(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 114 T2** 2004.07.08

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 737 209 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 114.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/14774**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 905 452.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/018156**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.12.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **06.07.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.10.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **03.09.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 16/44**
G01N 33/94, G01N 33/533, C07F 7/00, C07F 19/00

(30) Unionspriorität:
176360 **30.12.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL

(73) Patentinhaber:
Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill., US

(72) Erfinder:
JOHNSON, K., David, Vernon Hills, US

(74) Vertreter:
Schieber und Kollegen, 80469 München

(54) Bezeichnung: **METALLION-LIGAND KOORDINATIONSKOMPLEXE, ANTIKORPER DAGEGEN UND TESTS DIE SOLCHE ANTIKORPER VERWENDEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Immunoassays für Metallionen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die monoklonalen Antikörper, die für einen Komplex spezifisch sind, der einen Chelatbildner und ein Metallion enthält, werden im U.S. Patent No. 4.722.892 von Mears et al. offenbart. Die Detektion oder Trennung von Metallionen aus einer Lösung, die auch andere Metalle enthält, z. B. durch die Zugabe des Chelatbildners zur Lösung und das Führen der Lösung über eine feste Phase, an die im vorhinein die Antikörper gebunden worden waren, ist ebenfalls darin offenbart. Somit fangen die Antikörper den Komplex aus Chelatbildner und Metallion ein.

[0003] Die U.S. Patente Nos. 5.239.078 und 5.189.178 an Galardy et al. offenbaren die Erzeugung von Antisera durch die Immunisierung eines Tiers mit einem Chelatbildner (der an einen immunogenen Träger gekoppelt ist), der in der Lage ist, ein Metallion im Verhältnis von 1 : 1 zu binden. Die Antikörper sind für in vitro Assays von biologischen Fluiden nützlich, um die therapeutischen oder prophylaktischen Regimes von Patienten, die den Chelatbildner verabreicht bekommen, zu überwachen.

[0004] Tilby et al. offenbaren Antikörper, die spezifisch an einen Komplex aus DNA und Platindichlorid binden, statt an Dichlorodiaminplatin (Tilby et al., Cancer Res., 51, 123–129 (1991)). Dichlorodiaminplatin wird an Patientinnen mit Eierstockkrebs verabreicht und es reagiert mit der DNA. in wachsenden Zellen, so wie Krebszellen, um einen Komplex aus Guanidin und Platindichlorid zu bilden und somit die DNA zu zerstören und den Zelltod zu verursachen. Die Antikörper sind für in vitro Assays für Patientenproben nützlich, für die Bildung des Komplexes aus Guanidin und Platindichlorid, um die Reaktion der Patienten auf die Behandlung zu bestimmen.

[0005] Philomin et al. offenbaren die Synthese von Cohalt-Carbonyl-Komplexen aus Cortisol und Testosteron und polyklonalen Antikörpern, die für den steroiden Liganden spezifisch sind, aber nicht für das Cobalt Metallion in den Komplexen (Philomin, et al., Bioconjugate Chem., 4, 419–424 (1993)). Philomin et al. schlagen auch die Verwendung dieser organometallischen Komplexe als Tracer vor, in nicht-Isotopen Carbonylmetall-Immunoassays. supra.

[0006] Das U.S. Patent 5.053.226 von Rosenblum et al. offenbart monoklonale Antikörper, die einen der beiden Liganden (d. h. 1,2-Diaminocyclohexan aber nicht Sulfat)-eines ternären Platin (II) Komplexes: Dinatrium-1,2-diaminocyclohexan-Platinsulfat-Komplex, spezifisch binden.

[0007] Fluoreszenzpolarisations-Techniken basieren auf dem Prinzip, dass eine fluoreszent markierte Verbindung, wenn sie mit linear polarisiertem Licht angeregt wird, eine Fluoreszenz emittieren wird, deren Polarisationsgrad in umgekehrtem Verhältnis zu ihrer Rotationsrate steht. Deshalb, wenn ein fluoreszent markierter Tracer-Antikörper-Komplex mit linear polarisiertem Licht angeregt wird, dann bleibt das emittierte Licht hochpolarisiert, weil der Fluorophor in der Zeitspanne zwischen der Absorption und der Emission des Lichts in seiner Rotation eingeschränkt ist. Wenn eine „freie" Tracer-Verbindung (d. h. nicht an einen Antikörper gebunden) mit linear polarisiertem Licht angeregt wird, dann ist ihre Rotation viel schneller als bei dem entsprechenden Tracer-Antikörper-Konjugat und die Moleküle sind eher zufällig orientiert, und deshalb ist das emittierte Licht depolarisiert. Somit stellt die Fluoreszenzpolarisation ein quantitatives Mittel zur Verfügung zur Messung der Menge an Tracer-Antikörper-Konjugat, die in einem kompetitiven Bindugs-Immunoassay produziert wird.

[0008] Die U.S. Patente Nos. 4.510.251 und 4.614.823 von Kirkemo et al. offenbaren Fluoreszenzpolarisations- Immunoassays (FPIA) für Liganden unter Verwendung von Aminomethylfluoresceinderivaten als Tracer beziehungsweise die Aminomethylfluoresceinderivate. Das U.S. Patent No. 4.476.229 von Fino et al. offenbart substituierte Carboxyfluoresceine, einschließlich derer, die ein Thyroxinanalogon enthalten, zur Verwendung in Fluoreszenzpolarisations- Immunoassays. Das U.S. Patent No. 4.668.640 von Wang et al. Offenbart einen Fluoreszenzpolarisations- Immunoassay unter Verwendung von substituierten Carboxyfluoresceinen.

[0009] Beispiele von kommerziell erhältlichen FPIA sind jene für Thyroxin, wie z. B. IMx®, TDx® und TDxFLx™ T4 Assays (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Ein Aspekt der Erfindung legt einen Metallion-Ligand-Koordinationskomplex (der Komplex wird hierin als „MLC" bezeichnet) dar, der zwei oder mehrere an ein Metallion gebundene Liganden enthält. Der bevorzugte MLC ist ein ternärer MLC (der hierin als „TMLC" bezeichnet wird).

[0011] Ein anderer Aspekt der Erfindung legt neue Liganden dar, die in der Lage sind Metallionen zu binden. Die neuen Liganden können in jeder der obigen Aspekte der Erfindung verwendet werden.

[0012] Ein anderer Aspekt der Erfindung legt ein MLC dar, an das ein Proteinträger gebunden ist, um ein MLC-Protein-Konjugat zu bilden, das vorzugsweise immunogen ist.

[0013] Ein anderer Aspekt der Erfindung legt ein Verfahren dar, das MLC-Protein-Konjugate für die Produktion von Antikörpern, die gegen den MLC spezifisch sind, verwendet. Es wird auch ein Verfahren dargelegt zum Screening von Antikörpern, die den MLC binden, und ein Verfahren zum Screening von Antikörpern, die mit MLC, die Metallionen enthalten,

welche nicht von Interesse sind, nicht kreuzreagieren. Somit wird auch eine Festphase dargestellt, an die der MLC gebunden ist und die für solche Screenings von Nutzen ist.

[0014] Ein anderer Aspekt der Erfindung legt die Antikörper dar, die entsprechend dem obigen Verfahren hergestellt wurden. Vorzugsweise reagieren diese Antikörper mit einem Epitop, das Strukturmerkmale von mindestens zwei Liganden in einem MLC vereint, während sie eine nur minimale Reaktivität gegenüber entweder dem Liganden alleine, oder gegenüber dem Metallion selbst zeigen.

[0015] Ein anderer Aspekt der Erfindung legt ein Verfahren dar, das zwei oder mehrere Liganden verwendet, um an ein Metallion von Interesse zu binden und ein MLC zu bilden. Vorzugsweise wird dieses Verfahren in einem in vitro oder einem in vivo Assay für ein Metallion angewandt, durch Detektion des resultierenden MLC. Vorzugsweise erfolgt die Detektion durch die spezifische Bindung eines Bindungsmittels an den MLC, um einen Komplex zu bilden (der Komplex wird hierin als „MLC-bindendes Mittel" bezeichnet). Noch bevorzugter sind die Bindungsmittel die obigen Antikörper. Die Methode kann auch für die in vitro oder in vivo Entfernung des Metallions verwendet werden, durch die Entfernung des resultierenden MLC-bindenden Mittels.

[0016] Ein anderer Aspekt der Erfindung legt das MLC-bindende Mittel dar.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0017] **Fig.** 1 stellt die Struktur der bevorzugten Liganden dar.

[0018] **Fig.** 2 zeigt schematisch ein MLC-Protein-Konjugat, in dem das Protein an den MLC über die Carboxylgruppe auf dem MLC gebunden ist.

[0019] **Fig.** 3 zeigt schematisch ein MLC-Pr-otein-Konjugat, in dem das Protein an den MLC über die Sulfhydrylgruppe auf dem MLC gebunden ist.

[0020] **Fig.** 4 stellt die bevorzugten neuen Liganden dar, insbesondere zur Bindung der Blei-Ionen.

[0021] **Fig.** 5 zeigt den bevorzugten TMLC für das Blei-Ion.

[0022] **Fig.** 6 stellt den Syntheseweg dar, zur Herstellung eines TMLC-Protein-Konjugats, M_3; beginnend mit den Liganden L_9 und L_{13}.

[0023] **Fig.** 7 stellt einen anderen Syntheseweg dar, zur Herstellung des gleichen TMLC-Protein-Konjugats, M_3; beginnend mit den Liganden L_{13} und L_{15}.

[0024] **Fig.** 8 zeigt den neuen Fluorescein-Tracer L_{16}.

[0025] **Fig.** 9 zeigt einen fluoreszent markierten gemischten Liganden TMLC, M_5.

[0026] **Fig.** 10 zeigt schematisch einen bifunktionellen Spacerarm, der an die Carboxylgruppe des Liganden auf dem TMLC gebunden ist.

[0027] **Fig.** 11 zeigt schematisch einen bifunktionellen Spacerarm, der an die Sulfhydrylgruppe des Liganden auf dem TMLC gebunden ist.

[0028] **Fig.** 12 zeigt das TMLC-Fluorescein-Konjugat PbL14L16, das auch als M6 bezeichnet wird.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0029] Die vorliegende Erfindung stellt die Bindemittel dar, die, basierend auf ihren Formen, spezifisch an Metallion – Ligand – Koordinationskomplexe binden. Die Metallion – Ligand – Koordinationskomplexe werden im folgenden als „MLC" bezeichnet. Vorzugsweise sind die Bindemittel biologische Bindemittel. Die bevorzugten biologischen Bindemittel sind spezifische Antikörper für MLC, die zwei oder mehrere Ligandenmoleküle enthalten. Diese Antikörper werden vorzugsweise gegen ein Immunogen gebildet, in dem MLC über einen der Liganden an ein Trägerprotein gebunden ist. Die Erfindung enthüllt, dass die-Antikörper-Erkennung eines Metallions von Interesse spezifischer ist, wenn der MLC zwei oder mehrere Ligandenmoleküle hat, im Gegensatz zu den Antikörpern im Stand der Technik, die gegen Proteinkonjugate binärer MLC gebildet wurden.

[0030] Die größere Anzahl an Freiheitsgraden, die einem 3-Komponenten (oder höher) -multimolekularen Komplex eigen sind, im Vergleich zu seinem 2-Komponenten Gegenstück, ergibt eine weitere Spanne von möglichen Liganden-Konformationen und Ligand-Metall Stöchiometrien und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass eine bestimmte Form existiert, die einzigartig ist für das bestimmte Metallion von Interesse. Die Antikörper aus dem Stand der Technik erkennen starre, binäre Komplexe, wie EDTA Chelate und Porphyrine, deren Form von einem Metall zum nächsten wenig variiert, weil sie hauptsächlich von sterischen Zwängen bestimmt sind, die den Liganden selbst innewohnen („Ligand-getriebene" Form). Somit weisen solche Antikörper eine geringe Spezifität. für ein Metallion von Interesse auf und haben sich, für beispielsweise die Detektion eines gegebenen Metallions in einer Probe, die auch andere nicht-Ziel-Metallionen enthält, nicht als nützlich erwiesen.

[0031] Die vorliegende Erfindung erhöht die Spezifität, weil die Formen der TMLC (und denjenigen mit einer höheren Anzahl an Liganden) von der Natur des Metallions (d. h. sie weisen „Metallion-getriebene" Form auf) in größerem Maße bestimmt werden, als jene der binären Komplexe. Wenn die Form Metallion- getrieben ist, können Form-selektive Antikörper erhalten werden, die, für ein fixes Set von Liganden, eine höhere Spezifität für ein gegebenes Metallion aufweisen, wenn sie in der Form, der MLC dargestellt sind.

[0032] Diese Liganden und/oder Antikörper können, zum Beispiel, verwendet werden, um eine Probe auf toxische Metalle zu untersuchen oder diese aus der Probe zu entfernen, z. B. Bleiniveaus in biologischen Proben oder Quecksilberniveaus in Industrieabfällen

oder in Pflanzen zur Behandlung von Gewässern. Sie können auch für die Untersuchung der therapeutischen Metallniveaus in biologischen Proben verwendet werden, wie das Goldniveau in einem Patienten, dem Gold zur Behandlung seiner Rheumatoiden Arthritis verabreicht wurde. Sie können auch zur Untersuchung der Niveaus von endogenen Metallionen verwendet werden, wie Eisen, Kupfer, Chrom, Cobalt etc.

[0033] Die vorliegende Erfindung stellt auch neue Liganden dar, die für die oben genannten Zwecke nützlich sind. Diese Liganden können zusätzlich zur Entfernung von Metallen aus einer Probe verwendet werden, wie für die Entfernung von toxischen Metallen aus Industrieproben, das Auffangen von Silber aus Foto-Entwicklungslösungen. Die Liganden können zusätzlich in vivo verabreicht werden (therapeutisch), um Patienten zu behandeln, die an Metallvergiftung, wie Bleivergiftung, leiden.

[0034] Die hierin beschriebenen Metalle können alle Metalle von Interesse sein.

[0035] Die vorliegende Erfindung beschreibt auch Kriterien zur Auswahl der geeigneten Liganden für die obigen Ziele.

[0036] Die vorliegende Erfindung stellt auch Antikörper dar, die für einen MLC spezifisch sind, wobei die Spezifität Metallion-getrieben ist.

[0037] Im folgenden wird die vorerwähnte Skizze der Erfindung genau dargelegt.

Metallion-Ligand – Koordinationskomplex (MLC)

[0038] Ein MLC besteht aus einem zentralen Metallion, das an eine Anzahl anderer Moleküle gebunden ist, die Liganden genannt werden. Die Natur der chemischen Bindung, die zwischen einem Liganden und einem Metall gebildet wird, kann so betrachtet werden, dass sie die Abgabe eines Elektronenpaars, das sich auf dem Ligandenmolekül befindet, involviert, oder im Sinne der Molekülorbitale, als ein Molekülorbital das gebildet wird aus der Kombination eines vollständig besetzten Orbitals des Liganden mit einem freien Orbital des Metalls. Diejenigen Atome des Ligandenmoleküls, welche direkt in die Bildung einer chemischen Bindung mit dem Metallion involviert sind, werden deshalb Donoratome genannt und diese umfassen im allgemeinen Elemente der Gruppen V und VI des Periodensystems, wobei Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor und Arsen als am häufigsten verwendet werden.

[0039] Die Moleküle die zwei oder mehrere Donoratome enthalten, die in der Lage sind, an ein einziges Metallion zu binden, werden chelatbildende Substanzen oder Chelatbildneren genannt und die entsprechenden Metallkomplexe werden Chelate genannt. Die Anzahl der Donoratome, die in einem gegebenen Chelatbildner vorhanden sind, wird Zähligkeit dieses Chelatbildners genannt, wobei Liganden, die zwei Donorstellen besitzen, zweizählig genannt werden, die mit drei Donorstellen, dreizählig, und so weiter. Im allgemeinen sind die gebildeten Chelate um so stabiler, je höher die Zähligkeit eines Chelatbildners ist, bis zu dem Punkt, an dem die Zähligkeit des Chelatbildners der maximalen Koordinationszahl entspricht, die vom bestimmten Metallion von Interesse erreichbar ist. Die maximale Koordinationszahl eines gegebenen Metallions in einer gegebenen Oxidationsstufe ist eine intrinsische Eigenschaft jenes Metalls, die die Anzahl der leeren Orbitale widerspiegelt und somit die Anzahl der chemischen Bindungen, die es in der Lage ist, mit Liganden-Donoratomen zu bilden. Wenn alle zur Verfügung stehenden leeren Orbitale für die Bildung von Bindungen mit Donoratomen im Liganden oder in den Liganden verwendet wurden, wird das Metall als koordinativ gesättigt bezeichnet.

Liganden

[0040] In der vorliegenden Erfindung muß die Anzahl der Liganden, die im MLC involviert sind, mindestens zwei sein und sie kann, abhängig von dem Metallion von Interesse, bis zu acht sein. Die Anzahl der Liganden in jedem gegebenen Komplex wird von der Natur des bestimmten Metallions bestimmt (in erster Linie seine maximale Koordinationszahl) und von der Natur der gewählten Liganden (ihre Zähligkeit, Donoratom-Set, Ladung, Größe, etc.). Es ist nicht notwendig, dass die Antikörper-Kombinationsstelle Merkmale auf allen im Komplex vorhandenen Liganden erkennt. Solange der Antikörper eine Kombination von mindestens zwei Liganden erkennt, können zusätzliche Liganden, die nicht zum Epitop beitragen, vorhanden sein, um den Komplex zu stabilisieren oder andere Eigenschaften, wie die Wasserlöslichkeit, zu verstärken.

[0041] Für jedes gegebene Metallion können entsprechend der vorliegenden Erfindung nützliche Liganden von jenen mit Erfahrung im Fachgebiet ausgewählt werden, wobei folgende Kriterien verwendet werden. Die Liganden müssen Donoratome besitzen (oder Sets Donoratome im Falle von chelatbildenden Liganden), die die Bindung an das Ziel-Metallion begünstigen, wobei die allgemeine Präferenz jedes gegebenen Metallions für bestimmte Donoratome (im allgemeinen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Carboxyl-, Phenol-oder Ether-Sauerstoffatome, Amine, Imine oder aromatische Stickstoffatome und geladene oder neutrale Schwefelatome) im Fachgebiet wohlbekannt ist.

[0042] Es ist nicht essentiell, dass irgendeiner der Liganden, der zum Epitop beiträgt, das von einem der vorliegenden Erfindung entsprechenden Antikörper erkannt wird, ein chelatbildender Ligand ist. Obwohl die Liganden, die für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, vorzugsweise chelatbildende Liganden sind, ist das Vorhandensein eines chelatbildenden Liganden nicht essentiell, weil nicht- chelatbildende Liganden, wie gewisse Phosphine und Zuckeranaloga auch nützlich sein können. Die einzige Anforderung ist, dass der Antikörper eine

Kombination von mindestens zwei Liganden in der Koordinationssphäre eines MLC erkennt und diese Liganden können entweder einzählig oder von höherer Zähligkeit sein.

[0043] Die Liganden aber müssen auch die Möglichkeit bieten, Ligand-Metall Bindungen zu bilden, die in vivo wahrscheinlich stabil bleiben, d. h. die Ligand-Metall Bindung dissoziiert nicht während der Zeitspanne, die notwendig ist, um eine Immunantwort gegen den Komplex hervorzurufen (im allgemeinen mehrere Monate). Für viele Metalle von Interesse existieren beträchtliche Fachinformationen bezüglich der in vivo Stabilität bestimmter Ligand-Metall Bindungen, nach denen man sich bei der Wahl der Liganden richten kann. Für viele Metallionen von Interesse favorisiert dieses Erfordernis die Wahl von chelatbildenden Liganden, weil chelatbildende Liganden im allgemeinen Koordinationskomplexe von höherer thermodynamischer Stabilität bilden als die entsprechenden Kombinationen von einzähligen Liganden.

[0044] Nützliche chelatbildende Liganden, die hochstabile MLC mit vielen Metallionen bilden, schließen Polyaminopolycarbonsäuren ein, wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Diethylendiaminpentaessigsäure (DTPA) und Phenol-enthaltende Aminopolycarboxylate wie N,N'-bis(Hydroxybenzyl)ethylendiamin-N,N'-acetessigsäure (HBED). Diese Chelatbildneren haben eine Zähligkeit von 6 oder höher und, weil die meisten Übergangsmetalle oder Hauptgruppenmetalle eine maximale Koordinationszahl von 6 haben, sind die resultierenden Spezies koordinativ gesättigte binäre MLC, d. h. Komplexe die aus einem einzigen Ligandmolekül und einem einzigen Metallion bestehen.

[0045] Die der vorliegenden Erfindung entsprechenden bevorzugten Antikörper erkennen MLC, die das Metallion von Interesse plus 2 oder 3 Liganden umfassen, wobei diejenigen mit 2 Liganden besonders bevorzugt werden.

[0046] In Fällen wo es keinen direkten Stand der Technik bezüglich der in vivo Stabilität gibt, kann der Stand der Technik, der sich auf die thermodynamische und/oder kinetische Stabilität verschiedener Ligand-Metall Kombinationen bezieht, als Basis für die Wahl der Liganden verwendet werden.

[0047] Eine weitere Anforderung ist, dass jeder der Liganden, der das von einem Antikörper, entsprechend der vorliegenden Erfindung, erkannte Epitop umfasst; bifunktionell sein soll. Ein bifunktioneller Ligand ist ein Molekül, dass zusätzlich zu mindestens einer Metall-bindenden Stelle (Donoratom), einen zweiten reaktiven Anteil enthält, über den der Ligand kovalent gebunden werden kann, zum Beispiel ein Protein, eine Festphase oder ein Marker, ohne dass die Metall-bindenden Eigenschaften des Liganden signifikant beeinträchtigt werden. Die Bifunktionalität der Liganden ist für die Konfiguration von Screening-Assays notwendig, die verwendet werden zur Identifizierung und Selektion von monoklonalen Antikörpern, die für MLC spezifisch sind, für die Präparation von Medien für die Affinitätschromatographie, die zur Reinigung solcher Antikörper verwendet werden, und für die Präparation von Antigen-Marker Tracer, zur Verwendung in Immunoassays.

[0048] Diejenigen mit Erfahrung im Fachgebiet können leicht Positionen innerhalb eines gegebenen Ligandenmoleküls erkannt werden, wo die Inkorporation eines zusätzlichen reaktiven Anteils die Metall-bindenden Eigenschaften nicht beeinträchtigen wird und auch leicht reaktive Anteile erkannt werden, die für die Kopplung des Liganden an ein anderes Molekül oder an eine Festphase nützlich sind. Die Liganden sollten auch so gewählt werden, dass sie ein hoch differenziertes organisches Netzwerk enthalten, wobei wo nur möglich aromatische Strukturen, rigide Ringsysteme und asymmetrische Kohlenstoffzentren inkorporiert sein sollten. Ist das Donoratom-Set, die Zähligkeit, der bifunktionelle Seitenarm und das organische Gerüst der Liganden gewählt, wird die Stöchiometrie des resultierenden Ziel-MLC (d. h. entweder ternär oder von höherer Molekularität) von der maximalen Koordinationszahl des bestimmten Metallions von Interesse diktiert.

[0049] Zusätzlich zu ihrer Bifunktionalität und stabilen Ligand-Metall Bindung in vivo, schließen die bevorzugten Liganden auch Strukturmerkmale ein, von denen angenommen wird, dass sie zur Immunogenität und zur differentiellen Erkennung durch Proteine beitragen. Solche Strukturmerkmale umfassen aromatische Ringsysteme (Zoller, et al., J. Nucl. Med., 33, 1366–72 (1992)), rigide zyklische Strukturen (Kosmas, et al., Cancer Res., 52, 904–11 (1992)) und asymmetrische Kohlenstoffzentren (Reardon, et al., Nature, 316, 256–68 (1985); Zoller, et al., J. Nucl. Med., 33, 1366–72 (1992)).

Bevorzugte Liganden

[0050] Die bevorzugten Liganden sind dreizählige Chelatbildner, die bifunktionell sind und aromatischen Charakter haben. Eine besonders bevorzugte Gruppe solcher Liganden wird gebildet durch die Schiffsche-Base-Kondensation einer Sulfhydryl-enthaltenden Aminosäure mit aromatischen Aldehyden oder Ketonen, die ein Donoratom enthalten (Stickstoff oder Sauerstoff), das 2 oder 3 Kohlenstoffatome weg vom Sauerstoffatom des Aldehyds (oder des Ketons) positioniert ist. Die aromatischen Ringsysteme werden optional mit negativ geladenen Gruppen derivatisiert, um die Immunogenität und die Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Unter diesen werden die in **Fig.** 1 gezeigten Liganden besonders vorgezogen. Diese Liganden werden hierin auch als L_1 bis L_8 bezeichnet. Nach bestem Wissen des Erfinders sind diese Liganden neu, mit Ausnahme von L_6, wenn sein r CH_2 ist und sein X=OH.

[0051] Die Ausgangsliganden (L_1 bis L_8, wo X gleich -OH ist) sind potentiell vierzählig, wobei sie in allen Fällen einen Sulfhydryldonor, einen Iminstickstoffdonor, einen Carboxylatsauerstoffdonor und entweder –

einen aromatischen-Stickstoff-Donor (L_1–L_4) oder einen phenolischen-Sauerstoff-Donor (L_5–L_8) zur Verfügung stellen. Wenn sie in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, dann sind die Liganden an andere Moleküle entweder über die Carboxylat-Funktion oder die Sulfhydryl-Funktion gebunden, wobei drei Donorseiten übrig bleiben. Die Carboxylat-gebundenen Liganden binden Metallionen, so wie in **Fig.** 2 schematisch gezeigt, während die Sulfhydrylgebundenen Liganden, wie in **Fig.** 3 schematisch gezeigt, Metalle binden. Die Wahl einer Bindungsstelle wird von der Natur des Metallions von Interesse diktie rt. Für jene Metalle, die Schwefeldonoren gegenüber Sauerstoffdonoren favorisieren, wird eine Carboxylat-Bindung verwendet, um eine residuale dreizählige Stelle übrigzulassen, die aus einer Sulfhydrylgruppe, dem Iminstickstoff und entweder einem aromatischen Stickstoff (im Falle von L_1 bis L_4) oder einem phenolischen Sauerstoff (im Falle von L_5 bis L_8) besteht. Für jene Metalle die Sauerstoffdonoren favorisieren wird eine Sulfhydrylbindung verwendet, wobei eine residuale dreizählige Stelle übrigbleibt, die einen Carboxylatsauerstoff, einen Iminstickstoff und entweder einen aromatischen Stickstoff (im Falle von L_1 bis L_4) oder einen phenolischen Sauerstoff (im Falle von L_5 bis L_8) umfasst.

[0052] Es können TMLC aus einer Vielfalt von Übergangs- und Hauptgruppen-Metallionen, die als Ziele für die MLC-spezifische Antikörperproduktion geeignet sind, konstruiert werden, sowohl aus symmetrischen (alle Liganden identisch) als auch aus Kombinationen von Misch-Liganden (d. h. Kombinationen von verschiedenen Liganden) von bevorzugten Liganden, die in **Fig.** 1 gezeigt werden. Solche MLC sind, wenn an ein Trägerprotein konjugiert, als Immunogene nützlich, um Antikörper zu produzieren, die für das Metallion in komplexierter Form spezifisch sind. Die Liganden L_1–L_4 (Y=Z=Wasserstoff) tragen eine einzige formelle negative Ladung, wenn sie in Metall-gebundener Form sind (**Fig.** 2), während die Liganden L_5–L_8 (Y=Z=Wasserstoff) doppelt geladen sind. Zusätzlich zur Wahl eines bevorzugten Donoratoms (Schwefel oder Sauerstoff) hängt die Wahl der elektronischen Ladung eines Liganden auch von der Natur des bestimmten Metallions von Interesse ab.

[0053] Von besonderem Interesse für die vorliegende Erfindung sind die Antikörper gegen die MLC von Blei(II). Blei(II) favorisiert Schwefeldonoren gegenüber Sauerstoffdonoren und benötigt nur zwei einzel-geladene Liganden um die Neutralisation der doppeltpositiven Ladung des Blei-Ions zu erreichen. Die bevorzugten Antikörper, die Spezifität für Blei(II)-MLC aufweisen, werden gegen ternäre Komplexe erzeugt, die sowohl aus symmetrischen als auch aus Misch-Liganden Kombinationen der in **Fig.** 4 gezeigten Liganden konstruiert sind.

[0054] Die Liganden L_9–L_{12} bilden elektronisch neutrale TMLC's mit Blei(II) mit der allgemeinen Formel ($(Ligand)_2Pb$). Solche TMLC können symmetrisch ($(L_9)_2Pb$, $(L_{10})_2Pb$, $(L_{11})_2Pb$, $(L_{12})_2Pb$) oder Misch-Ligand Komplexe ($L_9L_{10}Pb$, $L_9L_{11}Pb$, $L_9L_{12}Pb$, $L_{10}L_{11}Pb$, $L_{10}L_{12}Pb$, $L_{11}L_{12}Pb$) sein. Die entsprechend der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugten Antikörper erkennen einen symmetrischen, auf Ligand L_9 basierenden MLC, der die in **Fig.** 5 gezeigte Struktur hat. Dieser TMLC (M_1) enthält zwei delokalisierte aromatische Ringsysteme, vier 5-gliedrige Chelatringe und zwei asymmetrische Kohlenstoffzentren (die in **Fig.** 5 mit „*" markiert sind)

Metallionen von Interesse

[0055] Von besonderem Interesse für die vorliegende Erfindung sind Antikörper, die jene Metallionen erkennen, welche im menschlichen Blutstrom gefunden werden können. Solche Metalle schließen endogene, essentielle Metallionen und nichtphysiologische Metallionen ein, die entweder als Ergebnis ihrer Verwendung als Therapiemittel, oder wegen der Aufnahme mit der Nahrung, der Absorption oder Inhalation von in der Umgebung vorhandenen Metallen vorhanden sein können. Somit schließen die Metallionen Blei, Quecksilber, Nickel, Cadmium, Thallium, Antimon, Silber, Chrom, Mangan, Platin, Gold, Aluminium, Bismut, Gallium, Eisen, Kupfer, Zink, Cobalt, Molybdän, Selen und Vanadium -Ionen ein. Entsprechend einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden monoklonale Antikörper, die für Blei-MLC spezifisch sind, bereitgestellt.

MLC-Protein Konjugate

[0056] Entsprechend einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Konjugate bereitgestellt, worin ein MLC kovalent an ein Proteinmolekül gebunden ist. Solche MLC-Protein Konjugate werden als Immunogene verwendet und als Beschichtungen in beschichtete-Platten-Mikrotiter-ELISA-Assays, die zum Screening und zur Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die allgemeinen Verfahren für die Herstellung solcher MLC-Protein Konjugate können mit Hilfe eines Beispiels veranschaulicht werden, des besonders bevorzugten MLC von Blei(II), der in **Fig.** 5 gezeigt wird (M_1). Die zur Herstellung der Konjugate von M_1 mit Proteinen verwendete Reaktionssequenz wird in **Fig.** 6 gezeigt. Das Protein kann vorzugsweise eine Immunantwort in einem Tier auslösen. Beispiele solcher Proteine sind: Rinderserumalbumin (BSA), Napfschneckenhämocyanin (keyhole limpet hemocyanin KLH), Thyroglobulin, Immunoglobulin (IgG), etc. Alternativ kann statt Protein folgendes verwendet werden: Kohlenhydrate, Polysaccharide, Lipopolysaccharide, Poly(amino)säuren, Nucleinsäuren und ähnliches, von ausreichender Größe und Immunisierungsstärke. Zu den Syntheseverfahren für diese Alternativen können diejenigen mit Erfahrung im Fachgebiet, basierend auf der Offenbarung hierin, gelangen.

[0057] Wie in **Fig.** 6 gezeigt, wird zwischen einem

der Ligandenmoleküle im MLC und dem Protein eine Amidbindung hergestellt, durch die Umwandlung der Carboxylgruppe zu einem N-Hydroxysuccinamid-aktiven Ester (Formel L_{13}, **Fig.** 6). Der zweite Ligand im MLC, der nicht in die Bildung einer kovalenten Bindung zum Protein involviert ist, wird in Form des n-Butylamids verwendet (Formel L_{14}, **Fig.** 6). Dies wird gemacht, um die Carboxylgruppe des zweiten Liganden für die Metall-Bindung nicht verfügbar zu machen und um ein strukturelles Analogon der konjugierten Form des Liganden zu produzieren, der an das Protein über die 4-Kohlenstoff Seitenkette eines Lysinrestes (Formel M_3, **Fig.** 6) gebunden ist. Die bevorzugten Konjugations-Schemata involvieren die Reaktion des Proteins mit einem vorgeformten TMLC, in dem ein Ligand aktiviert ist (z. B. Formel M_2, **Fig.** 6). Alternativ (**Fig.** 7) wird das Protein zuerst mit einem freien, aktivierten Liganden (L_{13}) reagiert, und das resultierende Protein-Ligand-Konjugat (Formel L_{15}, **Fig.** 7) wird zuerst mit dem Metallion inkubiert; um das Intermediat M_4 (**Fig.** 7) zu ergeben, dann mit dem Liganden in Form des n-Butylamids, um das endgültige MLC-Protein Konjugat (M_3, **Fig.** 7) zu ergeben.

[0058] Wenn MLC-Protein Konjugate zum Zwecke des Testens der Kreuzreaktivität hergestellt werden, ersetzt ein potentiell kreuzreaktives, nicht-Ziel Metallion (z. B. Eisen(III), wenn das Metallion von Interesse Blei(II) ist) das Metallion von Interesse in den in **Fig.** 6 und 7 gezeigten Reaktionsschemata. Es versteht sich von selbst, dass in manchen Fällen die Stöchiometrie des MLC eines kreuzreagierenden Metalls nicht diesselbe sein könnte, als die des entsprechenden MLC des Metallions von Interesse.

Biologische Bindemittel wie z. B. monoklonale Antikörper

[0059] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf biologische Bindemittel, die spezifische Bindestellen mit hoher Affinität für MLC besitzen. Speziell bezieht er sich auf biologische Bindemittel wie z. B. monoklonale Antikörper oder rekombinante Polypeptide, die MLC, welche zwei oder mehrere Liganden zusammen mit dem Metallion von Interesse umfassen – d. h. TMLC und jene mit höheren Gliedern an Liganden, erkennen und starke Bindungen damit eingehen.

[0060] Diese Antikörper reagieren mit einem Epitop, das Strukturmerkmale von mindestens zwei Liganden in einem MLC kombiniert, während sie nur minimale Reaktivität mit entweder dem einzelnen Liganden oder mit dem Metallion an sich zeigen, d. h. diese Antikörper erkennen ein Epitop, das für den gänzlich gebildeten MLC charakteristisch ist. Zusätzlich zur Interaktion mit den organischen Netzwerken von mindestens zwei der Liganden in einem Komplex kann die Kombinationsstelle des Antikörpers auch die Bildung einer oder mehrerer koordinativer Bindungen zwischen Seitenketten der Aminosäuren und dem Metallion involvieren, obwohl das keine Voraussetzung für die Gewinnung von Antikörpern ist, die nützliche Metallion-Spezifitäten aufweisen.

[0061] Außer ganzen Immunglobulinen, schließen die Antikörper hierin Antigen-bindende Fragmente von Immunoglobulinen ein. Beispiele für diese Fragmente sind Fab, $F(ab')_2$ und Fv. Solche Fragmente können durch bekannte Verfahren hergestellt werden.

[0062] Für jedes gegebene Metallion besteht der Prozeß der Entwicklung eines Antikörpers, der für das Metall spezifisch ist, aus folgendem: a) Wahl eines MLC des Metallions, der mindestens zwei Liganden enthält; und b) Herstellung eines Immunogens, in dem der besagte MLC kovalent an ein Trägerprotein gebunden ist, um ein MLC-Protein-Konjugat zu bilden, das als Immunogen dient. Antikörper, die Metallion-Spezifität aufweisen, können gegen MLC von Hauptgruppenmetall-Ionen, Übergangsmetall-Ionen oder Metallionen der Lanthanoid- oder Actinoid-Serie der Elemente erzeugt werden. Die bevorzugten Immunogene sind MLC-Protein Konjugate mit mehr als zwei Liganden, und noch bevorzugter sind die Liganden diejenigen, die in den oben erörterten **Fig.** 1 und 4 gezeigt werden. Ein Beispiel für das bevorzugte MLC-Protein Konjugat wird in Beispiel 7, darunter, beschrieben.

[0063] Das Immunogen kann zur Herstellung von sowohl monoklonalen als auch polyklonalen Antikörpern verwendet werden, entsprechend den im Fachgebiet bekannten Verfahren, zur Verwendung in einem Immunoassay-System entsprechend der vorliegenden Erfindung. Im allgemeinen wird einem Wirtstier, wie Kaninchen, Ziege, Maus, Meerschweinchen oder Pferd in eine oder mehrere einer Vielzahl von Stellen das Immunogen injiziert, üblicherweise in einer Mischung mit einem Adjuvans. An derselben Stelle oder an anderen Stellen werden weitere Injektionen gegeben, in regelmäßigen oder unregelmäßigen Intervallen danach, wobei Aderlass durchgeführt wird, um den Antikörpertiter zu bewerten, bis bestimmt wurde, dass der optimale Titer erreicht worden ist. Die Antikörper werden entweder durch Aderlass des Wirtstiers erhalten, um ein Volumen an Antiserum zu ergeben, oder durch Techniken der Hybridisierung von somatischen Zellen, oder durch andere im Fachgebiet bekannte Techniken zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern, und sie können, zum Beispiel, bei –20°C gelagert werden.

[0064] Die monoklonalen Antikörper können mit Hilfe des Verfahrens von Kohler und Milstein (Nature, 256, 495–497 (1975) hergestellt werden, durch die Immortalisierung von Milzzellen von einem Tier, das mit dem Immunogen oder mit einem Fragment davon inokuliert wurde, üblicherweise durch Fusion mit einer immortalisierten Zelllinie (vorzugsweise einer Myelom-Zelllinie) der gleichen oder einer anderen Spezies wie das inokulierte Tier, gefolgt von den geeigneten Klonierungs- und Screening-Schritten. In der vorliegenden Erfindung werden die resultierenden Hyb-

ridoma auf die Produktion von monoklonalen Antikörpern hin gescreent, die an den Ziel-MLC binden, aber nicht an die freien Liganden oder den MLC von nicht-Ziel Metallionen.

[0065] Der vorliegenden Erfindung entsprechende monoklonale Antikörper bieten den Vorteil einer hohen Spezifität für das Ziel-Metallion. Die spezifische Bindung an den gewählten ternären (oder von höherer Molekularität) Komplex des Ziel-Metallions ist auch beim Vorhandensein eines massiven Überschusses irgendeines kontaminierenden nicht-Ziel-Metalls oder freien Liganden oder beider erreichbar. Dieses ermöglicht die Konfiguration von empfindlichen und spezifischen Immunoassays für ein Metallion von Interesse, durch Zugabe einer Kombination von mindestens zwei Liganden zu Proben, von denen angenommen wird, dass sie das Ziel-Metallion enthalten, und durch die Verwendung eines Antikörpers der vorliegenden Erfindung, um das Vorhandensein des Ziel-MLC zu prüfen. Es wird angenommen, dass der erstaunlich hohe Grad an Spezifität, der von den Antikörpern der vorliegenden Erfindung entfaltet wird, aufgrund der Tatsache auftritt, dass die größere Anzahl der Freiheitsgrade, die für 3-Komponenten (oder mehr) -molekulare-Komplexe intrinsisch ist, im Vergleich zu ihren 2-Komponenten-Gegenstücken eine weitere Spanne an möglichen Ligandenkonformationen und Ligand-Metall Stöchiometrien zur Folge hat und somit eine größere Wahrscheinlichkeit besteht, dass eine bestimmte Form existiert, die für das bestimmte Metallion von Interesse einzigartig ist.

[0066] Die Antikörper können auch rekombinante monoklonale Antikörper sein, die entsprechend den in Reading, United States Patent Nummer 4.474.893 oder Cabilly et al., United States Patent Nummer 4.861,597 offenbarten Verfahren hergestellt werden. Die Antikörper können auch chemisch konstruiert werden, entsprechend dem Verfahren, das in Segel et al., United States Patent Nummer 4.676.980 offenbart wurde.

[0067] Spezifischere Verfahren für die Produktion polyklonaler und monoklonaler Antikörper, die für MLC spezifisch sind, wurden im Stand der Technik beschrieben (siehe die Diskussion darunter, die hierin zitierten Referenzen werden hierdurch durch Referenz eingeschlossen) und können für die Produktion von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern dieser Erfindung verwendet werden, außer dass die Immunogene und das Verfahren des Screenings für die gewünschten Antikörper die gleichen sein würden, wie diejenigen, die in dieser Erfindung beschrieben wurden. Diese Modifikationen erlauben die spezifische Produktion und Selektion von Antikörpern, die ein Epitop erkennen, das Strukturmerkmale von mindestens zwei Liganden in einem MLC kombiniert, die im Stand der Technik nicht gefunden werden. Die bevorzugten monoklonalen Antikörper sind für einen gegebenen Koordinationskomplex eines gegebenen Metallions und ein gegebenes Set an Liganden hochspezifisch. Vorzugsweise erkennen diese Liganden MLC basierend auf ihrer Form. Zusätzlich zur Erkennung von Strukturmerkmalen, die auf mindestens zwei Ligandenmolekülen vorhanden sind, kann die Antikörperbindungsstelle auch die Bildung von einer oder mehreren koordinativen Bindungen zwischen dem Metallion und den Aminosäuren-Seitenketten des Immunoglobulins involvieren. Es ist aber nicht essentiell, dass Aminosäuren-Seitenketten als Liganden funktionieren, damit ein Antikörper der vorliegenden Erfindung Spezifität für ein gegebenes MLC aufweist.

[0068] Somit überwinden die Antikörper der vorliegenden Erfindung das Problem der Kreuzreaktivität mit Metall-freien Formen des(der) Liganden und zeigen unerwartet hohe Spezifität für das Ziel-Metallion, das ein Hauptgruppenmetall, ein Übergangsmetall oder Metalle der Lanthanoid- oder Actinoid-Serie der Metalle sein kann. Somit können mit Hilfe dieser Antikörper empfindliche und spezifische Immunoassays für solche Metalle konfiguriert werden. Diese Antikörper können, zum Beispiel, zur Konstruktion von Assays für die Messung der Konzentration eines bestimmten Metalls in jeder Probe von Interesse verwendet werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden monoklonale Antikörper gegen Blei(II)-MLC verwendet, um Immunoassays für Bleiniveaus im Blut, Urin und anderen Körperfluiden und Geweben zu konstruieren, wobei solche-Assays für das Screening und die Überprüfung der Bleikonzentrationen im menschlichen Körper von nutzen sind.

[0069] Im Gegensatz dazu offenbart der Stand der Technik nur Antikörper gegen MLC, die einen Liganden des MLC oder das Metallion alleine erkennen. Die ersten Antikörper dieser Art wurden von Meares, et al., U.S. Patent No. 4.772.892 beschrieben, der ein Immunogen verwendete, das an den Indium(III) Komplex eines Aminobenzylderivats von EDTA gebundenes KLH umfasste. Es wurden Antikörper erhalten, die den In-EDTA Komplex mit hoher Affinität ($K = 4 \times 10$) banden. Obwohl diese Antikörper auch EDTA Komplexe anderer Metalle als das Indium binden würden, war die Affinitätskonstante für die Bindung an den In-EDTA Komplex um eine Größenordnung höher als die für jeden anderen untersuchten EDTA Komplex. Insgesamt erstreckten sich die Affinitätskonstanten für die Bindung der Antikörper an verschiedene divalente und trivalente Metallionen-Komplexe mit EDTA über einen 4 log Bereich. Die folgenden Offenbarungen haben monoklonale Antikörper beschrieben, die gegen den Cobalt(II)-Komplex von EDTA(Goodwin, et al., J. Nucl. Med., 29, 226–34 (1998)), die Indium(III)-Komplexe von DTPA (Elliette, et al., J. Immunol. Methods, 124, 277–82 (1989); Le Doussal, et al., Cancer Res., 50, 3445–52, (1990)), die Eisen(II)- und Cobalt(II)-Komplexe von mesotetrakis(Carboxyphenyl)porphyrin (Schwabacher, et al., J. Am. Chem. Soc., 111, 2344–46, (1990)), N-Methylmesoporphyrin IX (Cochran, et al., Science, 249,

781–83 (1990)), den Zinn(IV)-Komplex von meso-tetrakis(Carboxyvinylphenyl)porphyrin (Keinen, et al., Pure Appl. Chem , 62, 2013–19 (1990)) und den Gallium(III)-Komplex von HBED (Zoller, et al., J. Nucl. Med., 33, 1366–72 (1992)) erzeugt wurden. Zusätzlich zu diesen vorsätzlichen Bemühungen, um Antikörper gegen MLC herzustellen, ist eine polyklonale humorale anti-Chelat Antwort dokumentiert worden, als ein erwarteter Nebeneffekt bei manchen Krebspatienten, die intravenöse Infusionen mit einem monoklonalen Antikörper erhielten, der an den Yttrium(III)-Komplex von 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-N,N',N''-Tetraessigsäure (DOTA), einen makrozyklischen Polyamino-polycarboxylat – Chelatbildner (Kosmas, et al., Cancer Res., 52, 904–11 (1992)) konjugiert war.

[0070] Die anti-Porphyrin Systeme, von denen alle 1 : 1 Metall : Porphyrin Komplexe erkennen, sind als potentielle katalytische Antikörper interessant, während die verbliebenen anti-Chelat monoklonalen Antikörper für den Gebrauch in vivo entwickelt worden sind, in experimentellen Strategien für die Tumortherapie, die bispezifische Antikörper und radioisotope Metallionen verwenden, wie von Meares, et al., U.S. Patent No. 4.772.892 offenbart. Weil solche Strategien erfordern, dass die Metallkomplexe in vivo absolut stabil bleiben, wurden Chelatbildner gewählt, die Komplexe von sehr hoher thermodynaischer Stabilität bilden (EDTA, DTPA, HBED). Diese sind Chelatbildner von hoher Zähligkeit (6–8) und somit waren in all diesen vorangegangenen Offenbarungen die immunisierenden Spezies binäre MLC, die einen einzigen organischen chelatbildenden Liganden und ein einziges Metallion enthielten. Potentielle antigene Determinanten, die erhältlich waren, um eine Antwort auf diese Immunogene hervorzurufen, waren deshalb auf das organische Netzwerk eines einzigen chelatbildenden Liganden und, möglicherweise auf das Metallion selbst beschränkt.

[0071] Obwohl im allgemeinen erwartet wird, dass die organischen Komponenten eines MLC das immunogenste Merkmal darstellen, wurden monoklonale Antikörper beschrieben, die einfache, nicht in Chelate eingebundene, „ionische" Metallspezies erkennen. Finnegan, et al., EPO 0235457, offenbaren einen monoklonalen Antikörper gegen Gold(I)-Cyanid, der durch in vitro Sensitivisierung von Maus Milzzellen mit dem Metallsalz und die darauffolgende Fusion mit einer Myelomzelllinie erhalten wurde. Der resultierte Antikörper zeigte 29% Kreuzreaktivität mit Silber(I)-Cyanid. Wagner, et al., WO 9010709, offenbaren monoklonale Antikörper, die mit Metallkationen und insbesondere mit Hg(II) und Pb(LI) reagierten. Diese Antikörper wurden mit Hilfe von Standardverfahren erhalten, aus Mäusen, die mit BSA-Glutathion Konjugaten, welche mit dem Metallion von Interesse komplexiert waren, immunisiert worden waren. Im Falle von Quecksilber wurde gezeigt, dass der Antikörper mit den freien Quecksilberionen reagiert, unabhängig von den Koordinationsagenzien, und somit, dass die vorausgehende Bildung eines Quecksilberion-MLC nicht notwendig ist für die monoklonale-Antikörper-Erkennung des Quecksilberions.

[0072] Die anti-Chelat Antikörper des Stands der Technik zeigen Eigenschaften, die ihre Verwendung für die Konstruktion von Immunoassays für Metalle ernsthaft einschränken würde. Darunter steht in erster Linie die Metallion-Spezifität des Immunoglobulins. Wahrscheinlich ist eine 1–2 log Differenz bezüglich der Affinitätskonstanten zwischen dem Ziel-Metall und dem nächst-reaktiven für viele Anwendungen inadäquat, insbesondere für jene, die die Messung von Spurenmetallen in biologischen Proben involvieren, wo andere (nicht-Ziel) Metallionen vorhanden sein können, auf Niveaus 4 logs oder höher als das Ziel-Metall. Eine zweite Sorge ist die Reaktivität von anti-Chelat Antikörpern mit dem „leeren" (d. h. ohne Metall) chelatbildenden Agens. Für die Anwendungen in der Tumortherapie, für die die meisten anti-Chelat Antikörper entwickelt worden sind, bedeutet eine solche Kreuzreaktivität einige Probleme. In einem in vitro Immunoassay-Format aber wird die Konzentration des Ziel-Metalls aus der Probe im allgemeinen unbekannt sein und demzufolge wird es im allgemeinen notwendig sein, einen hohen Überschuß an chelatbildendem Agens zur Probe hinzuzufügen, um die vollständige Komplexierung zu gewährleisten. Darum werden die Proben oft signifikante Konzentrationen an freiem Chelatbildner enthalten, die in manchen Fällen die Konzentration an Chelat in der Probe um einige Größenordnungen übertreffen. Die Kreuzreaktivität des Antikörpers mit dem freien chelatbildenden Agens würde so künstlich hohe Werte für den Metallgehalt ergeben.

Affinitätschromatoaraphie für die Isolierung und Reinigung von Antikörpern, die mit MLC reaktiv sind

[0073] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt Medien für die Affinitätschromatographie bereit, die aus einem TMLC bestehen, der an eine geeignete feste Phase gekoppelt ist. Solche Medien für die Affinitätschromatographie werden verwendet, um monoklonale Antikörper, die mit MLC reagieren, zu isolieren und zu reinigen. Mit Hilfe einer Amino-derivatisierten Festphase, wie Aminoethyl-Sepharose 4B, können die gleichen Reaktionssequenzen, die zur Herstellung von MLC-Protein Konjugaten verwendet werden, zur Herstellung von mit MLC derivatisierten Sepharose Kügelchen verwendet werden. So wie die MLC-Protein Konjugate können Sepharose-Kügelchen erhalten werden, die entweder mit gemischtem oder symmetrischem TMLC, entweder vom Ziel-Metallion oder einem Metallion das kreuzreagiert, derivatisiert sind.

[0074] Die Reinigung von monoklonalen Antikörpern gegen binäre EDTA-Metall Komplexe mit Hilfe der Affinitätschromatographie wurde als schwierig berichtet, und Beidler, et al., U.S. 5.112.951, offenbaren die Verwendung von Oxosäure-derivatisierten

festen Trägern, wie Sulfopropyl-Harzen, als alternatives Mittel zur Reinigung von Antikörpern gegen 1 : 1 Metall-EDTA Chelate.

[0075] Die Medien für die Affinitätschromatographie der vorliegenden Erfindung bieten den Vorteil, dass der Antikörper unter relativ schonenden Bedingungen vom festen Träger freigesetzt werden kann, wobei jede einer Anzahl von Strategien verwendet werden kann. Weil das vom Antikörper erkannte Epitop den bestehenden MLC involviert, kann jeder Prozess, der die Dissoziation des besagten Komplexes verursacht, eine Basis für die kontrollierte Elution des Antikörpers von der Affinitätsmatrix bereitstellen. Solche Prozesse schließen Liganden-Austausch-Reaktionen im allgemeinen ein, wobei diejenigen, die kleine Liganden mit hoher Affinität für Metallionen (z. B. Cyanidionen) verwenden, besonders bevorzugt werden. Alternativ kann auch ein hoher Überschuß an einem nicht-Ziel Metallion verwendet werden, um eine Liganden-Austausch-Reaktion voranzutreiben, die den ternären Ziel-Komplex spaltet, wobei die Freisetzung des Antikörpers von der festen Phase verursacht wird. All diese Strategien haben eine Festphase als Ergebnis, die nach der Elution des Antikörpers noch immer den ersten, kovalent gekoppelten Liganden enthält. Die Regeneration des Mediums für die Affinitätschromatographie wird deshalb mit Leichtigkeit erreicht, durch die erneute Gleichgewichtseinstellung der Festphase mit frischem Ziel-Metallion und zweitem (nicht kovalent gebundenen) Liganden.

Aktivitäts-Assays

[0076] In einer bevorzugten Assay Konfiguration wird eine Festphase mit MLC-Protein Konjugaten beschichtet und zum Auffangen von MLC-reaktiven Antikörpern verwendet. Verwendet man erneut Blei (II) als Beispiel, werden 96-„well" Mikrotiterplatten mit Blei(II)-MLC-Protein Konjugaten beschichtet (z. B. Formel M_3). Die Platte, die das adsorbierte MLC-Protein Konjugat trägt, wird dann in einem ELISA Assay verwendet, in dem Proben, von denen angenommen wird, dass sie Ratten MLC-reaktive Antikörper enthalten, in den „wells" inkubiert werden, die dann gewaschen und einem anti-Maus-Antikörper ausgesetzt werden (z. B. Ziegen-anti-Maus), der mit einem Signal-erzeugenden Anteil (z. B. Meerrettichperoxidase (HRPO)) konjugiert ist.

[0077] Die Antikörper, die mit dem obigen Assay mit dem MLC des Metallions von Interesse reaktiv sind, werden dann weiter getestet, um ihr Muster an Kreuzreaktivität mit analogen MLC zu bestimmen, die aus dem(n) gleichen Liganden plus einem nicht-Ziel Metallion konstruiert werden. Werden, zum Beispiel, Gewebekulturmedien von Hybridoma Überständen auf Antikörper, die für die vorliegende Erfindung nützlich sind, gescreent, dann werden drei sequenzielle Analysen (entweder Mikrotiterplatten ELISA oder FPIA) verwendet. Der erste Schritt der Sequenz verwendet das Ziel-MLC entweder als MLC-Protein Konjugat (wie MLC-BSA Konjugat für ELISA) oder als Tracer (wie Fluorescein-Tracer für FPIA), um alle MLC-reaktiven Antikörper, die im Gewebekulturmedium vorhanden sind, zu identifizieren. Diese MLC-reaktiven Antikörper werden dann auf das entsprechende freie Ligand-Protein Konjugat (wie freies Ligand-BSA für ELISA) oder den freien Ligand-Tracer (wie freier Ligand-Fluorescein Tracer für FPIA) getestet, und die Antikörper, die in diesem Assay reaktiv sind, werden verworfen, weil sie das Kriterium der Bindung von zwei oder mehreren Liganden in einem MLC nicht erfüllen. Die Antikörper, die mit dem Ziel-MLC reagieren, aber nicht mit dem entsprechenden freien Liganden, werden dann weiter auf Reaktivität gegenüber analogen MLC von Metallen, die kreuzreagieren, gescreent.

[0078] Somit wird dann, im Falle von ELISA-Screening auf einen Blei(II)-selektiven Antikörper, jeder Antikörper, der mit der Blei(II) MLC-Protein beschichteten Platte reagiert, in ähnlichen Assays getestet, in denen Mikrotiterplatten mit den Eisen(II), Kupfer(II) oder Zink(II) Analoga von M_3 beschichtet werden. Jeder Antikörper, der mit der Blei(II)-MLC-Protein beschichteten Platte reagiert, wird auch auf Reaktivität gegenüber freien Liganden getestet, mit Hilfe eines analogen ELISA Assays, in dem das Ligand-Protein Konjugat (Formel L_{15}, **Fig.** 7) zur Beschichtung der Platte verwendet wird. Die Blei(II) reaktiven Antikörper werden basierend auf ihrer minimalen Reaktivität mit den freier-Ligand- und nicht-Ziel-Metall- Platten und der maximalen Reaktivität mit der Blei(II)-MLC-Platte identifiziert.

[0079] Im FPIA Screening würde die Reaktivität einer Probe, von der angenommen wird, dass sie einen M_3-reaktiven Antikörper enthält, mit Hilfe von fünf fluoreszenten Tracer abgeschätzt werden: Li_6 (**Fig.** 8), $(Li_6)_2Pb$, $(Li_6)_3Fe$, $(Li_6)_2Cu$ und $(Li_6)_2Zn$ Erneut wird jede Probe, die eine Polarisationsänderung mit $(Li_6)_2Pb$ verursacht, gegen die anderen Tracer getestet, und es werden Antikörper ausgewählt, die nach der Bindung an $(Li_6)_2Pb$ eine starke Polarisationsänderung verursachen, aber eine schwache oder keine Änderung in Gegenwart von Li_6, $(Li_6)_3Fe$, $(Li_6)_2Cu$ oder $(Li_6)_2Zn$.

Fluoreszierende Ligand und MLC Tracer

[0080] Die Reaktionssequenzen, die jenen, die zur Herstellung von TMLC-Protein und Festphasen-TMLC Konjugate verwendet wurden, analog sind, können auch verwendet werden, um Konjugate zu erhalten, die einen detektierbaren Marker umfassen, der an einen freien Liganden oder an ein TMLC gebunden ist. Bevorzugte detektierbare Marker sind Fluorophore, wobei Fluorescein besonders bevorzugt wird. Die Beispiele anderer detektierbarer Marker werden weiter unten beschrieben. Die Herstellung solcher Fluorescein-markierter Tracer kann erneut veranschaulicht werden, wobei als Beispiel ein bevorzugter Blei(II)-MLC (Formel M_1, **Fig.** 5) verwen-

det wird. Somit wird die aktivierte Form des Liganden (Formel L_{13}, **Fig.** 6) entweder mit 5-Aminofluorescein oder mit 5-Aminomethylfluorescein reagieren gelassen, um einen Ligand-Fluorophor-Tracer (Formel Li_6, **Fig.** 8) zu bilden. Die entsprechenden MLC-Fluorophor-Tracer können entweder einen fluoreszierend markierten Liganden (z. B. $((Li_6)(L_{14})Pb)$ enthalten Oder aber zwei (z. B. $((Li_6)_2Pb)$).

[0081] Einem Aspekt der vorliegenden Erfindung entsprechend, haben die besonders bevorzugten fluoreszierend markierten Misch-Ligand-TMLC die in **Fig.** 9 gezeigte Struktur. Solche TMLC, die einen fluoreszierenden Liganden und einen aktivierten, Aminreaktiven Liganden enthalten, können in einer Vielfalt von Formaten funktionieren, als selektiv spaltbare, Metallion-abhängige fluoreszierende Marker für Proteine, Festphasen, Polynucleotide, etc.

[0082] Es versteht sich auch von selbst, dass ein Spacerarm in jedes MLC- oder Ligand- Konjugat der vorliegenden Erfindung inkorporiert werden kann, unabhängig davon, ob das Konjugat mit einem Protein, einer Festphase, einem Fluorophor oder jedem anderen solchen Substrat gebildet wurde. Dieses wird durch im Fachgebiet wohlbekannte Verfahren erreicht, wobei bifunktionelle Linker (p-Q-r, a-B-c) verwendet werden, um Strukturen des allgemeinen Typs, der in den **Fig.** 10 und 11 gezeigt wird, zu produzieren. Die Bindung p'-Q-r (**Fig.** 10) ist ein bifunktioneller Spacerarm, worin p' der Rest ist aus der Reaktion einer der funktionellen Gruppen des bifunktionellen Linkers (p) mit der Carboxylat (oder aktiviertes Carboxylester)-Funktion, die im Liganden oder im MLC vorhanden ist, und r ist eine funktionelle Gruppe, die gegenüber entsprechenden Funktionalitäten auf Proteinen, Fluorophoren, Festphasen, etc. reaktiv ist. In ähnlicher Weise ist a'-B-c ein Spacerarm, worin a' der Rest ist aus der Reaktion einer der funktionellen Gruppen des bifunktionellen Linkers (a) mit der Sulfhydryl-Funktion, die im Liganden oder im MLC vorhanden ist. Im allgemeinen sind, bei der Herstellung von MLC oder Ligand Konjugaten der vorliegenden Erfindung, Q und B Bindungsanteile, die aus 0–50 Kohlenstoff- und Heteroatomen bestehen, einschließlich nicht mehr als 10 Heteroatomen, die in einer geraden oder verzweigten Kette oder in einem zyklischen Anteil oder in jeder Kombination davon angeordnet sind, gesättigt oder ungesättigt, unter den Bedingungen, dass: (1) nicht mehr als 2 Heteroatome direkt verbunden sein dürfen; (2) Q und B keine -O-O- Bindungen enthalten können; (3) die zyklischen Anteile 6 oder weniger Glieder enthalten; und (4) Verzweigungen nur an Kohlenstoffatomen vorkommen können. Die Heteroatome können Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel und Phosphor einschließen. Die Beispiele für Q und B sind Alkandiyl, Aralkandiyl und mit Alkandiyl substituierte Cykloalkandiyl-Gruppen. C und r werden ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Hydroxy- (-OH), Carboxy- (-C(=O)OH), Amino- ($-NH_2$), Aldehyd- (-CHO) und Azido- ($-N_3$). A und p werden ausgewählt aus der Gruppe, die aus folgendem besteht: -OH, -Halogen (z. B. Cl, Br, I), -SH und -NHR', worin R' ausgewählt wird aus H, Alkyl, substituiertes Alkyl und Aryl.

[0083] Während die fluoreszierende Markierung bevorzugt wird, kann jeder andere Signal-erzeugende Anteil (chemilumineszierend, radioisotop, etc.) auf ähnliche Weise an die TMLC der vorliegenden Erfindung konjugiert werden, um Tracer-Moleküle zu bilden. Die besagten Tracer werden in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung entsprechenden Antikörpern verwendet, um Immunoassays zu konfigurieren, für das Messen der Konzentration eines bestimmten Ziel-Metallions in jeder Probe von Interesse. Während jede Assay-Konfiguration, die zum Messen von Haptenspezies mit niedriger MW nützlich ist, zum Messen von TMLC Konzentrationen verwendet werden kann, werden die Konkurrenz-Fluoreszenzpolarisations-Immunoassays (FPIAs) bevorzugt, und sie können zur Veranschaulichung der allgemeinen Verfahren und Prinzipien, denen solche Assays unterliegen, verwendet werden:

[0084] Im allgemeinen basieren die FPIA auf dem Prinzip, dass ein fluoreszierender Tracer, wenn er von linear polarisiertem Licht mit einer charakteristischen Wellenlänge angeregt wird, Licht bei einer anderen charakteristischen Wellenlänge emittieren wird (d. h. Fluoreszenz), das einen Grad der Polarisation zurückhalten wird, relativ zum einfallenden stimulierenden Licht, der zur Rotationsrate des Tracer in einem gegebenen Medium umgekehrt proportional ist. Als Folge dieser Eigenschaft wird eine Tracersubstanz mit beschränkter Rotation, wie in der Phase einer viskosen Lösung oder wenn sie an eine andere Lösungskomponente mit relativ niedriger Rotationsrate gebunden ist, einen relativ höheren Grad an Polarisation des emittierten Lichts zurückhalten, als wenn sie in freier Lösung wäre.

[0085] Bei der Durchführung eines Fluoreszenzpolarisations-Immunoassays für die spezifische Quantifizierung eines spezifischen Metallions, entsprechend der vorliegenden Erfindung, wird eine Testprobe, von der angenommen wird, dass sie das Metallion enthält, mit dem(n) Liganden und dem Antiserum oder den monoklonalen Antikörpern, die mit Immunogenen entsprechend der vorliegenden Erfindung hergestellt sind, in Kontakt gebracht, in Gegenwart eines markierten Reagens der vorliegenden Erfindung, das in der Lage ist, eine detektierbare Fluoreszenzpolarisations-Antwort auf das Vorhandensein von Antiserum oder monoklonalen Antikörpern, die mit Immunogenen entsprechend der vorliegenden Erfindung hergestellt sind, zu produzieren. Linear polarisiertes Licht wird dann durch die Lösung hindurchgeleitet, um eine Fluoreszenzpolarisations-Antwort zu erhalten und die Antwort wird detektiert, als Maß der Menge an in der Testprobe vorhandenem Metallion.

[0086] Somit wird im Folgenden ein Beispiel für ein FIPA für ein Metall vorgestellt:

[0087] In einem Vorbehandlungsverfahren der Probe wird die Probe (die eine biologische Probe sein

kann, konkret eine Blutprobe) zuerst behandelt, um das Metallion in einer ionischen, löslichen Form freizusetzen. Solch eine Behandlung wird im allgemeinen die Zugabe einer starken Säure und/oder eines Detergens einschließen. Die resultierende Lösungs-Phase, die das Metallion von Interesse in ionischer Form bei einem niedrigen pH-Wert enthält, wird dann mit einem oder mehreren Liganden behandelt, unter Bedingungen, die die Bildung des Ziel-MLC begünstigen. Solche Bedingungen werden oft die Neutralisation der behandelten Probe in den pH-Bereich von 6–9 involvieren. Oft ist es passend diesen Schritt durch die Zugabe einer einzigen Lösung zu erreichen, die das(die) Puffersalz(e) und den(die) Liganden enthält, wobei die Pufferkonzentration(en), die Konzentration eines jeden Liganden und der pH-Wert der Endlösung so gewählt wird, dass die Bildung des Ziel-MLC optimiert wird. Die resultierende Lösung wird dann zusammen mit a) einem monoklonalen Antikörper entsprechend der vorliegenden Erfindung, der für den Ziel-MLC spezifisch ist, und b) einem Tracermolekül, das den gleichen MLC beinhaltet, der an ein Fluorophor konjugiert ist, inkubiert. Die Konzentrationen des Antikörpers und des Tracers werden so gewählt, dass der durch das in der Probe vorhandene Ziel-Metall gebildete MLC effektiv mit dem Tracer um eine limitierte Anzahl an Antikörperbindestellen konkurriert, innerhalb des Metallion-Konzentrationsbereiches von Interesse. Das Messen der Fluoreszenzpolarisation der resultierenden Lösung stellt ein Maß bereit für den Anteil an Fluorophor, der an den Antikörper gebunden ist Die Konzentration des Ziel-Metallions in der Probe wird dann aus einer Standardkurve berechnet, die die Fluoreszenzpolarisation zur Metallionkonzentration im Verhältnis darstellt.

[0088] Der FIPA kann in kommerziell erhältlichen automatisierten Instrumenten durchgeführt werden, wie die IMx®, TDx® und TDxFLx™ Instrumente (erhältlich von Abbott Laborstories, Abbott Park. Illinois, U.S.A.).

[0089] Während sie für die Entwicklung von empfindlichen und spezifischen Immunoassays für Metallionen besonders nützlich sind, wird erwartet, dass die Antikörper der vorliegenden Erfindung in einer breiten Vielfalt von anderen Anwendungen von Nutzen sein werden. So zum Beispiel wird erwartet, dass die der vorliegenden Erfindung entsprechenden Antikörper bei der Trennung und Wiedergewinnung von bestimmten Metallionen aus komplexen Gemischen von Nutzen sein werden, mit Hilfe von Immunaffinitäts-Techniken. Somit könnte ein Antikörper der vorliegenden Erfindung auf einem festen Träger immobilisiert werden und die resultierende Affinitätsmatrix für die Wiedergewinnung von Metallionen aus Verfahrensströmen (z. B. Gold im Elektroplattieren, Silber in der Fotoentwicklung, etc.) verwendet werden. Viele solcher Beispiele werden für diejenigen mit Erfahrung im Fachgebiet offensichtlich sein.

B. Andere Assayformate

[0090] Zusätzlich zu FPIA können verschiedenen anderen Immunoassay-Formaten gefolgt werden, für die Quantifizierung eines spezifischen Metallions entsprechend der vorliegenden Erfindung. Solche Immunoassaysystem-Formate schließen, ohne darauf beschränkt zu sein, kompetitive, Sandwich und immunometrische Techniken, ein. Im allgemeinen sind solche Immunoassaysysteme abhängig von der Fähigkeit eines Immunoglobulins, d. h. eines ganzen Antikörpers oder Fragmenten davon, an einen spezifischen Analyten aus einer Testprobe mit einem markierten Reagens zu binden, das einen Antikörper der vorliegenden Erfindung, oder ein Fragment davon, umfasst, gebunden an einen Marker oder einen detektierbaren Anteil. Solche detektierbaren Marker schließen ein, ohne darauf beschränkt zu, sein, Enzyme, Radiomarker, Biotin, Toxine, Medikamente (Drogen), Haptene, DNA, RNA, Liposome, Chromophore, chemilumineszierende Mittel, farbige Partikel und farbige Mikropartikel, fluoreszierende Verbindungen, wie Aminomethylfluorescein, 5-Fluoresceinyl, 6-Fluoresceinyl, 5-Carboxyfluorescein, 6-Carboxyfluorescein, Aminofluorescein, Thioureafluorescein und Methoxytriazinolylaminofluorescein und ähnliche fluoreszierende Derivate.

[0091] Typischerweise wird das Ausmaß der Bindung bei solchen Immunoassaysystem-Formaten von der Menge des detektierbaren Anteils bestimmt, die im markierten Reagens vorhanden ist, das entweder an der Bindungsreaktion mit dem Analyten teilgenommen hat oder nicht, worin die Menge an detektiertem und gemessenem detektierbaren Anteil mit der Menge an Analyt, der in der Testprobe vorhanden ist, korreliert werden kann. So zum Beispiel konkurriert in einem kompetitiven Immunoassaysystem eine. zu messende Substanz mit einer Substanz von naher Strukturähnlichkeit, die an einen detektierbaren Anteil gekoppelt ist, der oft als Tracer bezeichnet wird, um eine begrenzte Anzahl von Bindestellen auf Antikörpern, die spezifisch sind für den Teil oder die Teile des Analyten und des Tracers mit Strukturähnlichkeit, die mit der eines Immunogens gemeinsam ist, das für die Produktion solcher Antikörper verwendet wurde. Ein Beispiel eines solchen Assays würde folgendes involvieren: (a) in Kontakt bringen einer Testprobe (von der angenommen wird, dass sie einen Analyten von Interesse enthält) mit einem markierten Reagens (d. h. einem Tracer) und einem Antikörper, der in der Lage ist, das markierte Reagens und den Analyten zu binden, um eine Reaktions-Lösung zu bilden; (b) Inkubation der Reaktionslösung für eine ausreichend lange Zeitspanne, um es dem Antikörper zu erlauben, an das markierte Reagens und den Analyten, falls vorhanden, zu binden; und (c) Messen der Menge an markiertem Reagens in der Reaktionshsung, der an besagte Antikörper gebunden ist, als Funktion der Menge an Analyt in der Testprobe. Der Tracer und der Antikörper können der

Testprobe gleichzeitig hinzugefügt werden oder aufeinanderfolgend, in keiner bestimmten Reihenfolge.

[0092] Vorzugsweise wird der Antikörper nach der Zugabe des Tracer der Testprobe hinzugefügt. Der bevorzugte Assay verwendet M_6 Tracer mit Antikörpern, die mit dem M_3 Immunogen erzeugt wurden, worin das Protein BSA ist. Die bevorzugten Beispiele für Immunogene und Tracer werden in den Beispielen 7 und beziehungsweise 8, darunter, gezeigt.

V. Test-Kits

[0093] Ein der vorliegenden Erfindung entsprechender Test-Kit umfasst alle essentiellen Reagenzien, die notwendig sind, um einen erwünschten Assay für die Quantifizierung eines spezifischen Metallions in einer Testprobe durchzuführen. Die Beispiele für solche Immunoassays schließen einen FPIA ein. Der Test-Kit wird vorzugsweise in einer kommerziell verpackten Form präsentiert, als Kombination aus einem oder mehreren Behältern, die die notwendigen Reagenzien enthalten, als Zusammensetzung oder Beimischung, dort wo die Kompatibilität der Reagenzien dieses erlauben.

[0094] Besonders bevorzugt ist ein Test-Kit für die FPIA-Quantifizierung eines spezifischen Metallions in einer Testprobe, die jedwelche Liganden, Tracer und Antikörper umfasst, wie in dieser Patentanmeldung für die Quantifizierung eines spezifischen Metallions beschrieben. Es versteht sich von selbst, dass der Test-Kit andere im Fachgebiet bekannte Materialien umfassen kann, die vom Standpunkt eines Anwenders aus erwünscht sein können, wie Puffer, Verdünner, Standards und Ähnliches.

[0095] Zur Veranschaulichung der Erfindung werden in den folgenden Beispielen bifunktionelle dreizählige Liganden bereitgestellt, die zum Binden von Blei(II) geeignet sind, zusammen mit ternären Komplexen dieser Liganden mit Blei(II) und monoklonalen Antikörpern, die für die besagten TMLC spezifisch sind. Ein homogener Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay zum Messen der Niveaus an Blei im Blut und anderen biologischen Proben wird bereitgestellt, basierend auf einem monoklonalen Antikörper, der für ein Blei(II)-TMLC spezifisch ist.

BEISPIEL 1

SYNTHESE VON LIGAND L_9 (X=-OH, **Fig.** 6)

[0096] Chinolin-2-carboxaldehyd ((15,7 g, 100 mmol) wurde unter Rühren in unter Rückfluß kochendem McOH (140 ml) gelöst. Die resultierende Lösung wurde bei Rückfluß gerührt und eine Lösung von D-Penicillamin (14,9 g, 100 mmol) und NaOH (4,0 g, 100 mmol) in McOH (40 ml) wurden hinzugefügt, über eine Zeitspanne von 10 Min in 1–2 ml Aliquoten. Nach Rühren unter Rückfluß für weitere 3 Std. wurde die Lösung auf Raumtemperatur gekühlt (hierin auch als „RT" bezeichnet) und auf ca. 125 ml aufkonzentriert, mit Hilfe eines Rotationsverdampfers. Die resultierende Lösung wurde gerührt und konz. HCl (10 ml) wurde in 1 ml Aliquoten hinzugefügt. Die Zugabe des letzten Säure-Aliquots produzierte einen dichten weißen Niederschlag, der abfiltriert wurde, mit McOH/HCl (2 × 30 ml) gewaschen und unter Vakuum getrocknet wurde, um 20,53 g (71%) $Ligand_9$ (X-OH, **Fig.** 6) zu ergeben. Mass. Spek. (DCI) m/e 289 $(M+H)^+$, 243 $(M+H\ -CO_2H)^+$, 211 $(M+H\ -CO_2H\ -SH)^+$; ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) d 8,22–8,48 (m, 1H), 8,03–8,11 (m, 1H), 7,88–7,95 (m, 1H), 7,73–7,82 (m, 1H), 7,56–7,68 (m, 1H), 7,45 (d, 1H), 5,98 (s, 1H), 4,84 (s, 1H), 4,00 (s, 1H), 1,70 (s, 3H), 1,47 (s, 3H).

[0097] Die Liganden L_{10}, L_{11} und L_{12} wurden ähnlich hergestellt, wobei Pyridin-2-carboxaldehyd, di-2-Pyridylketon beziehungsweise Isochinolylphenylketon verwendet wurde, statt dem Chinolin-2-carboxaldehyd aus dem obigen Beispiel.

BEISPIEL 2

BILDUNG EINES SYMMETRISCHEN TMLC AUS Pb(II) UND LIGAND L_{10}

[0098] Eine Lösung aus Ligand L_{10} (X=-OH, **Fig.** 6, 2,38 g, 10 mmol) und NaOH (0,8 g, 20 mmol) in McOH (40 ml) wurde bei RT gerührt und eine frisch vorbereitete Lösung $Pb(OAc)_2{\cdot}3H_2O$ (1,89 g, 5,0 mmol) in McOH (15 ml) wurde tröpfchenweise hinzugefügt, wobei eine kleine Menge eines weißen Niederschlags entstand. Nach Rühren bei RT für weitere 4 Std. wurde das Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat zur Trockenheit verdampft, um den symmetrischen TMLC $Pb(L_9)_2^{2-}$ zu ergeben. Ausbeute 2,48 g (73%). Mass. Spek (FAB) m/e 727 $(M+2Na)^+$, 705 $(M+H+Na)^+$. Die beobachteten Isotopenverteilungs-Muster für sowohl die m/e 705 als auch die m/e 727 Ausgangs-Molekularionen stimmten mit den vorausgesagten (basierend auf den 4 natürlich vorkommenden stabilen Isotopen des Bleis) überein.

BEISPIEL 3

BILDUNG EINES MISCH-LIGAND TMLC: $((L_{10})(L_{11})Pb)$

[0099] Eine Lösung aus Ligand L_{10} (X=-OH **Fig.** 6, 1,19 g, 5,0 mmol) und NaOH (0,4 g, 10 mmol) in McOH (20 ml) wurde bei RT gerührt und eine frisch vorbereitete Lösung $Pb(OAc)_2{\cdot}3H_2O$ (1,89 g, 5,0 mmol) in McOH (15 ml) wurde als Bolus hinzugefügt. Die resultierende Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt und dann filtriert. Das Filtrat wurde dann gerührt, während eine Lösung aus Ligand L_{11} (X=-OH **Fig.** 6, 1,58 g, 5,0 mmol) und NaOH (0,40 g, 10 mmol) in McOH (30 ml) tröpfchenweise hinzugefügt wurde. Nach Rühren bei RT für weitere 2 Std. wurde das Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat zur Trockenheit verdampft, um den asymmetrischen TMLC $Pb((L_{10})(L_{11})Pb)^{2-}$ als gelben Feststoff zu geben (3,36

g, 89%). Mass. Spek (FAB) m/e 804 $(M+2Na)^+$, 782 $(M+H+Na)^+$.

BEISPIEL 4

HERSTELLUNG EINES LIGANDEN, DER EINE AKTIVIERTE GRUPPE FÜR DIE DARAUFFOLGENDE KONJUGATION TRÄGT: SYNTHESE VON LIGAND L_{13}

[0100] Der Ligand L_9 (8,64 g, 30 mmol) und N-Hydroxysuccinamid (3,45 g, 30 mmol) wurden in THF (250 ml) suspendiert. Die resultierende Mischung wurde bei RT gerührt und eine Lösung Dicyclohexylcarbodiimid (6,18 g, 30 mmol) in THF (20 ml) wurde hinzugefügt. Das Rühren bei RT wurde für weitere 24 Std. fortgesetzt, dann wurde das Reaktionsgemisch filtriert. Das Filtrat wurde unter Vakuum auf ca. 30 ml auf konzentriert, wobei ein wenig zusätzlicher weißer Niederschlag entstand, der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde dann gerührt und es wurde Hexan (120 ml) tröpfchenweise hinzugefügt, worauf das Produkt als dichter weißer Feststoff ausfiel. Dieser wurde abfiltriert, mit Hexan (50 ml) gewaschen und unter Vakuum getrocknet, um 9,54 g (83%) Ligand L_{13} (**Fig.** 6) zu geben. Mass. Spek. (FAB) m/e 386 $(M+H)^+$, ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) d 8,07–8,15 (m, 2H), 7,78–7,83 (m, 1H), 7,68–7,75 (m, 1H), 7,50–7,56 (m, 1H), 7,56–7,68 (m, 1H), 7,26–7,29 (m, 1H), 5,99 (d, 1H), 5,17 (t, 1H), 4,23 (d, 1H), 2,89 (s, 4H), 1,80 (s, 3H), 1,52 (s, 3H).

BEISPIEL 5

HERSTELLUNG EINER BLOCKIERTEN, n-BUTYLAMID-FORM EINES LIGANDEN SYNTHESE VON LIGAND L_{14}

[0101] sLigand L_{13} (1,93 g, 5,0 mmol) wurde in Et_2O (60 ml) suspendiert und die resultierende Mischung wurde heftig bei RT 15 Min lang gerührt. Die kleine Menge nicht gelösten Festkörpers, die zu der Zeit übriggeblieben war, wurde durch Filtration entfernt. Das Filtrat wurde gerührt und eine Lösung n-Butylamin (0,37 g, 5,0 mmol) in Et_2O (5 ml) wurde hinzugefügt, wodurch ein sofortiger weißer Niederschlag entstand. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 60 Sek. lang gerührt, dann wurde es schnell filtriert. Das Filtrat wurde bei RT über Nacht ungestört stehen gelassen, wobei während dieser Zeitspanne das Produkt an den Wänden des Kolbens kristallisierte. Die Mutterlauge wurde dekantiert und das kristalline Produkt unter, Vakuum getrocknet, um 0,67 g (39%) Ligand L_{14} zu geben. Mass. Spek. (FAB) m/e 3446 $(M+H)^+$, ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) d 8, 07–8,15 (m, 2H), 7,78–7,82 (m, 1H), 7,68–7,75 (m, 1H), 7,50–7,55 (m, 1H), 7,35 (d, 1H), 6,72 (t, br, 1H), 5,90 (s, 1H), 3,77 (s, 1H), 3,25–3,50 (m, 2H), 1,75 (s, 3H), 1,50–1,60 (m, 2H), 1,45 (s, 3H), 1,33–1,45 (m, 2H), 0,95 (t, 3H).

BEISPIEL 6

HERSTELLUNG EINES PROTEIN-LIGAND KONJUGATS: BSA-LIGAND L_9 (FORMEL L_{15}, **Fig.** 7)

[0102] BSA (50 mg, 8×10^{-4} mmol) wurde in einem Puffer gelöst, der 0,1 M Natriumacetat, 0,1% Zinkacetat (w : v), pH 5,3 (6,5 ml) enthielt. Es wurde Acetonitril (2,0 ml) zur gepufferten Proteinlösung hinzugefügt, die sich als Ergebnis weder vom Aussehen noch vom pH-Wert her änderte. Eine Lösung aus Ligand L_{13} (15,4 mg, 4×10^{-2} mmol) in Acetonitril wurde tröpfchenweise zur BSA-Lösung hinzugefügt, und die resultierende Lösung wurde über Nacht bei RT inkubiert. Während der ersten 4 Std. nach der Zugabe des Liganden wurde der pH-Wert der Reaktionslösung periodisch überprüft und im Bereich von 5,0–5,5 gehalten. Nach der über-Nacht-Inkubation wurde nicht konjugierter Ligand durch Gelfiltration auf einer 2,5 × 20 cm Sephadex LH-20 Säule entfernt, die mit 65% : 35% (v : v) 0,1 M NaOAc/0,1% $Zn(OAc)_2$, pH 5,3 Acetonitril ins Gleichgewicht gebracht worden war, womit auch die Elution erfolgte. Basierend auf der charakteristischen Ultraviolett(UV)-Extinktion, die mit dem aromatischen System des Liganden assoziiert ist (lmax = 319, 304 nm für M_2 in Acetonitril-Lösung), wurden Konjugate identifiziert.

BEISPIEL 7

HERSTELLUNG EINES TMLC-PROTEIN KONJUGATS: BSA-$(PbL_{13}L_{14})(M_3$, FIGUR

[0103] Die folgende Reaktion wird unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt, bis zu dem Schritt, bei dem beide Liganden hinzugefügt worden sind.

[0104] Blei(II)-cyclohexanbutyrat (0,56 g, 1,0 mmol) wird in THF (20 ml) gelöst und die resultierende Lösung gerührt, während eine Lösung aus Ligand L_{14} (0,34 g, 1,0 mmol) und 1,8-bis(Dimethylamino)naphthalen (0,22 g, 1,0 mmol) in THF (26 ml) tröpfchenweise hinzugefügt wird. Das resultierende Reaktionsgemisch wird 30 Min. lang am Rückflußkühler gekocht, dann wird eine Lösung aus Ligand L_{13} (0,39 g, 1,0 mmol) und 1,8-bis(Dimethylamino)naphthalen (0,22 g, 1,0 mmol) in THF (20 ml) tropfenweise hinzugefügt. Nach weiteren 30 Min. Kochen am Rückflußkühler wird das Reaktionsgemisch auf RT gekühlt, konzentriert und filtriert und das Filtrat unter Vakuum zur Trockenheit verdampft. Der Rückstand wird in Acetonitril (100 ml) gelöst, um eine Stammlösung aktivierten TMLC (Formel M_2, **Fig.** 6) zu geben. BSA (50 mg, 8×10^{-4} mmol) wurde in 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 6,0, (6,5 ml) gelöst und Acetonitril (2,0 ml) wird hinzugefügt. Ein Aliquot der M_2-Stammlösung (1,5 ml, 4×10^{-2} mmol) wird tröpfchenweise zur BSA-Lösung hinzugefügt und die resultierende Mischung wird über Nacht bei RT inkubiert. Während der ersten 4 Std. nach der Zugabe des aktivierten TMLC wird der pH-Wert oft überprüft und im Bereich

von 5,5–6,0 gehalten. Nach der über-Nacht-Inkubation wird nicht konjugierter TMLC durch Gelfiltration auf einer 2,5 × 20 cm Sephadex LH-20 Säule entfernt, die mit 65% : 35% (v : v) 0,1 M NaOAc/0,1% $Zn(OAc)_2$, pH 6,0: Acetonitril ins Gleichgewicht gebracht worden war, womit auch die Elution erfolgte. Der Protein-enthaltende Peak wird aufgefangen und lyophilisiert. Der Bleigehalt des lyophilisierten Produktes (Formel M_3, **Fig.** 6) wird mit Hilfe von Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt.

BEISPIEL 8

HERSTELLUNG EINES TMLC-FLUORESCEIN KONJUGATS: SYNTHESE VON ($PbL_{14}L_{16}$, in **Fig.** 12 als M_5 gezeigt)

[0105] Der TMLC mit der Formel M_2 (1,0 mmol, **Fig.** 6) wird in THF-Lösung hergestellt, wie in Beispiel 7 beschrieben. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und der Rückstand in DMF (10 ml) erneut gelöst, dann einer Lösung aus 5-Aminomethylfluorescein (0,44 g, 1,0 mmol) und Triethylamin (0,10 g, 5 mmol) in DME (20 ml) hinzugefügt. Das resultierende Reaktionsgemisch wird gerührt, 16 Std. lang vor Licht geschützt, dann unter Vakuum zur Trockenheit verdampft. Der rohe TMLC-Fluorescein Tracer kann mit Hilfe von präparativer TLC auf Silikaplatten (Baxter) gereinigt werden, durch Elution mit $CHCl_3$: MeOH 40% : 60% (v : v).

BEISPIEL 9

FLUORESZENZPOLARISATIONS-IMMUNOASSAY FÜR BLUT-BLEI:

VORBEHANDLUNG

[0106] Eine auf Bleigehalt (200 µl) zu testende Blutprobe wird mit 3 M HNO_3 (50 µl) behandelt und bei 2.000 g 15 Min. lang zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstands (100 µl) wird mit einer Lösung gemischt, aus Ligand L_{14} (0,36 mg), der wie in Beispiel 5 beschrieben hergestellt wurde, in Borat-Puffer, pH 10, der 10% (v : v) DMF (50 µl) enthält. Der End-pH-Wert der resultierenden Lösung ist 9,0–9,5.

BEISPIEL 10

BLUT-BLEI FLUORESZENZPOLARISATIONS-IMMUNOASSAYS

[0107] Wie vorhin beschrieben, umfassen die Reagenzien für die FPIA der vorliegenden Erfindung Tracer und Antikörper, die gegen Immunogene der vorliegenden Erfindung erzeugt wurden. Zusätzlich werden konventionell verwendete Assay-Lösungen, einschließlich einem Verdünnungspuffer und M_6 Kalibratoren und Kontrollen hergestellt.

[0108] Das bevorzugte Verfahren ist entworfen worden, um in Zusammenhang mit den automatisierten TDx, Adx oder IMx Systemen verwendet zu werden; es können aber auch manuelle Assays durchgeführt werden. In beiden Verfahren kann die Testprobe nach der Vorbehandlung (Beispiel 9) mit dem Überstand und dem Antikörper in Verdünnungspuffer gemischt werden, bevor eine Hintergrundmessung durchgeführt wird. Dann wird der Tracer zur Testprobe hinzugefügt. Nach der Inkubation wird eine Fluoreszenzpolarisation-Ablesung vorgenommen.

[0109] In den automatisierten Assays wird der Fluoreszenzpolarisations-Wert eines jeden Kalibrators, jeder Kontrolle oder Testprobe bestimmt, und auf das Ausgabeband des TDx, ADx oder IMx Instruments gedruckt. Das Instrument-erzeugt ebenfalls eine Standardkurve, durch Plotten der Polarisation eines jeden Standards gegen seine Konzentration, unter Verwendung einer nichtlinearen Regressionsanalyse. Die Konzentration jeder Kontrolle oder Probe wird von der gespeicherten Kurve abgelesen und auf das Ausgabeband gedruckt.

[0110] In den bevorzugten automatisierten Blut-Blei Assays werden folgende Reagenzien verwendet:

1) die Vorbehandlungs-Lösung
2) der in 50%igem Methanol in Kaliumphosphat-Puffer (0,15 M Phosphatpuffer, pH 7,5) verdünnte Tracer.
3) das Antikörper enthaltende Kaninchen Antiserum oder der Maus monoklonale Antikörper, der gegen M_3 (**Fig.** 6, worin das Protein BSA ist) -Immunogen erzeugt ist, in TDx Puffer (0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,5, der 0,01% Rindergammaglobulin und 0,1% Natriumazid enthält) mit 30% Glycerol verdünnt;
4) ein Verdünnungspuffer, der TDx Puffer umfasst;
5) ein Set Kalibratoren
6) Kontrollen, die 5 mg/ml M_6 umfassen.

[0111] Alle polarisierten Fluoreszenzmessungen werden mit Hilfe des TDx Instruments durchgeführt, das den Assay entsprechend dem nachfolgenden Protokoll durchführte:

1) 22,5 ml Standard oder unbekannte Testprobe und 12,5 ml Antikörper-Reagens werden in die Küvette eingeführt und ein ausreichendes Volumen Verdünnungspuffer wird hinzugefügt, um das Volumen auf 1 ml zu erhöhen, und eine Hintergrundintensitäts-Ablesung wird durchgeführt;
2) 12,5 ml Antikörper, 25 ml Tracer und die zweiten 22,5 ml Probe werden zu der Küvette hinzugefügt, und ein ausreichendes Volumen Verdünnungspuffer wird hinzugefügt, um das Volumen auf 2,0 ml zu erhöhen;
3) das Reaktionsgemisch wird inkubiert;
4) die Fluoreszenzpolarisation aufgrund der Tracerbindung an den Antikörper wird erhalten durch die Subtraktion der polarisierten Fluoreszenz-Intensitäten des Hintergrunds von den Endintensitäten der polarisierten Fluoreszenz des Gemisches; und

5) der Polarisationswert der unbekannten Testprobe wird mit einer Standardkurve verglichen, die unter Verwendung von Kalibratoren mit bekanntem M_6-Gehalt hergestellt worden ist.

Patentansprüche

1. Ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch ist für einen Metallion-Ligand-Koordinationskomplex (MLC) bestehend aus mindestens zwei Liganden und einem Metallion, worin das Epitop, das durch den monoklonalen Antikörper erkannt wird, zwei oder mehr Liganden in dem MLC umfasst, und worin die Liganden gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus L_1 bis L_8, gezeigt in **Fig.** 1, wobei die Liganden in dem MLC dieselben oder unterschiedlich sind.

2. Der monoklonale Antikörper gemäß Anspruch 1, worin das Metallion gewählt ist aus den Hauptgruppen-Metallen des Periodensystems der Elemente.

3. Ein monoklonaler Antikörper gemäß Anspruch 1, worin das Metallion gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Übergangsmetallen des Periodensystems der Elemente.

4. Der monoklonale Antikörper gemäß Anspruch 1, worin das Metallion gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Lanthanoiden- und Aktinoiden-Metallen des Periodensystems der Elemente.

5. Der monoklonale Antikörper gemäß Anspruch 1, worin das Metallion gewählt ist der Gruppe bestehend aus:
Blei;
Quecksilber;
Nickel;
Kadmium;
Tallium;
Antimon;
Silber;
Chrom;
Mangan;
Platin;
Gold;
Alluminium;
Bismut;
Gallium;
Eisen;
Kupfer;
Zink;
Kobalt;
Molybdän;
Selen; und
Vanadium.

6. Ein MLC bestehend aus zwei oder mehr Liganden, worin die Liganden gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus L_1 bis L_8 von **Fig.** 1, wobei die Liganden dieselben oder unterschiedlich sind.

7. Der MLC von Anspruch 6, worin die Liganden gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus L_9 bis L_{12} von **Fig.** 4.

8. Ein Ligand, der eine Struktur hat gewählt aus der Gruppe bestehend aus L_1 bis L_8 von **Fig.** 1, außer L_6, wenn sein r CH_2 ist und sein X=OH ist.

9. Ein Konjugat, das einen MLC umfasst, bestehend aus zwei oder mehreren bi-funktionellen Liganden, konjugiert an ein immunogenes Molekül, worin die Liganden gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus L_1 bis L_8, gezeigt in **Fig.** 1, wobei die Liganden in dem MLC dieselben oder unterschiedlich sind.

10. Ein Affinitäts-Chromatographie-Medium, das einen MLC umfasst, bestehend aus zwei oder mehr bi-funktionellen Liganden, die kovalent an einen festen Träger gekoppelt sind, worin die Liganden gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus L_1 bis L_8, gezeigt in **Fig.** 1, wobei die Liganden in dem MLC dieselben oder unterschiedlich sind.

11. Ein Assay zum Bestimmen der Spezifität der monoklonalen Antikörper, die reaktiv sind mit einem MLC, worin die Liganden in dem MLC gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus L_1 bis L_8, gezeigt in **Fig.** 1, wobei die Liganden in dem MLC dieselben oder unterschiedlich sind, wobei der Assay die folgenden Schritte umfasst
(a) kovalentes Koppeln eines vorgeformten MLC an ein Protein, um ein MLC-Protein-Konjugat als eine feste Phase zu bilden;
(b) Inkubieren der festen Phase aus Schritt (a) mit den monoklonalen Antikörpern, die mit dem MLC reaktiv sind, worin das Epitop, das durch den monoklonalen Antikörper erkannt wird, zwei oder mehr Liganden in dem MLC umfasst;
(c) Waschen der festen Phase und Nachweisen von gebundenem Antikörper, indem die feste Phase einem Anti-Maus-Antikörper gegen den monoklonalen Antikörper ausgesetzt wird, der mit einem signalerzeugenden Anteil markiert ist; und
(d) Vergleichen der Ergebnisse aus Schritt (c) mit denen von analogen Assays, in denen bei Schritt (a) das Metallion von Interesse durch ein potenziell kreuz-reaktives Metallion ersetzt wird.

12. Ein Konjugat, das einen MLC umfasst, bestehend aus zwei oder mehr bifunktionellen Liganden, gewählt aus der Gruppe bestehend aus L_1 bis L_8 von **Fig.** 1, kovalent verbunden mit einem Marker durch einen nicht-Metall-bindenden reaktiven Anteil von mindestens einem der Liganden.

13. Das Konjugat M_6 durch die Formel gezeigt in **Fig.** 12.

14. Ein Immuno-Assay zum Nachweis oder zur quantitativen Bestimmung eines Metallions in einer

Probe, der folgende Schritte umfasst:
(a) in Kontakt bringen der Probe mit einem Tracer, der ein Konjugat von Anspruch 12 ist, mit mindestens zwei Liganden, die in der Lage sind, das Metall zu binden, um einen MLC zu bilden, worin die Liganden gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus L_1 bis L_8, gezeigt in **Fig.** 1, wobei die Liganden in dem MLC dieselben oder unterschiedlich sind, und ein Antikörper, der spezifisch ist für den MLC, worin das Epitop, das durch den monoklonalen Antikörper erkannt wird, zwei oder mehrere Liganden in dem MLC umfasst; und
(b) Detektieren oder Messen der Menge an Tracer, der an den Antikörper gebunden ist, welche umgekehrt proportional ist zu der Menge des Metallions in der Probe.

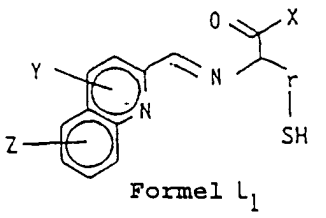
15. Der Immuno-Assay von Anspruch 14, worin das Metallion ein Blei-Ion ist.

16. Der Immuno-Assay von Anspruch 15, worin der Tracer das Konjugat M_6 ist, durch die. Formel gezeigt in **Fig.** 12, und der Antikörper gezüchtet ist mit dem Konjugat M_3 durch die Formel gezeigt in **Fig.** 6.

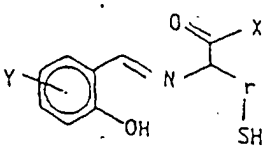
17. Ein Assay-Kit, der folgendes umfasst:
(a) einen Liganden, gewählt aus der Gruppe bestehend aus L_1 bis L_8 von **Fig.** 1; und
(b) einen Antikörper, der spezifisch ist für einen MLC, der ein Metallion gebunden an mindestens zwei Liganden umfasst, die gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus L_1 bis L_8 von **Fig.** 1, worin der Antikörper ein Epitop erkennt, das mindestens zwei der Liganden in dem MLC umfasst.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

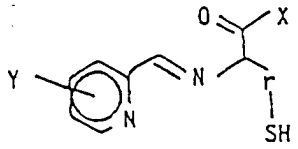
Anhängende Zeichnungen



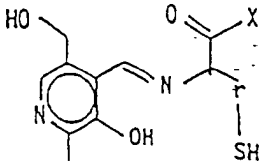
Formel L_1



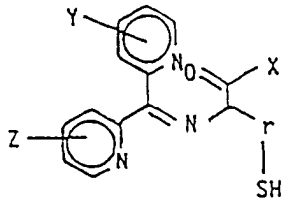
Formel L_5



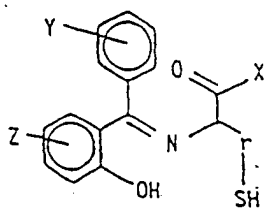
Formel L_2



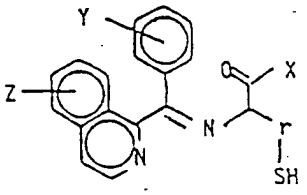
Formel L_6



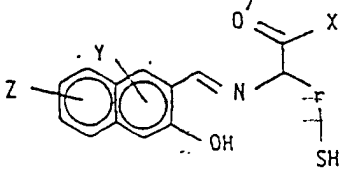
Formel L_3



Formel L_7



Formel L_4

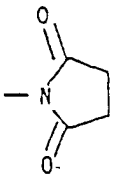


Formel L_8

Worin r gewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: $-CH_2-$

$-(CH_2)_2-$

$-(C(CH_3)_2)-$

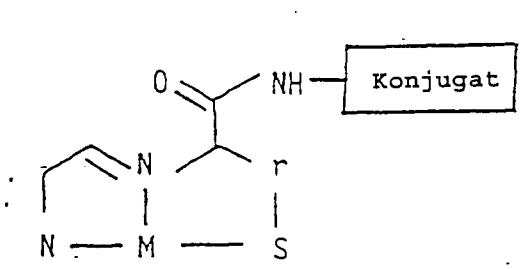
R_1 ist C_1-C_4 Alkyl oder 

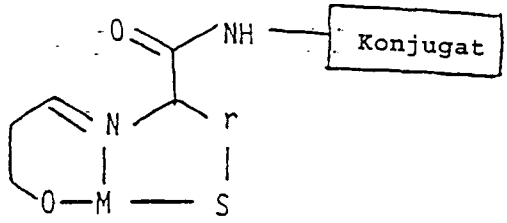
R_2 ist C_1-C_4 Alkyl

R_3 ist C_1-C_{10} Alkyl, das von einem Konjugatmolekül geliefert wird

Y und Z können gleich oder unterschiedlich sein, und werden gewählt aus der Gruppe bestehend aus -H, $-CO_2H$, $-SO_3H$

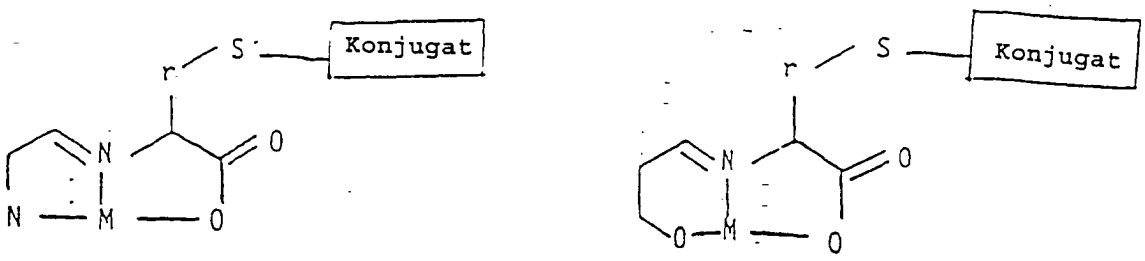
X wird gewählt aus der Gruppe bestehend aus -OH, $-OR_1$, $-NHR_2$, $-NHR_3$





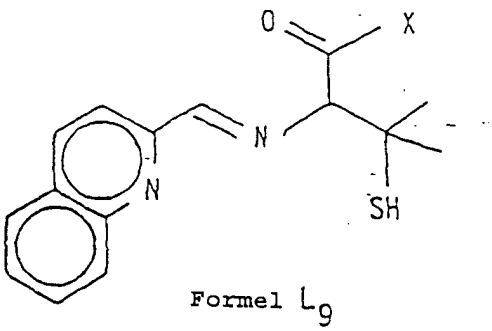
Worin M ein Metallion ist

r ist wie in Figur 1 definiert

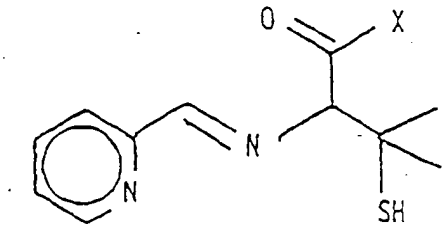


Worin M ein Metallion ist

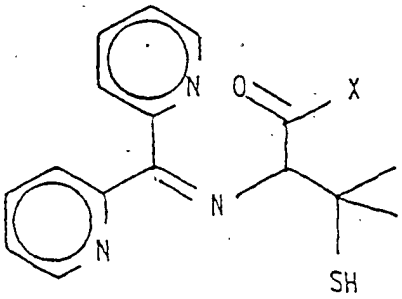
r ist wie in Figur 1 definiert



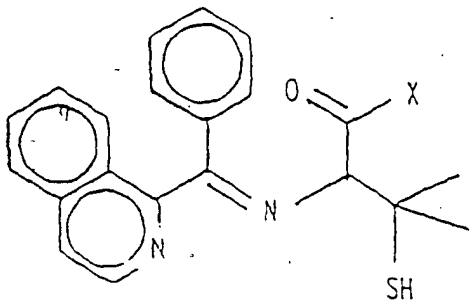
Formel L_9



Formel L_{10}

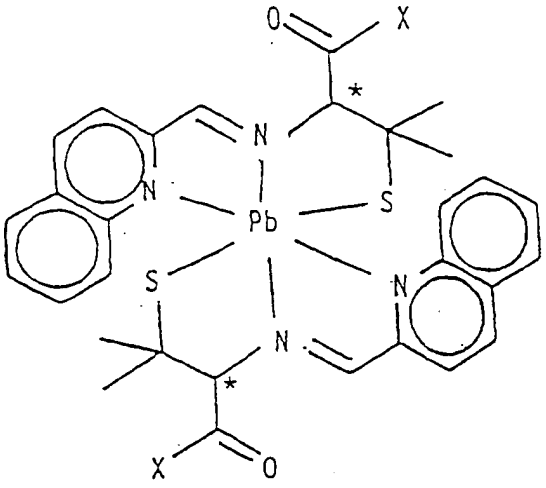


Formel L_{11}



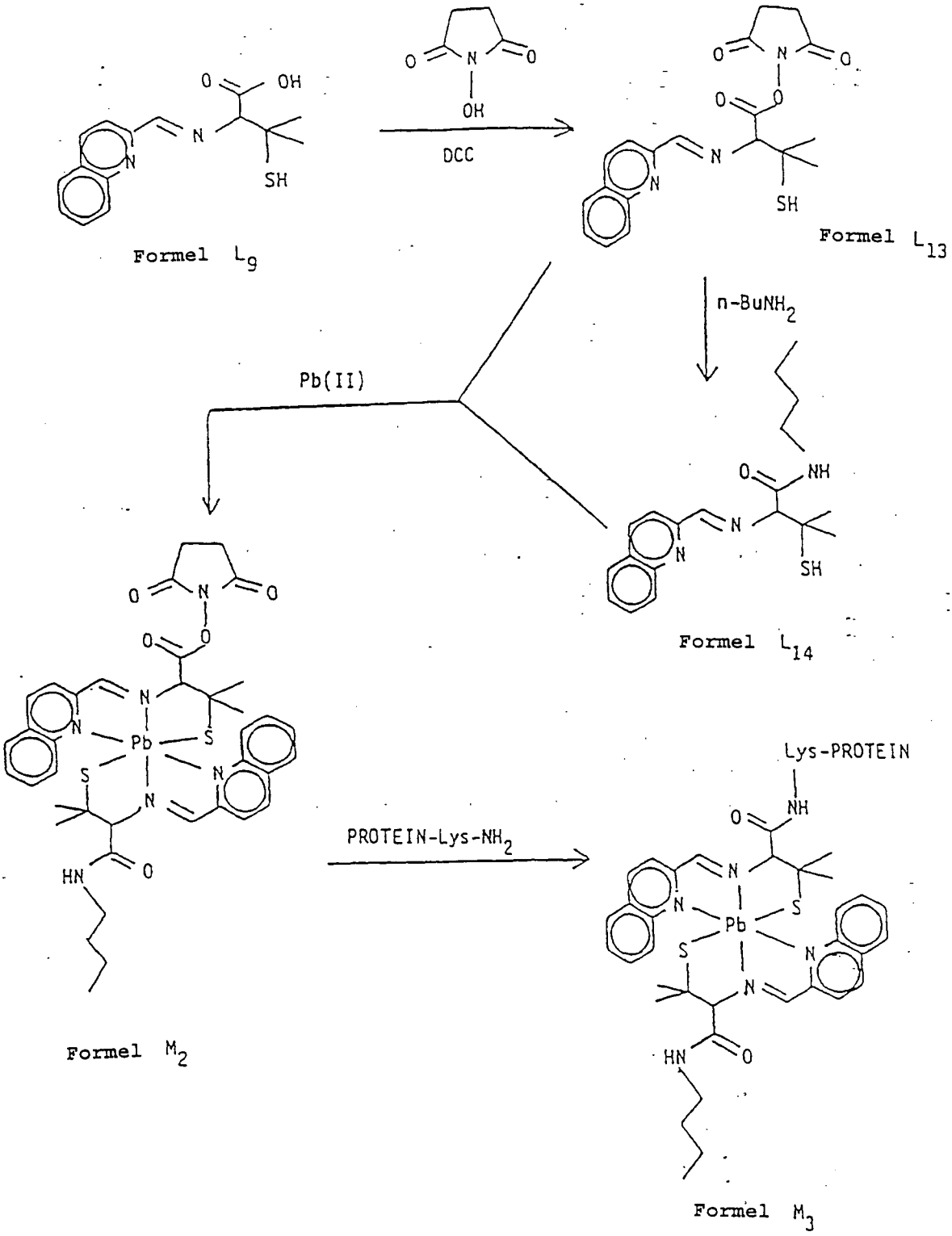
Formel L_{12}

X ist wie in Figur 1 definiert



Formel M_1

X ist wie in Figur 1 definiert



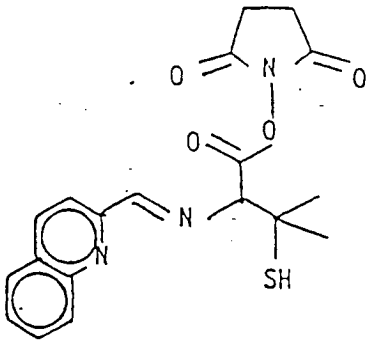
Formel L_9

Formel L_{13}

Formel L_{14}

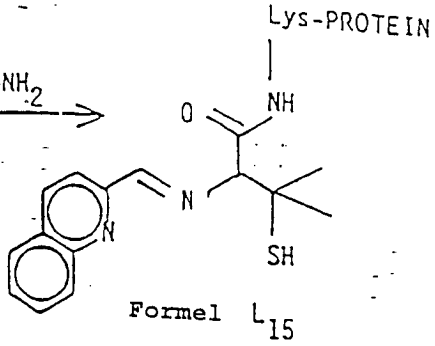
Formel M_2

Formel M_3



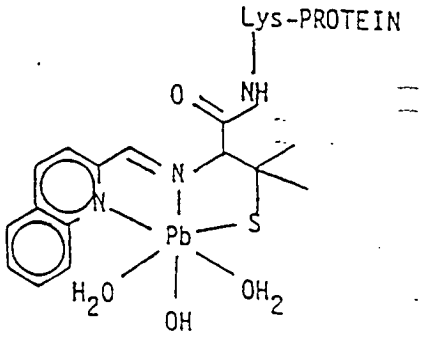
Formel L_{13}

PROTEIN-Lys-NH_2



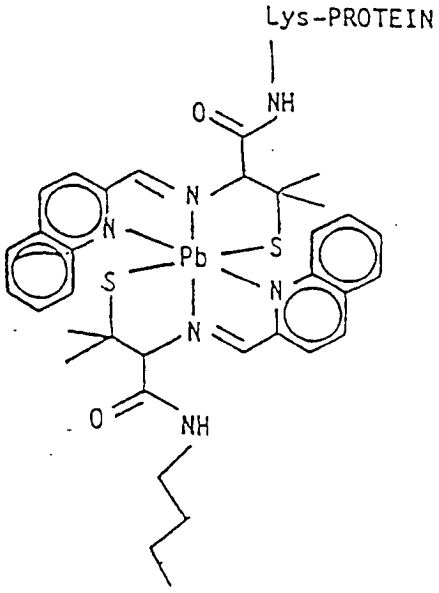
Formel L_{15}

$Pb(II)_{aq.}$

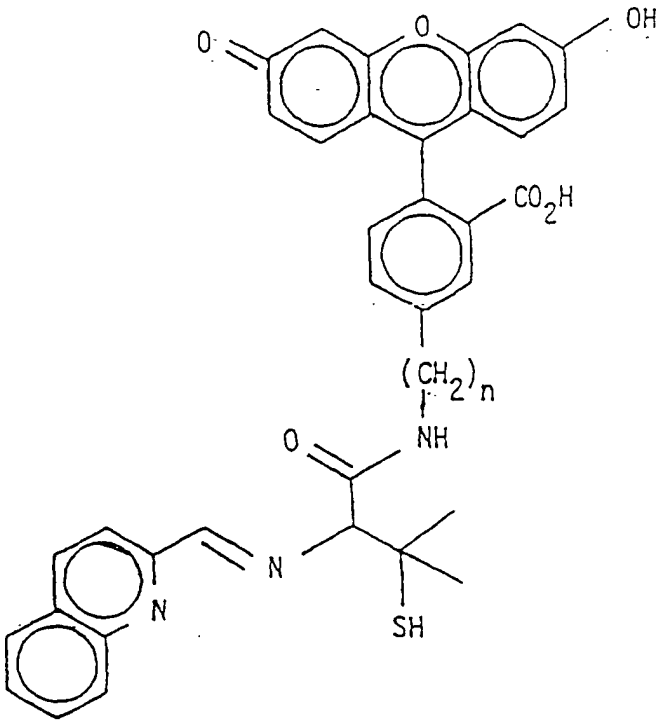


Formel M_4

L_{14}

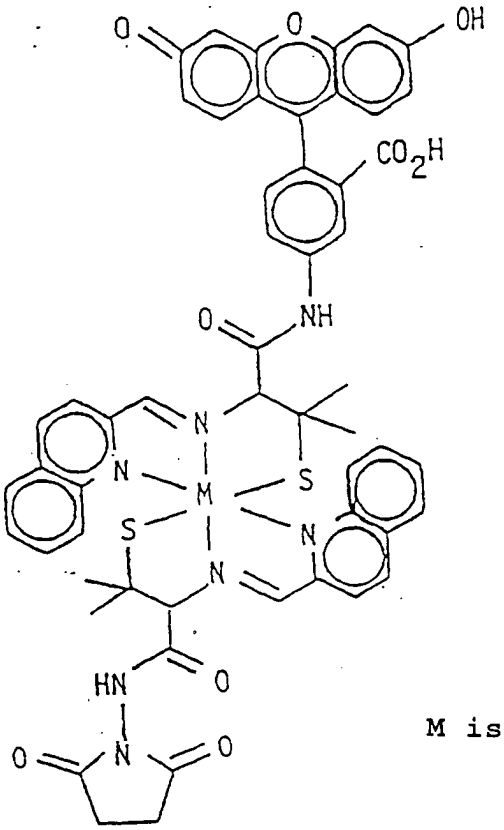


Formel M_3



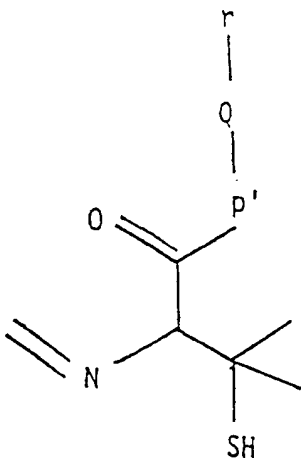
Formel L_{16}

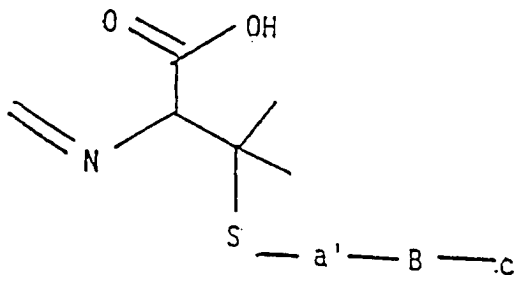
n ist 0 oder 1

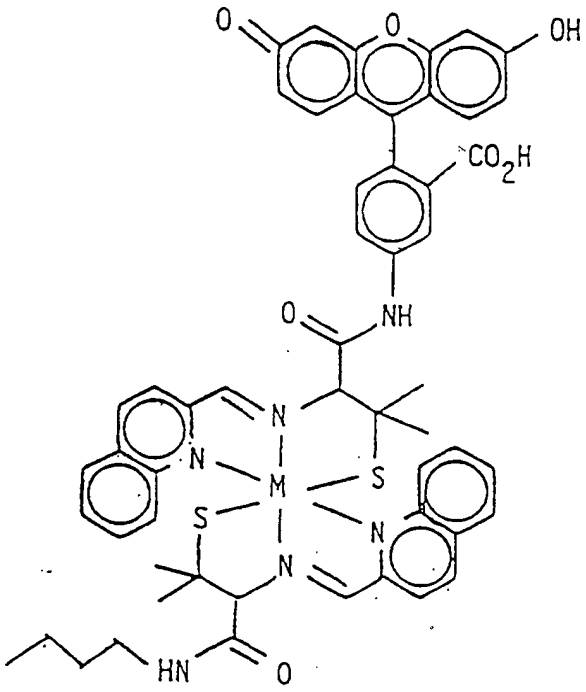


M ist Pb, Zn, Cu, Hg, Cd, Ni, Fe, Co, Bi

Formel M_5


r
Q
P'
O
N
SH


O
OH
N
S
a'
B
c



Formel M_6

$M = Pb^{2+}$