

CH 677 363 A5



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

11 CH 677 363 A5

51 Int. Cl.⁵: **C 07 K** **17/08**
C 08 F **8/00**

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

12 PATENTSCHRIFT A5

21 Gesuchsnummer: 4207/88

22 Anmeldungsdatum: 14.11.1988

30 Priorität(en): 14.11.1987 DE 3738721

24 Patent erteilt: 15.05.1991

45 Patentschrift
veröffentlicht: 15.05.1991

73 Inhaber:
Röhm GmbH, Darmstadt (DE)

72 Erfinder:
Solomon, Beka, Dr., Herzliya Bituach (IL)
Hadas, Eran, Dr., Rishon LeZion (IL)
Fleminger, Gideon, Dr., Rehovot (IL)

74 Vertreter:
Bovard AG, Bern 25

54 Verfahren zur Herstellung immobilisierter Antikörper.

57 Es werden immobilisierte, mittels ihrer modifizierten Kohlehydratregion kovalent an ein Matrix-Polymer gebundene Antikörper hergestellt. Die Bindung des Antikörpers wird bewirkt durch die Kondensation zwischen mindestens einer Aldehydgruppe der oxidierten Kohlehydratregion und mindestens einer Epoxyfunktion eines epoxygruppentragenden Matrixpolymerisats (MP) mittels eines bifunktionellen Reagenzes (BR), das an der einen Endposition einer mindestens dreigliedrigen abstandhaltenden Einheit eine zur Kondensation mit der Aldehydgruppe befähigte Aminogruppe und an der anderen Endposition eine kovalent mit der Epoxyfunktion reagierende Gruppe trägt.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung immobilisierter Antikörper. Oligosaccharidhaltige Antikörper werden mittels oxidativer Modifizierung der Carbohydrat-Region der Antikörper an ein Matrix-Polymer gebunden.

Die Fixierung biologisch aktiver Substanzen an Trägern gehört zu den Standardverfahren in Forschung und Technik der Biochemie. Dabei sind – in Abhängigkeit von der chemischen Natur der zu fixierenden Substanzen und dem Zweck der Anbindung – verschiedene Methoden entwickelt worden (vgl. z.B. K. Buchholz «Characterization of Immobilized Biocatalysts, Dechema Monographs, Volume 84, No. 1724–1731, Verlag Chemie 1979)

Von großer praktischer Bedeutung als Trägermaterialien waren von Anfang an Polysaccharide wie Cellulose, Stärke, Dextran, die gewöhnlich zur Aktivierung chemisch modifiziert werden. Zahlreiche Modifizierungsmethoden sind vorgeschlagen worden, darunter auch die Aktivierung von Stärke durch Oxidation mit Periodat [Vgl. L. Goldstein, M. Pecht, S. Blumberg, D. Atlas, Y. Levin, Biochemistry 9 (1979) 2322] unter Bildung von Formylgruppen unter Spaltung des Hemiacetal-Rings.

Die Kopplung über die Kohlehydratanteile von Zellmembranen wurde z.B. bei roten Blutkörperchen durch Oxidation mit Periodat erreicht. Die so gebildeten reaktiven Aldehydgruppen kuppeln mit den Seitenketten-Aminogruppen von Proteinen. [Vgl. C.I. Sanderson, D.V. Wilson, Immunochemistry 1971 (8) 163] Periodat-Oxidation von Antikörpern wurde auch zur Konjugation von Antikörpern mit Enzym-Markern benutzt (vgl. A.G. Gaivoronskaya et al. Chem. Abstr. 95, 130 787). Ähnlich werden in der EP-A 0 175 617 aus Antikörpern und therapeutischen Wirkstoffen gebildete Konjugate vorgeschlagen, die gegen ein Target-Antigen gerichtet sind.

Die US-A 4 671 958 beinhaltet ein Verfahren zur kovalenten Anbindung von «Linker»-Gruppen an spezifische Stellen von Antikörper-Molekülen, die gegen beliebige Ziel-Antigene eingesetzt werden können.

Die EP-A 0 088 695 beschreibt mehrere Methoden zur kovalenten Bindung von löslichen oder unlöslichen Konjugat-Partnern, wie chemischen Stoffen, Trägern u.ä. an Antikörper. Die gebildeten Konjugate sind interessant im Hinblick auf Affinitäts-Trenn- und Reinigungsverfahren, sowie für diagnostische und therapeutische Anwendungen. Die Anbindung kann u.a. über den Kohlehydrat-Anteil der Antikörper erfolgen. Beispielsweise wird für Immunoassays monoklonales IgM mit Galactose-Oxidase und Katalase oxidiert und dann mit Phenylhydrazin-Glycyl-glycylarginyl-7-amino-4-methyl-cumarin kondensiert. [Vgl. auch J.D. Rodwell et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 2632–36 (1986)/Immunology].

Auch M.M.Chua et al. [Biochem. Biophys. Acta. 800 (3) 291 (1984)] erreichen Anbindung von Immunglobulin an liposomale Membrane durch milde Oxidation (mit Periodat oder Galactose-Oxidase) von Kohlehydrat-Gruppen in der konstanten Region der schweren Kette des Immunglobulins, zu Aldehydfunktionen, die dann mit Hydrazidgruppen reagieren können, die an der Membranoberfläche der Liposomen fixiert sind.

Von D.J. O'Shannessy et al. wird ebenfalls die spezifische Konjugation sowohl polyclonaler als monoklonaler Antikörper mittels ihrer Kohlehydrat-Bereiche vorgeschlagen, wobei zunächst durch milde Oxidation Aldehydgruppen gebildet und diese mit Hydrazin-Derivaten des Biotins, geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme in stabile Antikörper-Konjugate überführt werden können, welche die volle immunologische Aktivität bewahrt haben. Auch die Möglichkeit der Fixierung an Hydrazin-modifizierte feste Träger wird erwähnt. Als Träger für Immunaффinitätschromatographie wird z.B. (käufliches) Agarose-Adipinsäurehydrazid angewendet. [Vgl. J. Appl. Biochem. 7, 347–355 (1985)]. Im weiteren bedienen sich O'Shannessy und W.L. Hoffmann der schwach säurekatalysierten Kondensation von oxidativ gebildeten Aldehydgruppen an den Oligosaccharid-Seitenketten von Glykoproteinen mit Hydrazin-funktionalisierter Agarose, die durch Umsetzung von käuflicher, aktivierte Estergruppen-enthaltender Agarose mit Hydrazinhydrat hergestellt worden war. [Vgl. Biological Chemistry Hoppe-Seyler Vol. 368 (7) 767, 768 (1987)]

Die Anwendung von polymergebundenen Antikörpern und Antigenen zum Nachweis der Anwesenheit spezifischer Substanzen ist zum vielbenutzten biochemisch-analytischen Werkzeug geworden. (Vgl. Encyclopedia of Polymer Science und Technology, Vol. 2, J. Wiley 1985, pp. 55–59) Hervorzuheben ist die Verwendung zum Nachweis spezieller Hormone, Blutbestandteile, normaler und anormaler Zell-Typen, Krankheitserregern bis hin zu Molekülen, die indikativ sind für das Vorliegen maligner Tumore. Darüber hinaus finden monoklonale Antikörper auch Anwendung in der Therapie. So besteht z.B. eine Chance, lethalwirksame Agentien z.B. Wirkstoffe oder Radioisotope an krebsspezifische Antikörper anzubinden, mit dem Ziel, daß dieser Komplex sich seine Target-Zelle aussucht und daran bindet und diese schließlich zerstört ohne die Umgebung nachhaltig zu schädigen.

Beim Umgang mit Antikörpern muß davon ausgegangen werden, daß diese sowohl hinsichtlich des pH-Werts als auch hinsichtlich der Ionenstärke des sie umgebenden Mediums begrenzte Stabilität zeigen. Verständlicherweise ist auch eine chemische Modifikation von Antikörpern zum Zweck der kovalenten Fixierung beispielsweise an Trägermaterialien nicht unproblematisch, da zumindest die Bindungskapazität für das Antigen nicht beeinträchtigt werden darf. Nicht zu Unrecht wird darauf hingewiesen, daß konventionelle Methoden der Immobilisierung von Antikörpern auf festen Trägern mittels Bromcyan, 1,1-Carbonyldiimidazol, Periodatoxidation sowie mittels der Epoxidchemie potentiell zur Bindung über nukleo-

phil aktive Gruppen wie z.B. Amino-, Thio- oder Hydroxy-Gruppen, nahe der Antigen-Binding-Site führen und damit das Bindevermögen beeinträchtigen können. [Vgl. K. Yim, Biological Chemistry, Hoppe-Seyler Vol. 386 (7) 785 (1987)]. In der Literatur wird zu Recht betont, daß die Zusammensetzung des polymeren Trägers über dessen Eigenschaften und Eignung als Träger entscheidet (K. Buchholz Ed., in Characterization of Immobilized Biocatalysts loc. cit. S. 64). Den Vorschlägen in der Literatur zu Folge herrscht eine außerordentlich reichhaltige Auswahl an potentiellen Trägermaterialien, die sowohl aus im wesentlichen anorganischem Material, modifizierten Naturstoffen oder synthetischen organischen Polymeren bestehen können. Bei Yim (loc. cit) findet die Bindung der Antikörper durch kovalente Bindung mittels Thiosemicarbazid an Silikagel statt.

Angesichts der Rolle, die trägergebundene Antikörper in Biochemie und Medizin bereits spielen, bestand Bedarf an optimierten Trägersystemen auf Basis polymerer Träger, wobei einerseits die Wirksamkeit der trägergebundenen Antikörper so wenig wie möglich beeinträchtigt, andererseits das Trägersystem in bezug auf Stabilität, Anwendungsbreite und Effizienz optimiert sein sollte.

Es wurde gefunden, daß die Forderungen der Technik durch die erfindungsgemäße Immobilisierung an spezifische polymere Träger in besonderem Maße erfüllt werden. Die Erfindung betrifft das im Anspruch 1 definierte Verfahren zur Herstellung immobilisierter, mittels ihrer modifizierten Kohlehydrat-Region kovalent an ein Matrix-Polymer gebundener Antikörper. Die Bindung des Antikörpers wird bewirkt durch die Kondensation zwischen mindestens einer Aldehydgruppe der oxidierten Kohlehydratregion und mindestens einer Epoxyfunktion eines reaktionsfähigen epoxygruppentragenden Matrixpolymerisats (MP) mittels eines bifunktionellen Reagenzes (BR), das an der einen Endposition einer mindestens dreigliedrigen, abstandhaltenden Einheit eine zur Kondensation mit der Aldehydgruppe befähigte Amino-Gruppe und an der anderen Endposition eine kovalent mit der Epoxyfunktion reagierende Gruppe trägt.

Das Matrixpolymerisat MP

Insbesondere handelt es sich bei dem Matrixpolymerisat (MP) um ein vernetztes Copolymerisat aus Acrylamid bzw. Methacrylamid und Glycidylacrylat bzw. -methacrylat, das vorzugsweise aus perlförmigen Partikeln besteht. Derartige Matrixpolymerisate werden in der DE-C 2 722 751 bzw. US-A 4 190 713 sowie der US-A 4 511 694 beschrieben. Die Perlen besitzen in der Regel einen Durchmesser von 5–1000 µm, insbesondere 30–1000 µm und weisen einen inneren Hohlraum (Hohlperlen) auf. Als Anhalt für den Gehalt an Glycidylgruppen im Matrixpolymerisat MP, die zur Reaktion gebracht werden können, sei ein Wert von 0,8–2,5 µ Mol pro mg trockenes Trägermaterial genannt. Weitere Kenndaten für ein handelsübliches Matrixpolymerisat (EUPERGIT C der Röhm GmbH), das für Matrixpolymerisate MP des angegebenen Typs repräsentativ ist, lassen sich der folgenden Tabelle entnehmen.

Kenndaten	Dimension
– Mittlere Korngröße:	140–180 µm
– Porendurchmesser:	40 nm
– Ausschlussgrenze = M_{LM} :	$2 \cdot 10^5$ Daltons
– Bindungsaktive Oberfläche:	180 m ² /g (trocken)
– Epoxidgehalt:	800–1000 mmol/g (trocken)
– Wasseraufnahme:	2,3 ml/g (trocken)
– Dichte = d_4^{20} :	1,20
– Schüttdichte:	0,34 g/ml
– Bindungskapazität: (bei üblichen Bedingungen)	
Humanalbumin:	48 mg/g (feucht)
Human IgG:	34 mg/g (feucht)
– Quellverhalten gegenüber Wasser:	1:1,4
	1 ml (trocken) ergibt 1,4 ml (feucht)
– Löslichkeit (in Wasser, Puffern und organischen Lösungsmitteln):	unlöslich
– Druckstabilität:	300 bar

Unter dem Elektronenmikroskop erkennt man die makroporöse Struktur der Perlen mit Kanälen und Hohlräumen, die einen Durchmesser von 0,1–2,5 µm (1000–25 000 Å) besitzen, so daß Enzym- bzw. Substratmoleküle mit einer Größe von 10–100 Å das gesamte Innere der makroporösen Matrix erreichen können.

– Site-Spezifische Modifikation der Antikörper

Grundsätzlich sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung alle Antikörper geeignet, die, wie bekannt, einen Gehalt an Kohlehydratgruppen aufweisen und die der chemischen Modifikation und anschließenden Fixierung zugänglich sind. Als Anhaltspunkt kann von einem Gehalt von ca. 3% Kohlehydratanteil bei den Antikörpern ausgegangen werden. Im Mittelpunkt des Interesses stehen monoklonale Antikörper. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern sind hinreichend bekannt. [Vgl. Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd. Ed. Vol. 23, J.Wiley (1983), pp. 637 bis 643; D. Baran, U. Hartlaub, Humane Molekulare Antikörper, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1987].

Dabei kann im einzelnen wie folgt vorgegangen werden:

Die beispielsweise durch positive Reinigungsverfahren wie Affinitätschromatographie oder durch negative Reinigungsverfahren (Eliminierung des Überschusses an anderen Zellen) wie z.B. Panning, Komplement-Lyse und E-Rosettierung gereinigten Lymphocyten bzw. monoklonalen Antikörper werden vorzugsweise vor der Oxidation dialysiert, beispielsweise mit einem geeigneten, verträglichen Puffer, im pH-Bereich um 5,5. Die Oxidation des Kohlehydrat-Anteils zu Formylgruppen kann in an sich bekannter Weise chemisch mittels Periodat-Oxidation, oder – weniger bevorzugt – enzymatisch mittels der Enzyme Galactose-Oxidase und Katalase vorgenommen werden.

Durch Arbeiten bei relativ niedrigem pH, vorzugsweise im Bereich um 5,5 wird die Gefahr der internen Vernetzung der Antikörper gemindert bis ausgeschlossen. Eine bevorzugte Oxidationsmethode besteht in der Oxidation mit Natriumperiodat, vorzugsweise 0,1 molar in geeigneter, inerter Pufferlösung, zweckmäßig im pH-Bereich 5,5, beispielsweise in 0,1 M Acetatpuffer. Vorzugsweise erfolgt die Reaktion bei relativ niedriger Temperatur, etwa 0–5 Grad C und im Dunkeln.

Die Oxidation, die größenordnungsmäßig gewöhnlich innerhalb einer Stunde abgeschlossen werden kann, wird abgestoppt, beispielsweise durch Zugabe kleinerer Mengen von Ethylenglykol. Danach werden die Antikörper zweckmäßig auf einer Säule gelchromatographisch aufbereitet. (Vgl. Ullmann's Encyclopädie der techn. Chemie, 4. Auflage, Bd. 5, Verlag Chemie, S. 167; Gel-Filtration, Theory and Practice, Pharmacia Fine Chemicals 1979, Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg 1979). Dafür eignet sich z.B. ein Dextran-Gel (z.B. das Produkt SEPHADEX G 25 der Pharmacia), vorzugsweise äquilibriert mit einer Pufferlösung im pH-Bereich 5. Die Konzentration der Antikörper kann durch Aufkonzentration, beispielsweise durch Ultrafiltration geschehen. Die Gewinnung der Antikörper liegt gewöhnlich bei > 90%.

– Kopplung der site-spezifisch modifizierten Antikörper an polymeren Träger

Die gewonnenen oxidierten und gereinigten Antikörper werden in einem geeigneten, leicht sauren Medium beispielsweise in Acetatpuffer und im pH-Bereich um 5,5 in Konzentrationen zwischen 60 und 200 µg mit dem hydrazidsubstituierten modifizierten polymeren Träger (HY-MP) in Mengen von 100 mg für einen gewissen Zeitraum, beispielsweise 16 ± 4 Stunden bei herabgesetzter Temperatur, beispielsweise bei 4 Grad C inkubiert. Der Anteil an immobilisiertem Antikörper wird nach der Bradford-Methode; vgl. Analyt. Biochem. 72, 248 (1976), aus der Differenz zwischen dem ursprünglichen und dem verbliebenen Gehalt an Antikörper bestimmt.

Die über Hydrazinderivate gebundenen Antikörper haben – im Vergleich mit den am unmodifizierten polymeren Träger P gebundenen Antikörpern – eine verbesserte Antigen-Bindungskapazität, die sich dem maximalen theoretischen Wert von 2 Mol Antigen pro Mol Antikörper annähert, insbesondere wenn relativ geringe Beladung mit Antikörpern vorliegt.

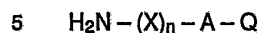
– Modifikation des Matrixpolymerisats MP

Das aus (Meth)acrylamid und Glycidyl(meth)acrylat aufgebaute Matrix-Polymerisat (MP), vorzugsweise aus perlförmigen Partikeln bestehend (s. oben), speziell das Produkt ®EUPERGIT C der Röhm GmbH, Darmstadt wird zweckmäßig in einer geeigneten Pufferlösung im alkalischen Bereich, beispielsweise in einem Phosphatpuffer und bei pH 8,8 für einen gewissen Zeitraum, beispielsweise 16 ± 3 Stunden bei Raumtemperatur mit dem bifunktionellen Reagenz (BR) vorzugsweise ein Bishydrazid einer aliphatischen Dicarbonsäure, insbesondere Adipinsäuredihydrazid behandelt. Vorzugsweise wendet man das bifunktionelle Reagenz (BR) in Mengen von 0,1–10 mol BR pro Gramm polymeren Träger MP, speziell ®EUPERGIT C, Trockengewicht, insbesondere 1 µmol BR pro g Trockengewicht an. Zweckmäßig wäscht man das modifizierte Matrixpolymerisat HY-MP mit Phosphatstandardpuffer (PBS). Es kann vorzugsweise mit Puffer (z.B. 0,1 M Acetatpuffer) pH 5,5 äquilibriert und bei niedriger Temperatur, z.B. bei 4 Grad C gelagert werden.

Das bifunktionelle Reagenz (BR)

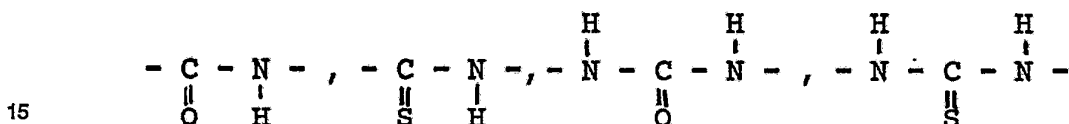
Definitionsgemäß besteht das bifunktionelle Reagenz BR aus einer mindestens dreigliedrigen abstandhaltenden Einheit mit einer die eine Endposition markierenden, zur Kondensation mit der Aldehydgruppe

befähigten Aminogruppe und einer kovalent mit der Epoxyfunktion des Matrixpolymerisats MP reagierenden Gruppe an der anderen Endposition. Vorzugsweise läßt sich das bifunktionelle Reagenz (BR) formelmäßig als:



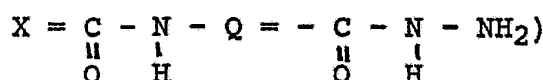
darstellen, wobei A für einen Spacer, vorzugsweise einen Alkyl oder Cycloalkylrest, mit mindestens drei und bis zu 12 Kettengliedern, vorzugsweise $-\text{CH}_2$ -Einheiten, wobei gegebenenfalls eines oder mehrere der Kettenglieder durch Sauerstoff ersetzt sein können, und wobei n für null oder 1, X für einen Rest

10



steht und Q dieselbe Bedeutung wie $-\text{X}-\text{NH}_2$ besitzt oder für $-\text{NH}_2$ stehen kann. Besonders bevorzugt stellt das bifunktionelle Reagenz BR das Bishydrazid einer Dicarbonsäure ($\text{A} = (\text{CH}_2)_{3-6}$;

20



25

dar. Ganz besonders bevorzugt ist das Adipinsäuredihydrazid. Falls BR für einen Alkylendiamin steht ($n = 0$, $\text{A} = (\text{CH}_2)_{3-6}$, $\text{Q} = \text{NH}_2$) wird die Doppelbindung der bei der Kondensation gebildeten Schiff'schen Base vorteilhafterweise reduziert, beispielsweise mit Natriumborhydrid.

30

Bestimmung der Immuno-Kapazität der erfindungsgemäß fixierten Antikörper

Die Bindungskapazität der erfindungsgemäß immobilisierten Antikörper wird bestimmt durch Messung der Antigene insbesondere von Enzymen wie z.B. der Anti-Carboxypeptidase (CPA), die sich an die Antikörper binden. Zu diesem Zweck wird beispielsweise CPA in gleichbleibenden Quantitäten im PBS zu Reagenzgläsern gegeben, die jeweils 100 mg des modifizierten Matrixpolymerisats HY-MP aber mit verschiedenen Beladungen an immobilisierten monoklonalen Antikörpern tragen.

35

Der an die Antikörper des Matrixpolymerisats gebundene CPA-Anteil wurde wie folgt bestimmt:

α) durch Bestimmung der Differenz des jeweiligen Proteingehalts mittels des BRADFORD-Tests und die enzymatische Aktivität, die in der Ausgangslösung und schließlich in der Restlösung vorhanden war, β) durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität des an den HY-MP-Träger-Perlen immobilisierten Enzyms, bei CPA z.B. mit Hilfe der Ninhydrin-Methode. Der am Träger gebundene Anteil an Enzym wurde nach Incubation mit Natriumcarbonat-Puffer mit pH 10,5 eluiert. Nach erfolgter pH-Angleichung wird die Aktivität des eluierten Enzyms, beispielsweise der CPA bestimmt.

40

Die Bestimmung über die Enzymaktivität ist in all den Fällen angebracht, wo Antikörper vorhanden sind, welche die Enzymaktivität nicht beeinträchtigen.

45

Es erweist sich, daß die oxidativ modifizierten Antikörper, die an HY-MP-Träger-Perlen fixiert sind, ihre volle immunologische Aktivität zur Bindung des Enzyms, beispielsweise CPA beibehalten.

50

Das molare Verhältnis von monoklonalem Antikörper zu CPA bewegte sich im Rahmen 2:1 bis 1:1

Vorteilhafte Wirkungen

Wie bereits ausgeführt erstreckt sich die erfindungsgemäße Lehre auf spezifische Konjugate von oligosaccharidhaltigen Antikörpern im allgemeinsten Sinne.

55

Erwähnt seien insbesondere monoklonale Antikörper, die gegen Antigene beispielsweise der folgenden Art gerichtet sind:

60

65

CH 677 363 A5

	Antigen-Klasse	Antigen
5	Bakteriell	Tetanus-Toxoid H. influenza Typ b Polysaccharid Diphtherie-Toxin Chlamydia trachomatis M. leprae Lipopolysaccharid/Endotoxin
10		Pneumokokken LPS von P. aeruginosa Exotoxin von P. aeruginosa Streptokokken Gruppe A Kohlehydrat
15	Viral	X31 Influenza-Virus-Nukleoprotein Masern-Virus HSV Glykoprotein D Masern-Virus, Nukleocapsid
20		Zytomegalie-Virus Influenza A-Viren Röteln-Virus-Antigene HTLV I Varizella-Zoster
25		HBsAg
30	Autoimmun	doppelsträngige DNA Inselzellen (Diabetes mellitus) Myasthenia gravis, Antiidiotypen Thyreotropin-Rezeptor Rheuma-Faktor Acetylcholin-Rezeptor Schilddrüse Sperma
35	Tumor	Mamma-Ca Prostata-Ca Lungen-Ca Magen-Ca
40		Melanom GD2 (humanes Melanom) Gliom Rectum-Ca Leukämie Cervix-Ca
45	Gewebe/Blut	Rhesus D Blutgruppenantigen A HLA-A, B, C, DR Intermediäre Filamente
50	Andere	Malaria Forssman-Antigen Schäfererythrozyten Nitrophenol Dinitrophenol Trinitrophenol Keyhole limpet hemocyanin (KLH) Rheumafaktor
55		Insulin
60		

Die erfindungsgemäße Fixierung bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber dem Stand der Technik, insbesondere bei Anwendung von Dicarbonsäurehydraziden, insbesondere Adipinsäurehydrazid.

Führt man beispielsweise die Kondensation bei einem pH-Wert um 5,5 durch, so verhindert man eine Kondensation der Antikörper-Aminogruppen mit ihren eigenen Aldehydfunktionen.

Die chemische Bindung über das Hydrazid ist wünschenswert stabil und inert. Nichtspezifische Bindung der Antikörper wird minimiert. Eine Blockierung nach der Fixierung der Antikörper erübrigt sich.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

BEISPIELE

Beispiel 1

Kopplung der aldehydgruppenhaltigen monoklonalen Antikörper mit dem modifizierten Matrixpolymerisat HY-MP als Träger.

Modifizierte und oxidierte, monoklonale Antikörper aus Beispiel 2 werden in Konzentrationen, die zwischen 60 und 200 µg variieren, in je 1 ml eines Acetatpuffers mit pH 5,5 mit 400 µl des modifizierten Matrixpolymerisats MP aus Beispiel 3 (100 mg) 16 Stunden bei 4 Grad C inkubiert. Der Anteil an immobilisiertem Antikörper wird nach der BRADFORD-Methode aus der Differenz zwischen der ursprünglichen und der verbleibenden Menge an Antikörpern bestimmt.

Die erfindungsgemäß fixierten Antikörper haben im Vergleich zu direkt über die Oxiranfunktion gebundenen Konjugaten eine höhere Antigen-Bindungs Kapazität (z.B. gegenüber CPA). Sie reicht an den theoretischen Maximalwert von zwei Antigenen pro Mol Antikörper heran, besonders wenn geringe Beladungen an Antikörper angewendet werden. (s. Tabelle 2)

Tabelle 2

Bindung der gereinigten, oxidierten monoklonalen Antikörper an Matrixpolymerisat HY-MP.

Antikörper	Eingesetzter Antikörper pro g trockener Träger MP (mg)	Gebundener Antikörper pro g trockener Träger MP (mg)	Antigen CPA pro g Träger MP (mg)	Molares Verhältnis: Antigen zu Antikörper (mol/mol)
CPA 1	0,7	0,7	0,32	2,0
CPA 6	0,5	0,5	0,30	2,5
CPA 6	17,5	7,5	4,5	2,5
CPA 7	1,0	0,7	0,34	2,1
CPA 8	0,8	0,8	0,32	1,65
CPA 8	25,0	13,0	4,40	2,5
CPA 2	3,5	1,0	0,36	1,5
CPA 3	2,2	1,0	0,40	1,7
CPA 5	3,0	2,0	0,40	1,0

Beispiel 2

Herstellung der aldehydgruppenhaltigen monoklonalen anti-CPA-Antikörper.

Eine Serie affinitätschromatographisch gereinigter monoklonaler anti-CPA-Antikörper wurden vor der Periodat-Oxidation gegen 0,1 M Acetatpuffer pH 5,5 dialysiert. Jeder monoklonale Antikörper wurde mit 0,1 M Natriumperiodat gelöst in 0,1 M Acetatpuffer von pH 5,5 (10 ml) behandelt. Bei diesem niedrigen pH-Wert wird die interne Vernetzung der Antikörper-Moleküle unterdrückt. Die Reaktion wurde während 1 Stunde bei 0 Grad C im Dunkeln durchgeführt.

Man stoppt die Oxidationswirkung durch Zugabe von drei Tropfen Ethylenglykol bevor man auf eine ®Sephadex G 25-Säule, prääquilibriert mit 0,1 M Acetatpuffer vom pH 5, aufgibt. Die oxidierten Antikörper werden in einer 10 ml Amicon Ultrafiltrationszelle ausgestattet mit einer PM 50-Membran aufkonzentriert, und der Gehalt an Protein wird mittels der BRADFORD-Methode bestimmt. Die Gewinnung der Antikörper übersteigt gewöhnlich 90%.

Beispiel 3

Modifikation des Matrixpolymerisats MP

- 5 2 g des vernetzten Methacrylamid/Glycidylmethacrylat-Copolymerisats ([®]EUPERGIT C, Produkt der Röhm GmbH, Darmstadt) wird mit 0,1 M käuflichem Adipinsäuredihydrazid in 20 ml eines 0,2 M Phosphatpuffers pH 8,8 16 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Der modifizierte polymere Träger wird ausgiebig mit PBS gewaschen, mit 0,1 M Acetatpuffer pH 5,5 äquilibriert und bei 4 Grad C aufbewahrt.

10 Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung immobilisierter mittels ihrer modifizierten Kohlehydratregion kovalent an ein Matrix-Polymer gebundener Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper in einer Kondensationsreaktion unter Einbeziehung mindestens einer Aldehydgruppe der oxidierten Kohlehydratregion und mindestens einer Epoxyfunktion eines epoxygruppentragenden Matrixpolymerisats MP mittels eines bifunktionellen Reagenzes BR, das an der einen Endposition einer mindestens dreigliedrigen abstandhaltenden Einheit eine zur Kondensation mit der Aldehydgruppe befähigte Aminogruppe und an der anderen Endposition eine kovalent mit der Epoxyfunktion reagierende Gruppe trägt, an das Matrixpolymerisat MP gebunden werden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsprodukt eines bifunktionellen Reagenzes BR mit dem Matrixpolymerisat MP mit der Aldehydgruppe der oxidierten Kohlehydratregion des Antikörpers kondensiert wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Aldehydgruppen durch Periodatoxidation der Hemiacetalgruppen der Kohlehydratregion des Antikörpers gebildet werden.

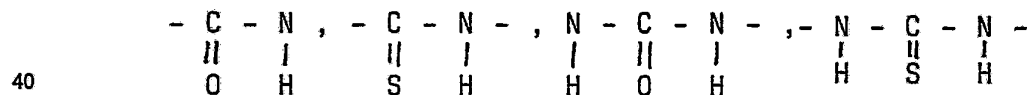
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Periodatoxidation bei einem pH-Wert im Bereich 5 bis 5,5, vorzugsweise in einem entsprechenden inerten Puffer vorgenommen wird.

5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß zum Abbrechen der Oxidation Ethylenglykol zugesetzt wird.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein bifunktionelles Reagenz BR der Formel

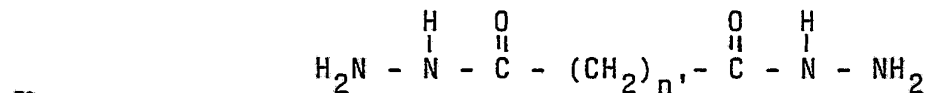


- 35 wobei A für eine mindestens dreigliedrige abstandhaltende Einheit oder Spacer, n für null oder eins, X für einen Rest



steht und Q dieselbe Bedeutung wie $-\text{X}-\text{NH}_2$ besitzt oder für $-\text{NH}_2$ steht, verwendet wird.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als bifunktionelles Reagenz BR eine Verbindung der Formel



worin n' für 3–6, vorzugsweise 3–4 steht, verwendet wird.

8. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als epoxygruppentragendes Matrixpolymerisat MP ein Copolymerisat aus im wesentlichen Acrylamid oder Methacrylamid und Glycidyl(meth)acrylat eingesetzt wird.

9. Verfahren zur Herstellung der Ausgangsstoffe für das Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsprodukt eines bifunktionellen Reagenzes BR gemäß Anspruch 6 mit dem Matrixpolymerisat gemäß Anspruch 8 bei pH 8,8–9 hergestellt wird.

10. Immobilisierte, an ein Matrix-Polymer gebundene Antikörper, erhalten nach einem der Ansprüche 1 bis 8.