

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **237 327 A1**

4(51) C 12 N 9/96
C 12 Q 1/28

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 276 366 0	(22)	15.05.85	(44)	09.07.86
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	VEB Sächsisches Serumwerk Dresden, 8010 Dresden, Herbert-Bochow-Straße, DD
(72)	Taubert, Hans, Dr. rer. nat., DD

(54) **Stabilisierung von Peroxidasen und so stabilisiertes Medium**

(57) Es wird ein Verfahren zur Stabilisierung von Peroxidasen beschrieben, die in der Analytik verwendet werden, und zwar besonders für Immunoassays zur Markierung von Antigenen oder Antikörpern. Dadurch kann der Gebrauchswert entsprechender Reagenzien erhöht werden. Die Stabilisierung erfolgt durch 2,2'-disubstituierte Azine oder deren Umsetzungsprodukte und gegebenenfalls zusätzlich durch Polyalkohole in einem Proteine und/oder Aminosäuren oder Derivate dieser Stoffe enthaltenden Medium.

ISSN 0433-6461

—Seiten

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 237 327 A1

4(51) C 12 N 9/96
C 12 Q 1/28

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 276 366 0 (22) 15.05.85 (44) 09.07.86

(71) VEB Sächsisches Serumwerk Dresden, 8010 Dresden, Herbert-Bochow-Straße, DD
(72) Taubert, Hans, Dr. rer. nat., DD

(54) Stabilisierung von Peroxidasen und so stabilisiertes Medium

(57) Es wird ein Verfahren zur Stabilisierung von Peroxidasen beschrieben, die in der Analytik verwendet werden, und zwar besonders für Immunoassays zur Markierung von Antigenen oder Antikörpern. Dadurch kann der Gebrauchswert entsprechender Reagenzien erhöht werden. Die Stabilisierung erfolgt durch 2,2'-disubstituierte Azine oder deren Umsetzungsprodukte und gegebenenfalls zusätzlich durch Polyalkohole in einem Proteine und/oder Aminosäuren oder Derivate dieser Stoffe enthaltenden Medium.

ISSN 0433-6461

—Seiten

Zur PS Nr. *237 327*...

ist eine Zeitschrift erschienen.

(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs. 1 d. Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Stabilisierung von Peroxidasen in einem Proteine und/oder Aminosäuren oder Derivate dieser Stoffe enthaltenden Medium, **dadurch gekennzeichnet**, daß man dem Medium 2,2'-disubstituierte Azine zugibt, diese gegebenenfalls mit Proteinen des Mediums reagieren läßt und gegebenenfalls zusätzlich Polyalkohole zugibt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Peroxidase Meerrettichperoxidase ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Protein tierischen, pflanzlichen oder mikrobiellen Ursprungs ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Proteinderivate Abbauprodukte oder Aggregate von Proteinen sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1, 3 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Gehalt an Protein oder Aminosäuren bzw. den Derivaten dieser Stoffe im Medium mehr als 0,1 g/l, vorzugsweise 20 bis 60 g/l beträgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Azin ein heterocyclisches Azin ist.
7. Verfahren nach Anspruch 1 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Azin 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)) ist.
8. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polyalkohole einfache, zusammengesetzte oder Polysaccharide, Zuckeralkohole, -amine oder -säuren, Glykoside sowie Kondensations- oder Polymerisationsprodukte von Alkoholen sind.
9. Verfahren nach Anspruch 1 und 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Zusatz der Polyalkohole zwischen 10 und 400 g/l, vorzugsweise zwischen 50 und 150 g/l liegt.
10. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der pH-Wert des Mediums vorzugsweise zwischen 6,0 und 7,5 liegt.
11. Stabilisierte Peroxidase in einem Proteine und/oder Aminosäuren oder Derivate dieser Stoffe enthaltenden Medium, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Medium 2,2'-disubstituierte Azine oder Umsetzungsprodukte davon und gegebenenfalls Polyalkohole enthält.

Anwendung der Erfindung

Peroxidasen, speziell einige ihrer Isoenzyme aus Meerrettich, werden als Indikatoren verwendet, um verschiedene Reaktionen, z.B. durch die Bildung gefärbter oder fluoreszierender Verbindungen, leicht meßbar zu machen. Besonders für Enzymimmunoassays werden Peroxidasen zu diesem Zweck häufig verwendet, und zwar über die Markierung von Antigenen oder Antikörpern. Kommerzielle Testpackungen für diese Methodik enthalten daher solche Peroxidasekonjugate als essentielle Bestandteile. Bekanntlich sind aber Peroxidasen in sehr verdünntem Zustand recht unbeständig, so daß die peroxidasehaltigen Reagenzien häufig die Verwendbarkeitsdauer des gesamten Testsatzes begrenzen. Durch eine geringe bzw. unsichere Stabilität leidet natürlich die Attraktivität der Kits bzw. der gesamten Methodik.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die bisher verwendeten Medien für die Stabilisierung von Peroxidasen mit Puffern unterschiedlicher Art und Konzentration, mit verschiedenen Zusätzen von Salzen, Komplexbildnern, Metallionen, Sacchariden, Proteinen, synthetischen Polymeren oder anderen Substanzen können nicht voll befriedigen. Sie geben im allgemeinen nur eine begrenzte Lagerstabilität oder weisen eine Anfälligkeit gegenüber erhöhten Temperaturen auf. Eine Verlängerung der möglichen Lagerungszeit wäre aber von Vorteil für den Hersteller und den Nutzer.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung war es also, eine Verbesserung der Stabilität von Peroxidasen zu erreichen.

Wesen der Erfindung

Bei den Vorarbeiten zur Lösung dieser Aufgabe wurde zunächst versucht, Enzymsubstrate zu verwenden, indem z.B. o-Phenylendiamin, Benzidin und andere Substanzen getestet wurden, aber die Ergebnisse waren unbefriedigend. Völlig anders war es dagegen, wenn zu Proteine und/oder Aminosäuren oder Derivate dieser Substanzen enthaltenden Lösungen Substanzen der Klasse der 2,2'-disubstituierten Azine gegeben wurden. Deren Hauptvertreter aus der Reihe der heterocyclischen Azine ist die 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)). Eine weitere Verbesserung konnte im allgemeinen durch das zusätzliche Einbringen von Polyalkoholen in das Medium erreicht werden.

Bei diesen Untersuchungen zeigten sich zwei überraschende Effekte. In Gegenwart von Serum entfärbte sich die grüne 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)) sehr schnell, und es entstand eine praktisch farblose Lösung, die anzeigte, daß die eingesetzte Substanz chemisch umgesetzt war, d. h. das Peroxidasesubstrat 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)) war nicht mehr vorhanden. Die erhaltene bessere Stabilität der Peroxidase wurde also in diesen Fällen nicht durch das zugegebene Peroxidasesubstrat erreicht, sondern von dem oder den Umsetzungsprodukten. In welcher Weise das oder die Umsetzungsprodukte auf die Peroxidase einwirkten, konnte nicht geklärt werden. Der andere Effekt war die Tatsache, daß das Enzym nicht nur für den Reaktionsmechanismus der peroxidatischen Umsetzung von heterocyclischen Azinen, sondern auch für den der Umsetzung von o-Phenylendiamin und ähnlichen Substanzen stabilisiert wurde, was hier von besonderem Interesse war. Während die Azine nach einem Radikalmechanismus umgesetzt werden, bei dem zunächst (bzw. bei der praktischen Verwendung von 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure-(6)) als angestrebtes Produkt) ein stabiles Radikalkation entsteht, ist dies beim o-Phenylendiamin nicht der Fall, es wird vielmehr ein anderer Mechanismus wirksam. Diese gleichzeitige Stabilisierung zweier Mechanismen ist keineswegs von vornherein zu erwarten, da in anderen Fällen nur der Radikalmechanismus in brauchbarer Weise erhalten wird, nicht dagegen der für die o-Phenylendiamin-Oxidation verantwortliche, z. B. bei der Stabilisierung mit verschiedenen Metallionen.

Die Verbesserung der Stabilität ist besonders bei Zusatz von heterocyclischen Azinen im Verein mit Polyalkoholen, z. B. zu Serum und anschließende Lyophilisation, sehr groß; die Wirkung ist aber auch im flüssigen Zustand vorhanden.

Für die Grundstabilisierung kommen Proteine tierischen, pflanzlichen oder mikrobiellen Ursprungs sowie deren Derivate in Frage. Von den löslichen Proteinen eignen sich vor allem Serum und Serumproteine von Mensch und Tier. Das Serum kann nativ oder in bearbeitetem Zustand zugegeben werden. Die teilweise oder vollständige Entfernung der Lipide in an sich bekannter Weise ist eine häufig günstige Vorbehandlung. Zur Zurückdrängung von eventuell möglichen ungünstigen Einflüssen der Serumenzyme, der Transportproteine oder anderer Substanzen erweist es sich als vorteilhaft, diese Aktivitäten durch Erhitzen teilweise oder vollständig zu zerstören. Ein gewisses Problem könnte beim Einsatz im Enzymimmunoassay die Anwesenheit peroxidatisch wirkender Enzyme im Zusatzserum sein. Dieser Einfluß auf die spätere Bestimmung ist aber im allgemeinen sehr gering, da diese Enzyme nicht an der Immunreaktion teilnehmen und bei der Trennung von freiem und gebundenem Tracer fast vollständig entfernt werden. Ein geringer Rest stört nicht, weil er in allen Bestimmungsansätzen in gleicher Menge vorhanden ist und über die sog. unspezifische Bindung, von der er wieder nur einen Bruchteil ausmacht, kontrolliert werden kann. Verwendbar sind Zusätze von Serum oder Serumfraktionen in flüssiger oder fester Form, die einen Eiweißgehalt des Mediums von mehr als 0,01 % ergeben. Sehr gute Effekte werden häufig mit mehr als 2 % erreicht.

Eine weitere Quelle für lösliches Eiweiß ist z. B. tierische Milch, die man zweckmäßigerweise vorher entrahmt. Für den Einsatz von Milcheiweißen gilt im Prinzip das bei Serum Gesagte. Unter Proteinderivaten werden hier solche Verbindungen verstanden, die durch Abbau der Proteine über Bruchstücke bis hin zu den Aminosäuren reichen, sowie Aggregate, die aus Proteinen oder ihren Abbauprodukten entstehen.

Der Proteinabbau kann in verschiedenen Arten erfolgen, z. B. schon rein thermisch, wobei teilweise Oxidationsmittel (Wasserstoffperoxid) zugesetzt werden, vor allem aber durch Hydrolyse mit Säuren, Basen oder Enzymen. Solche Abbauprodukte sind in an sich bekannter Weise von allen Eiweißen herzustellen. Für den technischen Gebrauch bieten sich vor allem solche Produkte an, die billig im Handel erhältlich sind, z. B. Gelatine, hydrolysierte Gelatine und Peptone. Gelatine wird aus Gerüsteiweißen von Tieren durch saure Hydrolyse gewonnen, die Peptone durch enzymatischen Abbau, z. B. von Casein, Fleisch, Gluthen oder Sojabohneneiweiß. Die Molmassen solcher Eiweißabbauprodukte sind sehr unterschiedlich, je nach Herstellungsart, und sie sind im allgemeinen auch sehr inhomogen. Die Zahl der Peptidbindungen pro Molekül kann von einigen 1000 bis Null reichen. Bei den Handelsprodukten sind die Molekülgrößen manchmal etwas definierter. Während bei Gelatine die Zahl der Peptidbindungen in der Größenordnung von Tausend liegt, treten bei der sog. hydrolysierten (= partiell hydrolysierten) Gelatine, die für Infusionszwecke verwendet wird, Molmassen von etwa 20 000 bis 40 000 auf, die kleineren Moleküle werden vorher durch Dialyse entfernt. Bei den verschiedenen handelsüblichen Peptonen treten meist Molmassen von weniger als 5000, z. T. auch weniger als 2000, auf, und es liegen neben Oligopeptiden stets auch freie Aminosäuren vor. Wenn solche Abbauprodukte im allgemeinen auch relativ inhomogen sind, so haben sie doch gegenüber Serum den Vorteil, daß sie nicht die Eigenschaften von Antikörpern, spezifischen Transportproteinen, Hormonen oder Enzymen besitzen und häufig auch keine Lipide enthalten, was für manche Anwendungszwecke von Bedeutung sein kann.

Aggregate von Eiweißen entstehen allmählich bei der Lagerung von Eiweißlösungen, besonders schnell aber beim Erhitzen. Solche Aggregate können aus zwei bis zwanzig oder mehr Molekülen bestehen. Ihre Bindungsform ist nicht genau bekannt, aber relativ fest, so daß man sie teilweise säulenchromatographisch trennen kann.

Die Eigenschaften der Aggregate können sich deutlich von denen der Einzelmoleküle unterscheiden. Proteinaggregate entstehen unter anderem zwangsläufig dann, wenn zur Stabilisierung Serum eingesetzt und ein großer Teil der potentiellen Störsubstanzen durch sog. Inaktivieren (Erhitzen z. B. auf 50 bis 60°C über 60 Minuten) unwirksam gemacht werden soll.

Als Endprodukte der Proteinhydrolyse treten Aminosäuren auf, z. B. Glycin, Alanin, Phenylalanin, Tyrosin, Serin, Cystein, Glutaminsäure, Lysin und andere. Neben den natürlich vorkommenden Aminosäuren kann man auch synthetische, nicht in der Natur vorkommende verwenden, und zwar neben α -Aminosäuren auch solche, in denen z. B. die Carboxyl- und die Aminogruppe durch einen Zwischenraum getrennt sind, z. B. ϵ -Aminocapronsäure, oder in denen zwei Aminogruppen nebeneinander stehen, z. B. Diaminobornsteinsäure. Als Hauptderivate der Aminosäuren kommen hier die Peptide in Frage, die neben dem Abbau der Proteine auch durch Synthese gewonnen werden sowie N-Acylaminosäuren.

Als Polyalkohole werden, hier vor allem einfache und zusammengesetzte Saccharide bis zu Polysacchariden verstanden, z. B. Arabinose, Glukose, Fruktose, Saccharose, Maltose und andere bis zum Dextran, daneben auch Glykoside, Zuckeralkohole, -amine und -säuren, z. B. Methylglykosid, Sorbit, Glukosamin und Glykonsäure sowie Kondensations- und Polymerisationsprodukte von Alkoholen, z. B. Polyethylenglykol und Polyvinylalkohol.

Sehr günstig ist z. B. Rohrzucker, da er billig und in großer Reinheit überall zur Verfügung steht. Eine Wirkung tritt bei einer Konzentration von mehr als 1 % auf, für die Stabilisierung und Lyophilisierung sind 5 bis 15 % besonders günstig.

Für die Einstellung und Beibehaltung des gewünschten pH-Wertes ist ein Zusatz von Puffer günstig. Die Art der Pufferionen sowie ihre Konzentration hängt z. T. von den anderen Bedingungen ab. Phosphatpuffer und die sog. Good-Puffer in Konzentrationen von 0,005 bis 0,25 mol/l haben sich in verschiedenen Fällen als günstig erwiesen. Man kann aber auch Citrat, Tartrat, Succinat und andere Anionen verwenden. Als Kationen kommen neben Natrium, Kalium und Ammonium auch Trispuffer und Amine in Frage. pH-Werte zwischen 4,0 und 9,0 sind im Prinzip verwendbar, für die meisten Fälle ist aber ein Wert von 6,0 bis 7,5 am günstigsten.

Die Lyophilisation der zu stabilisierenden Enzymlösungen erfolgt in an sich bekannter Weise, indem man z. B. Portionen von 0,1 bis 1,0 ml in Flaschen abfüllt, diese auf eine Temperatur von unter -30°C abkühlt und das Eis unter vermindertem Druck sublimiert. Danach werden die Flaschen mit einem Schutzgas versehen oder im Vakuum luft- und feuchtigkeitsdicht verschlossen. Zur Lagerung in flüssigem Zustand wird die Lösung gegebenenfalls in an sich bekannter Weise mit einem Konservierungsmittel versehen, das z. B. aus der Gruppe der Phenole, der organischen Quecksilberverbindungen oder der p-Hydroxybenzoesäureester stammen kann. Dann wird die Lösung sterilfiltriert und in sterile, dicht verschließbare Gefäße abgefüllt.

Anwendungsbeispiel 1

A. Progesteron-Peroxidase-Konjugat (hergestellt nach der Methode der gemischten Anhydride) wurde in folgender Lösung lyophilisiert: 25% Humanserum (delipidiert, 1 Stunde auf 56°C erhitzt), 0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH 6,5. Der Peroxidasegehalt betrug etwa 40 ng/ml.

B. Wie Ansatz A, aber mit einem Zusatz von 0,2% 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)). Die Lösung entfärbte sich in weniger als 2 Minuten von einer grünen zu der schwach gelbbraunlichen, durch das Serum verursachten Färbung.

C. Wie Ansatz A, aber mit einem Zusatz von 10% Rohrzucker.

D. Wie Ansatz B, aber mit einem Zusatz von 10% Rohrzucker.

Nach 10 Tagen Lagerung bei 45°C wurden bei A 14%, bei B 36%, bei C 81% und bei D 91% der nach der Lyophilisierung erhaltenen Aktivität wiedergefunden.

Anwendungsbeispiel 2

A. Das Peroxidasekonjugat von humanem Plazentalaktogen (hergestellt nach der Perjodatmethode) wurde in folgender Lösung lyophilisiert: 0,5% Rinderserumalbumin, 0,05 mol/l Phosphatpuffer, pH 6,5.

B. Wie Ansatz A, aber mit Zusatz von 0,2% 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure-(6)).

C. Wie Ansatz A, aber mit Zusatz von 10% Rohrzucker.

D. Wie Ansatz B, aber mit einem Zusatz von 10% Rohrzucker.

Nach 6 Tagen Lagerung bei 37°C wurden bei A 24%, bei B 45%, bei C 50% und bei D 64% der eingesetzten Aktivität wiedergefunden.

Anwendungsbeispiel 3

A. Testosteron-Peroxidase-Konjugat wurde in folgender Lösung flüssig aufbewahrt: 0,1% Humanserumalbumin, 0,05 mol/l Phosphatpuffer, pH 6,2, 0,1% 8-Hydroxychinolin.

B. Wie Ansatz A, aber mit einem Zusatz von 0,4% 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)).

C. Wie Ansatz B, aber mit einem Zusatz von 10% Rohrzucker.

Nach 14 Tagen Lagerung bei 37°C wurden bei A 20%, bei B 69% und bei C 77% der Ausgangsaktivität wiedergefunden.