 】

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。

【 0 1 4 3 】

### 2. 手法

#### 2. 1. IgG の F(ab')<sub>2</sub> への切断

Mab<p24>M-6D9- F(ab')<sub>2</sub>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H<sub>2</sub>O 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。

【 0 1 4 4 】

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

記載するように生成したF(ab')<sub>2</sub>-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	10mMリン酸ナトリウム (pH7.5 に調整した緩衝液) 30mM塩化ナトリウム
フッ化物	10ml/cm <sup>2</sup> /h
サンプル体積	カラム体積の1.5 %
サンプル濃度	20mg/ml
溶出液光度計のモニタリング	280nm

F(ab')<sub>2</sub>-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。

10

## 【 0 1 4 5 】

2 . 3 . BPRu-(UE)<sub>25</sub>-DSS を用いるF(ab')<sub>2</sub>-フラグメントの標識化  
BPRu-(UE)<sub>25</sub>-DSS を、5mg/mlでDMSOに溶解する。カップリング化学量論を、  
1 : 5 ( mol/mol ) = F(ab')<sub>2</sub>-フラグメント : リンカー  
で選択する。

## 【 0 1 4 6 】

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10mMの最終濃度でリジンを添加して停止する。

## 【 0 1 4 7 】

2 . 4 . BPRu-UEEK-DSS を用いるF(ab')<sub>2</sub>-フラグメントのカップリング  
リンカー ( 標識 ) BPRu-UEEK-DSS を5mg/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(ab')<sub>2</sub>-フラグメント : BPRu-UEEK-DSS  
である。

20

## 【 0 1 4 8 】

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10mMの最終濃度でリジンを添加して停止する。

## 【 0 1 4 9 】

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(ab')<sub>2</sub> 結合体のクロマトグラフィーを、pH7.5 に調整した100mM Hepes 緩衝液 ( 1mM EDTAおよび5 % DMSO を含む ) 中で実施する。流速を、5ml/cm<sup>2</sup>/h に設定する。検出を280nm で実施する。サンプル体積は、カラム体積の1.5 %である。

30

## 【 0 1 5 0 】

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)<sub>25</sub>-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。

40

## 【 0 1 5 1 】

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

例えば、HIV 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 ( HIV 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シンに対するBPRu標識抗体と共にインキュベートする。サンプル中の抗HIV 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、ジゴキシシン化 ( digoxinylated ) 抗原およびジゴキシ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HIV 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。

50

## 【 0 1 5 2 】

このモデル系において、HIV1のgp41領域由来のN末端標識HIV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、W096/03423に記載される。両抗原を20ng/ml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DIGのFab'-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】

10

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】

20

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（Fab'対リンカー）のモル比を使用して欧州特許第720 614号に従って生成している。使用したリンカーは、KEEU-BPRuであった。

30

## 【 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（(UE)<sub>25</sub>および活性化MH）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。

40

## 【 0 1 5 9 】

実施例8：ビオチン化リンカー（Bi-(UE)<sub>25</sub>-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150kDのMW）を、結合体化のために使用している。（Bi-(UE)<sub>25</sub>-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。

## 【 0 1 6 0 】

結合体化の方式

DMSOに15mg/mlの濃度で溶解したBi-(UE)<sub>25</sub>-DSSを、MAB<フェリチン>M-4.184の精製

50

IgG (pH8.5 の100mM リン酸カリウム緩衝液中10mg/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10mMの最終濃度までリジンを添加して停止する。

【0161】

反応産物を、pH7.5 の20mM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)<sub>25</sub>-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20mMリン酸カリウム(pH6.5)、緩衝液(B)として1M NaClを含む20mMリン酸カリウム(pH6.5)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。

10

【0163】

参考文献の一覧

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

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

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

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

20

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

Tijssen 「Methods in Enzymology」(1992) Academic Press

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/EP95/02921

欧州特許第0 061 888 号

米国特許第5,958,783 号

WO 96/03409

WO 96/03423

30

WO 96/03651

WO 96/03652

WO 96/03657

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、カップリングBSA およびhy-BPRu-リンカーの模式図である。BSAに関する模式図は、いくつかの-NH<sub>2</sub>基がhy BPRu-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、BSA-hy-BPRu-結合体のSuperdex200 HR(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。

40

【図3】 図3は、BPRu-(UE)<sub>25</sub>K およびBPRu-(UE)<sub>50</sub>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(UE)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。

【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18kDと比

50

べて約3,5kD 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 (Bi-) リンカー分子がC-末端に-MH および-DSS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。

【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 (BPRu) 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Superdex 200 HR (登録商標) クロマトグラフィーを示す図である。BSA 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。

【図10】 図10は、粗BSA-Ru(SK)<sub>4</sub>-MH結合体のMonoQ (登録商標) クロマトグラフである。クロマトグラフは、BSA (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BSA-Ru(UE)<sub>25</sub>-MH 結合体のSource15Q (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BSA (1) とはっきり分離される。

【図12】 図12は、第一のFab'-Ru(UE)<sub>25</sub>-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)<sub>25</sub>-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- 20) 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)<sub>25</sub>-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')<sub>2</sub>-BPRu-(UE)<sub>25</sub>-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 30。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')<sub>2</sub>-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)<sub>25</sub>-DSS) カップリング産物の精製を示す図である。粗結合体は、Source30 (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 40 (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。

10

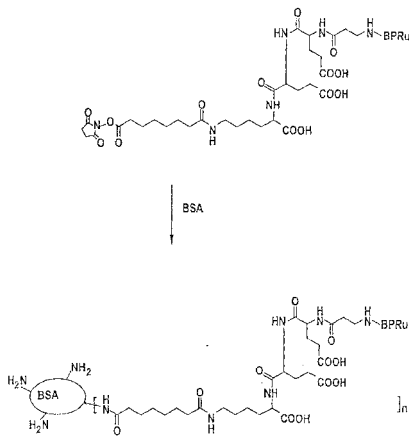
20

30

40

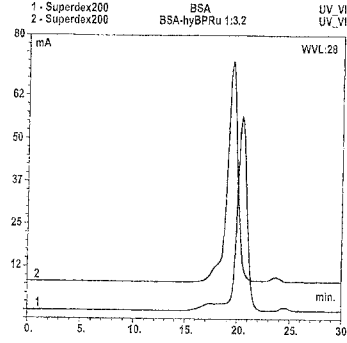
【 図 1 】

図 1: BSA および hy-BPRu へのその結合の模式図



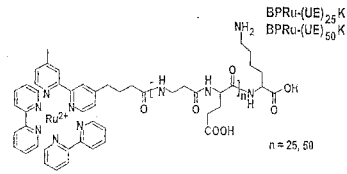
【 図 2 】

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



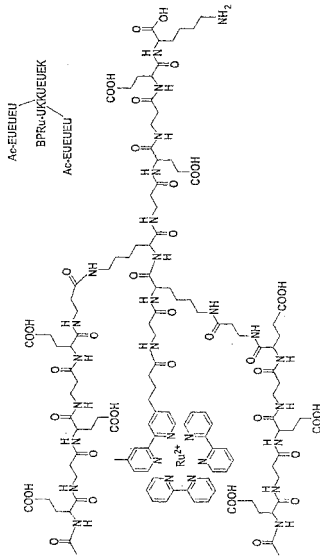
【 図 3 】

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



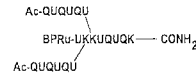
【 図 4 】

図 4: 短い骨格鎖を有する分枝リンカー



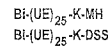
【 図 6 】

図 6: 荷電残基を有さない分枝リンカーの模式図



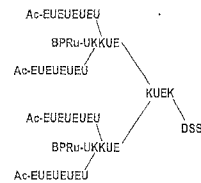
【 図 7 】

図 7: ビオチン化リンカー分子の模式図



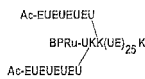
【 図 8 】

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



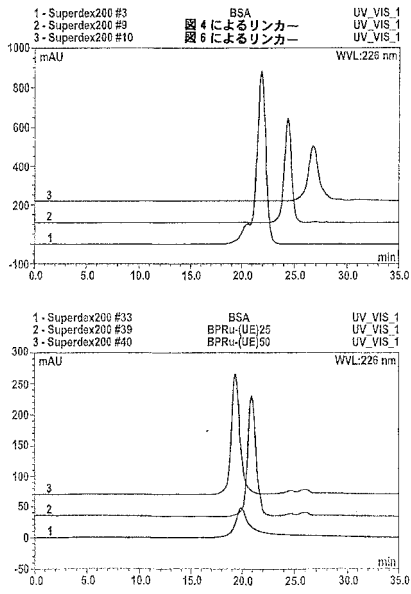
【 図 5 】

図 5: 長い骨格鎖を有する分枝リンカー



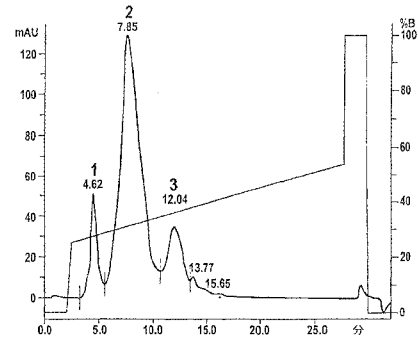
【 図 9 】

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



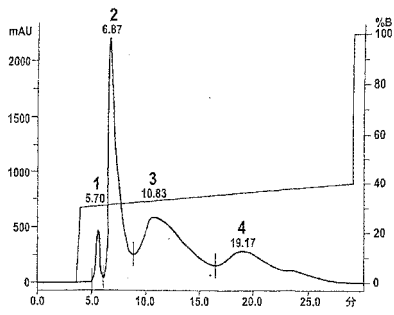
【 図 10 】

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



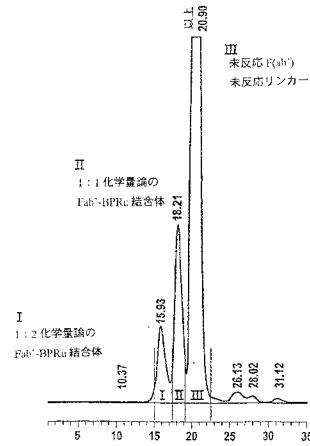
【 図 11 】

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



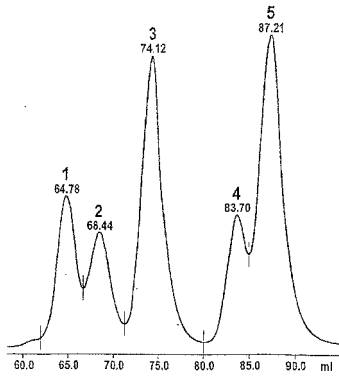
【 図 12 】

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



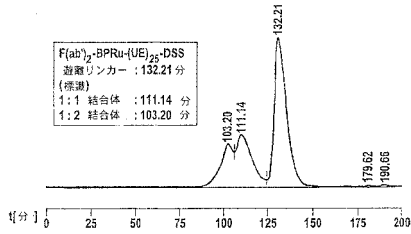
【 図 1 3 】

図 13: 第二の F(ab')<sub>2</sub>-(UE)<sub>25</sub> カップリング産物の Superdex200HR (登録商標) 10/30 クロマトグラフ



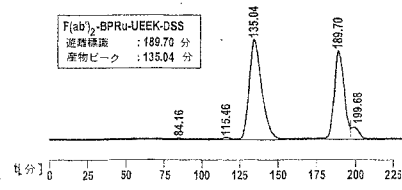
【 図 1 4 】

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



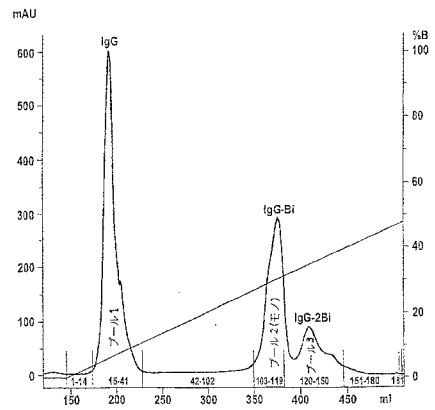
【 図 1 5 】

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



【 図 1 6 】

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



## フロントページの続き

- (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 - ベーター  
ドイツ連邦共和国 ワイルハイム 8 2 3 6 2 ウルメンシュトラーセ 2 8
- (72)発明者 ヘルマン, ルーベルト  
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 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

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 特開平09 - 325142 (JP, A)  
特表平08 - 509995 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/53-579

专利名称(译)	共轭的定义化学计量		
公开(公告)号	<a href="#">JP3836429B2</a>	公开(公告)日	2006-10-25
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		
当前申请(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	G01N33/531 G01N30/88 G01N33/566 A61K47/48 C07K1/107 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/533 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	JP2004510162A5 JP2004510162A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明中，生物分子的化学计量是均匀 - 对接头缀合物的生成处理。特别是，它是由与来自生物分子电荷的残基和从分子量为5kD的，至少一种生物分子的接头产品的第一分子量60 500kD的15kD和4的化学计量是均匀的亲水性的接头分子在预先选定的数量。

(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