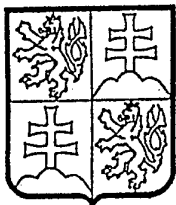


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 659

(21) Číslo přihlášky : 6935-89.E
(22) Přihlášeno : 07 12 89
(30) Prioritní data : 19 12 88 - DE - 88/3842657

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :
G 01 N 31/22

(40) Zveřejněno : 18 03 92
(47) Uděleno : 20 05 92
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 15 07 92

(73) Majitel patentu : MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG, DARMSTADT
(DE)

(72) Původce vynálezu : DREHER MICHAEL,
HIRSCH HEINZ, WEITERSTADT
(DE)

(54) Název vynálezu : Způsob a prostředek ke stanovení maleinimidových skupin

(57) Anotace :

Vzorek obsahující maleinimidové skupiny se nechá reagovat s reakčním činidlem obsahujícím thiolové skupiny a potom s chromogenem nebo fluorogenem reagujícím s thiolovými skupinami a měří se zbarvení nebo změna intenzity fluorescence. Prostředek obsahuje reakční činidlo obsahující thiolové skupiny ve 2 až 10 násobném molárním přebytku ve vztahu k proteinu nesoucímu maleinimidové skupiny a 0,1 až 1 mM chromogenu nebo fluorogenu reagujícímu s thiolovými skupinami.

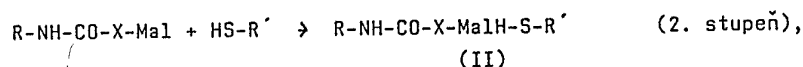
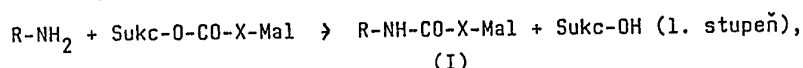
Vynález se týká způsobu a prostředku ke stanovení maleinimidových skupin, obzvláště ke stanovení reaktivních maleinimidových skupin vázaných na proteiny (enzymy, antigeny, protilátky).

Od poloviny sedmdesátých let byla vyvinuta četná tzv. heterosíťovadla s cílem, aby se proteiny vzájemně kovalentně vázaly pomocí různých reaktivních skupin, například amino-skupin, karboxylových skupin, hydroxylových skupin a thiolových skupin. Obzvláštní význam mají tato heterosíťovadla v oblasti reagentů pro zkoušky imunity. Přitom se mohou zdůraznit zejména heterosíťovadla nesoucí maleinimidové skupiny, protože jsou schopné specificky reagovat s thiolovými skupinami. Tímto způsobem se mohou fragmenty protilátek, například Fab'- fragmenty, které obsahují volné thiolové skupiny, selektivně vázat na jiné proteiny, například enzymy.

Takovým síťovadlem a heterosíťovadlem nesoucím maleinimidové skupiny je například m-maleinimidobenzoyl-N-hydroxysukcinimidester (MBS), m-maleinimidobenzoyl-N-hydroxy-sukcinimidester (Sulfo-MBS), sukcinimidyl-4-(N-maleinimidomethyl)-cyklohexan-karboxylát (SMCC), sulfosukcinimidyl-4-(N-maleinimidomethyl)-cyklohexan-1-karboxylát (sulfo-SMCC), sukcinimidyl-4-(p-maleinimidofenyl)-butyrát (SMPB), sulfosukcinimidyl-4-(p-maleinimidofenyl)-butyrát (sulfo-SMPB), bis-maleinimidohexan (BMH), N-(4-diazofenyl)-maleinimid, N-(β-diazofenyl)-ethylmaleinimid.

Pomocí těchto heterosíťovadel se mohou vázat thiolové skupiny na aminoskupiny. N-(4-diazofenyl)-maleinimid a n-(β-diazofenyl)-ethylmaleinimid umožňují kromě toho také to, že se thiolové skupiny mohou vázat na imidazolové, fenolové, indolové a další skupiny.

V principu probíhají tyto reakce podle následujících schémat:



kde R-NH₂ znamená protein nesoucí primární aminoskupiny; Mal znamená maleinimidovou skupinu; Sukc znamená sukcinimidylovou skupinu; R'-SH znamená protein nesoucí thiolové skupiny; X znamená distanční článek (spacer).

Neočekávaně bylo zjištěno, že pro přípravu účinných reagentů pro zkoušky imunity je rozhodující znát počet a funkčnost maleinimidových skupin vázaných na X v meziprojektu I výše uvedené rovnice než probíhá reakce například s fragmenty protilátek. Tím se může odstranit nákladná ztrátová produkce.

Úkolem vynálezu je dát k dispozici způsob a prostředek, se kterým se může provádět důkaz počtu funkčních, reaktivních maleinimidových skupin ve výše uvedeném meziprojektu I.

Předmětem vynálezu je způsob stanovení maleinimidových skupin, jehož podstata spočívá v tom, že se vzorek obsahující maleinimidové skupiny nechá reagovat s reakčním činidlem obsahujícím thiolové skupiny a potom s chromogenem nebo fluorogenem reagujícím s thiolovými skupinami a měří se zbarvení nebo změna intenzity fluorescence.

Dalším předmětem vynálezu je prostředek ke stanovení maleinimidových skupin obsahující reakční činidlo obsahující thiolové skupiny ve 2 až 10 násobném molárním přebytku ve vztahu ke proteinu nesoucímu maleinimidové skupiny a 0,1 až 1 mM chromogenu nebo fluorogenu sloužícího k reakci s thiolovými skupinami.

Přímé stanovení maleinimidových skupin vázaných na protein s chromogeny nebo fluorogeny vyžaduje chromatografické dělení. Způsob podle vynálezu se naproti tomu provádí homogenním, tj. jednofázovým způsobem.

Stanovení maleinimidových skupin se provádí tak, že se například přidá k roztoku proteinu nesoucímu maleinimidové skupiny roztok merkaptoalkanolu a inkubuje se. Potom se přidá roztok chromogenu a fluorogenu, který reaguje s thiolovými skupinami. Přebytečný

merkptoalkanol, tj. nevázaný na maleinimidové skupiny, způsobuje tvorbu barviva nebo změnu fluorescence, jehož intenzita se měří. Způsob se může provádět jak metoda koncového bodu tak také jako kinetická metoda, přičemž se měří rychlost tvorby barviva nebo změna fluorescence.

Vhodnými reagenčními činidly obsahujícími thiolové skupiny jsou merkptoalkanol, merkptoethanol, merkptopropanol, merkptoalkylaminy jako cysteamin, merkptopropylamin, merkptoaminokyseliny jako cystein, merkptokarboxylové kyseliny jako merkptoocetová kyselina, merkptojantarová kyselina, 2-thiobenzoová kyselina, s výhodou merkptoethanol. Reagenční činidlo obsahující thiolové skupiny musí být vzhledem k proteinu nesoucímu maleinimidové skupiny ve dvou až desetinásobném molárním přebytku, s výhodou 4 až 6ti násobném přebytku.

Jako chromogen reagující s thiolovými skupinami je vhodná například 2,2'-dinitro-5,5'-dithio-dibenzoová kyselina, bis (p-nitrofenyl)-disulfid, 2,2'-dipyridyl-disulfid, s výhodou 2,2'-dinitro-5,5'-dithio-dibenzoová kyselina, která je dlouho známá jako Ellmanovo činidlo (Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 (1959)). Ve slabě zásaditém prostředí (pH 8 až 9) se vytvoří pomocí Ellmanova činidla reduktivním štěpením disulfidového můstku intenzivně žlutý 2-nitro-5-thiobenzoan, jehož barevná intenzita v rozmezí 400 až 450 nm je mírou pro počet thiolových skupin. Koncentrace chromogenu je v rozmezí 0,1 až 1 mM, s výhodou při 0,2 mM.

Jako fluorogenní látka je vhodný například (o-nitroanilin-N-ethylthio)-2-pyridyl-5-thioureido-N'-(5-fluorescein), 4-jodacetylamo-1-naftol, s výhodou (o-nitroanilin-N-ethylthio)-2-pyridyl-5-thioureido-N'-(5-fluorescein). V zásadě probíhá metoda analogicky podle způsobu popsaného Ellmanem. Při reakci fluorescenčního derivátu se sloučeninami obsahujícími thiolové skupiny se fluorescence fluorescenčních derivátů silně zvýší. Výtěžek fluorescence je vzhledem ke standardu mírou pro počet thiolových skupin. Koncentrace fluorogenu je v rozmezí 0,1 až 1 mM, s výhodou při 0,2 mM.

Způsob a prostředek jsou obecně vhodné pro stanovení sloučenin obsahujících maleinimid nebo maleinimidové skupiny. Je vhodný s výhodou pro stanovení citlivosti reagencí pro zkoušky imunity obsahujících maleinimidové skupiny, tj. pro jakostní kontrolu těchto reagencí.

Příklad 1

Stanovení maleinimidových skupin vázaných na protein

K roztoku křenové peroxidázy nesoucí maleinimidové skupiny (0,062 mM) se přidá roztok merkptoethanolu. Po 10ti minutové inkubační době se přidá roztok Ellmanova činidla (2,2'-dinitro-5,5'-dithio-dibenzoové kyseliny). Přebytečný merkptoethanol, tj. nevázaný na maleinimidové skupiny, způsobuje tvorbu oranžově žlutého barviva 2-nitro-5-thiobenzoanu.

Intenzita zbarvení se měří ve fotometru při 436 nm a teplotě místnosti. Barva roztoku po reakci je alespoň 1 hodinu stabilní, takže se měření může provádět jako měření koncového bodu. Zvolené barvivo má výhodu, že se absorbuje při vlnové délce, při které se neočekává rušení proteinem. Měření slepého pokusu se provádí podle následujícího pipetačního schématu:

	Standard	Slepá hodnota standardu	Analýza	Slepá hodnota analýzy
Roztok 1	100	150	-	50
Roztok 2	-	-	100	100
Roztok 3	50	-	50	-
10 minutová inkubace při 37 °C				
Roztok 4	2 500	2 500	2 500	2 500
Po desetiminutové inkubaci se měří extinkce při 436 nm oproti vodě				
	St	StL	A	Al

Výpočet se provádí podle následující rovnice:

$$[(St-StL)-(A-AL)] \times 5 \text{ mM} (St-StL) \times 2$$

Složení roztoků:

roztok 1 = voda

roztok 2 = analýza (látko nesoucí maleinimidové skupiny),

roztok 3 = standard (merkaptioethanol, 5 mM v odplyněné vodě),

roztok 4 = barevné činidlo (Ellmanovo činidlo, 0,2 mM v 0,05 M boritanu sodném + 0,1% askorbová kyselina, pH = 8,0)

Příklad 2

Stanovení počtu (nebo koncentrace) reaktivních maleinimidových skupin v různých síťovadlech a opětovné zjišťování při různém zředění.

Protože jsou různá síťovadla špatně rozpustná ve vodě nebo se sukcinimidyllová skupina vodou rychle hydrolyzuje, rozpustí se všechny látky v dioxanu.

Vzorek 1: 8,60 mg sukcinimidyl-4-(p-maleinimidofenyl)-butyrátu se rozpustí v 9,65 ml dioxanu (2,5 mM).

Vzorek 2: 3,34 mg m-maleinimidobenzoyl-N-hydroxosukcinimidesteru se rozpustí v 4,25 ml dioxanu (2,5 mM).

Vzorek 3: 3,80 mg bismaleinimidohexanu se rozpustí v 5,5 ml dioxanu (2,5 mM).

Test se provádí podle pipetačního schématu v příkladu 1.

Výsledek (v mM, % opětovného zjištění):

Vzorek 1			Vzorek 2			Vzorek 3		
vypoč.	měřeno	%	vypoč.	měřeno	%	vypoč.	měřeno	%
0,5	0,565	113	0,5	0,605	121	0,5	0,540	108
1,0	1,025	103	1,0	1,155	116	1,0	1,095	110
1,5	1,515	101	1,5	1,625	108			
2,0	2,005	100	2,0	2,135	107			
2,5	2,475	99	2,5	2,490	100			
							SH-skupiny spotřebovány	

Z výsledku této tabulky je zřejmé, že různá síťovadla obsahující maleinimidové skupiny jsou správně zachycena. Test je v dostatečně velkém koncentračním intervalu lineární.

Příklad 3

Stanovení počtu (nebo koncentrace) maleinimidových skupin na křenové peroxidáze

5,37 mg křenové peroxidázy nesoucí maleinimidové skupiny (HRP) se rozpustí v 1 ml odplyněné vody. Při přijetí molekulové hmotnosti 45000 se dosáhne koncentrace 0,119 mM. Tento základní roztok se zředí odplyněnou vodou ve více stupních: 1+4, 2+3, 3+2, 4+1. Měření se provádí podle pipetačního schématu uvedeného v příkladu 1.

Výsledek:

HRP-maleinimid vypočteno, mM	Maleinimidové skupiny měřeno, mM	Počet maleinimidových skupin na enzym
0,0238	0,1965	8,26
0,0476	0,4760	10,00
0,0714	0,7600	10,64
0,0952	0,8000	8,40
0,1190	1,0150	8,53

Z těchto výsledků jasně vyplývá, že stanovení neruší přítomnost proteinu. Měření je v dostatečně velkém koncentračním rozmezí lineární. Správnost výsledku se přezkouší stanovením počtu primárních aminoskupin po a před reakcí s heterosíťovadlem. V prostředku je spotřebováno 10 aminoskupin na vazbu heterosíťovadla. Tímto se kryjí získané hodnoty obou metod velice dobře. Zatímco poslední způsob umožňuje zdůvěhodit pomocí dvojnásobného stanovení primárních aminoskupin výpočet vázaných maleinimidových skupin, získají se s novou metodou stejné výsledky v kratším čase. Kromě toho je nová metoda především proto lepší, že jsou přitom zachyceny výlučně aktivní maleinimidové skupiny, tj. schopné vázání thiolových skupin.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob stanovení maleinimidových skupin, vyznačený tím, že se vzorek obsahující maleinimidové skupiny nechá reagovat s reakčním činidlem obsahujícím thiolové skupiny a potom s chromogenem nebo fluorogenem reagujícím s thiolovými skupinami a měří se zbarvení nebo změna intenzity fluorescence.
2. Způsob podle nároku 1, vyznačený tím, že se jako reakční činidlo obsahující thiolové skupiny použije merkaptalkanol, například merkaptoethanol nebo merkaptopropanol.
3. Způsob podle nároku 1, vyznačený tím, že se jako chromogen použije 2,2'-dinitro-5,5'-dithiodibenzoová kyselina.
4. Prostředek ke stanovení maleinimidových skupin, vyznačující se tím, že obsahuje reakční činidlo obsahující thiolové skupiny ve 2 až 10 násobném molárním přebytku ve vztahu k proteinu nesoucímu maleinimidové skupiny a 0,1 až 1 mM chromogenu nebo fluorogenu reagujícího s thiolovými skupinami.