



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8802236**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Geïmmobiliseerde antilichamen, alsmede werkwijzen ter bereiding ervan.**
- ⑤1 Int.Cl.: A61K39/44, G01N33/548.
- ⑦1 Aanvrager: Röhm GmbH te Darmstadt, Bondsrepubliek Duitsland.
- ⑦4 Gem.: Ir. L.C. de Bruijn c.s.
Nederlandsch Octrooibureau
Johan de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage..

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8802236.
- ②2 Ingediend 12 september 1988.
- ③2 Voorrang vanaf 14 november 1987.
- ③3 Land van voorrang: Bondsrepubliek Duitsland (DE).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: P 3738721 .
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 1 juni 1989.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Geïmmobiliseerde antilichamen, alsmede werkwijzen ter bereiding
ervan.

De uitvinding heeft betrekking op regio-specifieke conjugaatvorming van oligosaccharide bevattende antilichamen door middel van oxydatieve modificatie van het koolhydraatgebied van de antilichamen.

De fixatie van biologisch actieve stoffen aan dragers behoort tot
5 de standaardwerkwijzen van het onderzoek en de techniek van de biochemie. Daarbij zijn - afhankelijk van de chemische aard van de te fixeren stoffen en van het doel van de aanhechting - verschillende methoden ontwikkeld (zie b.v. K. Buchholz "Characterization of Immobilized Biocatalysts, Dechema Monographs, deel 84, nr. 1724-1731, Verlag Chemie
10 1979).

Van grote praktische betekenis als dragermaterialen waren vanaf het begin polysacchariden zoals cellulose, zetmeel, dextran, die gewoonlijk ter activering chemisch gemodificeerd worden. Talrijke modificeringsmethoden zijn voorgesteld, daaronder ook de activering van zet-
15 meel door oxydatie met perjodaat [zie L. Goldstein, M. Pecht, S. Blumberg, D. Atlas, Y. Levin, Biochemistry 9 (1979) 2322] onder vorming van formylgroepen onder splitsing van de hemiacetaalring.

De koppeling via de koolhydraatbestanddelen van celmembranen werd b.v. bij rode bloedlichaampjes door oxydatie met perjodaat bereikt. De
20 aldus gevormde reactieve aldehydgroepen koppelen met de aminogroepen van de zijketens van proteïnen. [Zie C.I. Sanderson, D.V. Wilson, Immunochemistry 1971 (8) 163]. Oxydatie met perjodaat van antilichamen werd ook voor de conjugatie van antilichamen met enzymmerkers gebruikt (zie A.G. Gaivoronskaya et al. Chem. Abstr. 95, 130 787j). Soortgelijk
25 worden in EP-A-0.175.617 uit antilichamen en therapeutisch werkzame stoffen gevormde conjugaten voorgesteld, die tegen een doel-antigeen zijn gericht.

US-A-4.671.958 heeft betrekking op een werkwijze voor de covalente aanhechting van "linker"-groepen aan specifieke plaatsen van moleculen
30 van antilichamen die tegen willekeurige doel-antigenen kunnen worden toegepast.

EP-A-0.088.695 beschrijft verscheidene werkwijzen voor de covalente binding van oplosbare en niet oplosbare conjugaatpartners, zoals chemische stoffen, dragers e.d. aan antilichamen. De gevormde conjugaten zijn interessant met het oog op affiniteits-scheidings- en zuiveringsprocessen, alsmede voor diagnostische en therapeutische toepassingen. De aanhechting kan o.a. via het koolhydraatbestanddeel van de an-

. 8802236

tilichamen plaatshebben. Bijvoorbeeld wordt voor immunobepalingen monoklonaal IgM met galactose-oxidase en katalase geoxydeerd en vervolgens met fenyldhydrazine-glycyl-glycyl-arginyl-7-amino-4-methylcumarine gecondenseerd. [Zie ook J.D. Rodwell et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 5 83, 2632-36 (1986)/Immunology].

Ook M.M. Chua et al. [Biochem. Biophys. Acta. 800 (3) 291 (1984)] bereiken aanhechting van immunoglobuline aan liposomale membranen door voorzichtige oxydatie (met perjodaat of galactose-oxidase) van koolhydraatgroepen in het constante gebied van de zware keten van het immunoglobuline, tot aldehydfuncties, die vervolgens met hydrazidegroepen 10 kunnen reageren, die aan het membraanoppervlak van de liposomen zijn gefixeerd.

Door D.J. O'Shannessy et al. wordt eveneens de specifieke conjugatie van zowel polyklonale als monoklonale antilichamen door middel van 15 de koolhydraatgebieden ervan voorgesteld, waarbij eerst door voorzichtige oxydatie aldehydgroepen kunnen worden gevormd en deze met hydrazidenederivaten van het biotine, geschikte fluorescentiekleurstoffen of enzymen in stabiele antilichaam-conjugaten kunnen worden omgezet, die de volledige immunologische activiteit hebben behouden. Ook de mogelijkheid 20 van de fixatie aan met hydrazine gemodificeerde vaste dragers wordt vermeld. Als drager voor immuno-affiniteitschromatografie wordt b.v. (in de handel verkrijgbaar) agarose-adipinezuurhydrazide toegepast. [Zie J. Appl. Biochem. 7, 347-355 (1985)]. Voorts maken O'Shannessy en W.L. Hoffmann gebruik van de met zwak zuur gekatalyseerde 25 de condensatie van oxydatief gevormde aldehydgroepen aan de oligosaccharide-zijketens van glycoproteïnen met met hydrazine gefunctionaliseerde agarose, die door omzetting van in de handel verkrijgbare, geactiveerde, estergroepen bevattende agarose met hydrazinehydraat was bereid. [Zie Biological Chemistry Hoppe-Seyler deel 368 (7) 767, 768 30 (1987)].

Opgave en oplossing

De toepassing van aan polymeer gebonden antilichamen en antigenen voor het aantonen van de aanwezigheid van specifieke stoffen is tot een veel gebruikt biochemisch-analytisch instrument geworden. (Zie 35 Encyclopedia of Polymer Science and Technology, deel 2, J. Wiley 1985, blz. 55-59). De nadruk verdient de toepassing voor het aantonen van speciale hormonen, bloedbestanddelen, normale en abnormale celtypen, ziekteverwekkers tot aan moleculen, die indicatief zijn voor de aanwezigheid van kwaadaardige tumoren.

40 Bovendien vinden monoklonale antilichamen ook toepassing in de

therapie. Zo bestaat b.v. een kans, lethaal werkzame agentia, b.v. werkzame stoffen of radio-isotopen aan voor kanker specifieke antilichamen te hechten met het doel, dat dit complex de doelcel ervan uitzoekt en daaraan bindt en deze tenslotte vernietigt zonder de omgeving nadelig te beschadigen.

Bij de omgang met antilichamen moet er van worden uitgegaan, dat deze zowel met betrekking tot de pH-waarde alsook met betrekking tot de ionensterkte van het de antilichamen omgevende milieu een beperkte stabiliteit tonen. Vanzelfsprekend is ook een chemische modificatie van antilichamen met het doel van de covalente fixatie bijvoorbeeld aan dragermaterialen niet zonder problemen, omdat ten minste de bindingscapaciteit voor het antigeen niet benadeeld mag worden. Niet ten onrechte wordt er op gewezen, dat conventionele methoden van de immobilisatie van antilichamen op vaste dragers door middel van broomcyaan, 1,1-carbonyldiimidazool, perjodaatoxydatie alsmede door middel van de epoxy-chemie potentieel tot vorming via nucleofiel actieve groepen zoals b.v. amino-, thio- of hydroxylgroepen, nabij de bindingsplaats van antigeen leiden en daarmee het bindingsvermogen kunnen benadelen. [Zie K. Yim, Biological Chemistry, Hoppe-Seyler deel 386 (7) 785 (1987)]. In de literatuur wordt terecht benadrukt, dat de samenstelling van de polymere drager via de eigenschappen en de geschiktheid ervan als drager beslist (K. Buchholz red., in Characterization of Immobilized Biocatalysts loc. cit. blz. 64). Tengevolge van de voorstellen in de literatuur heerst een buitengewoon rijke keuze aan potentiële dragermaterialen, die zowel uit in hoofdzaak anorganisch materiaal, gemodificeerde natuurlijke stoffen of synthetische organische polymeren kunnen bestaan. Bij Yim (loc. cit.) vindt de binding van de antilichamen door covalente binding door middel van thiosemicarbazide aan silicagel plaats.

Met het oog op de rol, die aan drager gebonden antilichamen in de biochemie en de geneeskunde reeds spelen, bestond behoefte aan geoptimaliseerde dragersystemen op basis van polymere dragers, waarbij enerzijds de werkzaamheid van de aan drager gebonden antilichamen zo weinig mogelijk benadeeld, anderzijds het dragersysteem met betrekking tot stabiliteit, toepassingsbreedte en doelmatigheid, geoptimaliseerd dient te zijn.

Gevonden werd, dat de eisen van de techniek door de immobilisatie volgens de uitvinding aan specifieke polymere dragers op bijzondere wijze worden vervuld. De uitvinding heeft betrekking op geïmmobiliseerde, door middel van het gemodificeerde koolhydraatgebied ervan covalent aan een matrixpolymeer gebonden antilichamen, waarbij de binding

van het antilichaam door de condensatie tussen ten minste een aldehyd-
groep van het geoxydeerde koolhydraatgebied en ten minste een epoxy-
functie van een reactief, epoxygroepen bevattend matrixpolymeer (MP)
door middel van een bifunctioneel reagens (BR), dat aan de eindpositie
5 van een ten minste uit drie leden bestaande, afstand houdende eenheid
een voor de condensatie met de aldehydgroep geschikte aminogroep en aan
de andere eindpositie een covalent met de epoxyfunctie reagerende groep
draagt, wordt bewerkstelligd.

Het matrixpolymeer MP

10 In het bijzonder gaat het bij het matrixpolymeer (MP) om een
verknoopt copolymeer uit acrylamide resp. methacrylamide en glycidyl-
acrylaat resp. -methacrylaat, dat bij voorkeur uit parelvormige deel-
tjes bestaat. Dergelijke matrixpolymeren worden in DE-C-2.722.751 resp.
US-A-4.190.713 alsmede US-A-4.511.694 beschreven. De parels bezitten in
15 de regel een diameter van 5-1000 μm , in het bijzonder 30-1000 μm
en bezitten een inwendige holle ruimte (holle parels). Als aanknopings-
punt voor het gehalte aan glycidylgroepen in het matrixpolymeer MP, die
tot reactie kunnen worden gebracht, wordt een waarde van 0,8-2,5
/ μmol per mg droog dragermateriaal genoemd. Andere kenmerkende gege-
20 vens voor een in de handel gebruikelijk matrixpolymeer (EUPERGIT C van
Röhm GmbH), dat voor matrixpolymeren MP van het aangegeven type re-
presentatief is, kunnen aan de volgende tabel worden ontleend.

Kenmerkende gegevens	Dimensie
Opzwellvermogen (pH 7)	
volume vochtige deeltjes	
5 - gemiddelde korrelgrootte:	140-180 μm
- poriëndiameter:	40 nm
- uitsluitingsgrens = M_{LIM} :	2.10 ⁵ dalton
- bindingsactief oppervlak:	180 m ² /g (droog)
- epoxygehalte:	800-1000 mmol/g (droog)
10 - wateropname:	2,3 ml/g (droog)
- dichtheid = d_4^{20} :	1,20
- stortdichtheid:	0,34 g/ml
- bindingscapaciteit: (bij gebruikelijke omstandigheden)	
15 menselijk albumine:	48 mg/g (vochtig)
menselijk IgG:	34 mg/g (vochtig)
- zwelgedrag t.o.v. water:	1 : 1,4
	1 ml (droog) geeft
	1,4 ml (vochtig)
20 - oplosbaarheid (in water, buffers en organische oplosmiddelen):	onoplosbaar
- drukstabiliteit:	300 bar

Onder de elektronenmicroscopie herkent men de macroporeuze structuur van de parels met kanalen en holle ruimten, die een diameter van 100-2500 nm bezitten, zodat enzym- resp. substraatmoleculen met een grootte van 1-10 nm het totale inwendige van de macroporeuze matrix kunnen bereiken.

Uitvoering van de uitvinding

30 - Plaats-specifieke modificatie van de antilichamen

In principe zijn in het kader van de onderhavige uitvinding alle antilichamen geschikt, die zoals bekend, een gehalte aan koolhydraatgroepen bevatten en, die voor de chemische modificatie en daarop volgende fixatie toegankelijk zijn. Als aanknopingspunt kan van een gehalte van ongeveer 3% koolhydraatbestanddeel bij de antilichamen worden uitgegaan. In het middelpunt van de belangstelling staan monoklonale antilichamen. Werkwijzen ter bereiding van monoklonale antilichamen zijn voldoende bekend. [Zie Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 3de dr. deel 23, J. Wiley (1983), blz. 637 tot 643; D. Baron, U. Hartlaub, Humane Molekulare Antikörper, Gustav Fischer

Verlag, Stuttgart, New York 1987].

Daarbij kan in het bijzonder als volgt worden te werk gegaan: De bijvoorbeeld door positieve zuiveringsprocessen, zoals affiniteitschromatografie, of door negatieve zuiveringsprocessen (eliminering van de overmaat aan andere cellen) zoals b.v. Panning, complement-lyse en E-rozetvorming van gezuiverde lymfocyten resp. monoklonale antilichamen worden bij voorkeur vóór de oxydatie gedialyseerd, bijvoorbeeld met een geschikte verenigbare buffer, in het pH-traject van ongeveer 5,5. De oxydatie van het koolhydraatbestanddeel tot formylgroepen kan volgens op zichzelf bekende wijze chemisch door middel van oxydatie met perjodaat, of - minder de voorkeur verdienende - enzymatisch door middel van de enzymen galactose-oxidase en katalase worden uitgevoerd.

Door werken bij relatief lage pH, bij voorkeur in het traject van ongeveer 5,5, wordt het gevaar van de inwendige verknoping van de antilichamen verminderd tot uitgesloten. Een oxydatiemethode, die de voorkeur verdient, bestaat in de oxydatie met natriumperjodaat, bij voorkeur 0,1 molair in een geschikte, inerte bufferoplossing, doelmatig in het pH-traject 5,5, bijvoorbeeld in 0,1 molaire acetaatbuffer. Bij voorkeur heeft de reactie bij relatief lage temperatuur, ongeveer 0-5°C en in het donker plaats.

De oxydatie, die volgens de orde van grootte gewoonlijk binnen een uur kan worden afgesloten, wordt afgestopt, bijvoorbeeld door toevoeging van kleine hoeveelheden ethyleenglycol. Daarna worden de antilichamen doelmatig op een kolom gelchromatografisch opgewerkt. (Zie Ullmann's Encyclopädie der techn. Chemie, 4de druk, deel 5, Verlag Chemie, blz. 167; Gel-Filtration, Theory and Practice, Pharmacia Fine Chemicals 1979, Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg 1979). Daarvoor is b.v. een dextran-gel (b.v. het produkt SEPHADEX G 25 van Pharmacia), bij voorkeur in evenwicht gebracht met een bufferoplossing in het pH-traject van 5, geschikt. De concentratie van de antilichamen kan door concentratie, bijvoorbeeld door ultrafiltratie geschieden. De winning van de antilichamen ligt gewoonlijk bij >90%.

- Koppeling van de plaats-specifiek gemodificeerde antilichamen aan polymere dragers

De verkregen geoxydeerde en gezuiverde antilichamen worden in een geschikt, enigszins zuur milieu, bijvoorbeeld in acetaatbuffer en in het pH-traject van ongeveer 5,5 in concentraties tussen 60 en 200 µg met de met hydrazide gesubstitueerde, gemodificeerde, polymere drager (HY-MP) in hoeveelheden van 100 mg gedurende een bepaalde tijdsperiode, bijvoorbeeld 16±4 uur bij verlaagde temperatuur, bijvoorbeeld

bij 4°C geïncubeerd. Het gehalte aan geïmmobiliseerd antilichaam wordt volgens de Bradford-methode; zie Analyt. Biochem. 72, 248 (1976), uit het verschil tussen het oorspronkelijke en het overblijvende gehalte aan antilichaam bepaald. De via hydrazinederivaten gebonden anti-

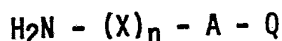
- 5 lichamen hebben - in vergelijking met de aan de niet gemodificeerde polymere drager P gebonden antilichamen - een verbeterde bindingscapaciteit van antigeen, die de maximale theoretische waarde van 2 mol antigeen per mol antilichaam benadert, in het bijzonder, wanneer een relatief geringe belading met antilichaam aanwezig is.

10 - Modificatie van het matrixpolymeer MP

- Het uit (meth)acrylamide en glycidyl(meth)acrylaat opgebouwde matrix-polymeer (MP), dat bij voorkeur uit parelvormige deeltjes bestaat (zie boven), speciaal het produkt EUPERGIT® C van Röhm GmbH, Darmstadt wordt doelmatig in een geschikte bufferoplossing in het alkalische traject, bijvoorbeeld in een fosfaatbuffer en bij pH 8,8 gedurende een bepaalde tijdsperiode, bijvoorbeeld 16±3 uur bij kamertemperatuur met het bifunctionele reagens (BR) bij voorkeur een bishydrazide van een alifatisch dicarbonzuur, in het bijzonder adipinezuurdihydrazide, behandeld. Bij voorkeur past men het bifunctionele reagens (BR) in
 15 hoeveelheden van 0,1-10 mol BR per gram polymere drager MP, in het bijzonder EUPERGIT® C, droog gewicht, in het bijzonder 1 /μmol BR per g droog gewicht toe. Doelmatig wast men het gemodificeerde matrixpolymeer HY-MP met een standaard fosfaatbuffer (PBS). Er kan bij voorkeur met buffer (b.v. 0,1 molaire acetaatbuffer) pH 5,5 in evenwicht worden
 20 gebracht en bij lagere temperatuur, b.v. bij 4°C worden opgeslagen.

25 Het bifunctionele reagens (BR)

- Volgens de definitie bestaat het bifunctionele reagens BR uit een ten minste uit drie leden bestaande, afstand houdende eenheid met een de ene eindpositie markerende, voor condensatie met de aldehydgroep
 30 geschikte aminogroep en een covalent met de epoxyfunctie van het matrixpolymeer MP reagerende groep aan de andere eindpositie. Bij voorkeur kan het bifunctionele reagens (BR) wat de formule betreft als:

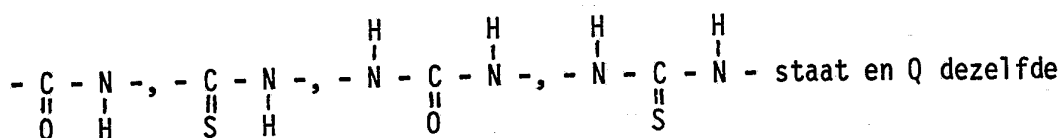


35

worden voorgesteld, waarbij A een afstand gevende groep, bij voorkeur een alkyl- of cycloalkylrest, met ten minste 3 en ten hoogste 12 ketenleden, bij voorkeur -CH₂-eenheden, waarbij eventueel een of meer van de ketenleden door zuurstof kan zijn vervangen, en waarbij n voor 0 of

40 1, X voor een rest

- 8802236



betekenis als $-X-NH_2$ bezit of voor $-NH_2$ kan staan. Bijzonder bij

- 5 voorkeur stelt het bifunctionele reagens BR het bishydrazide van een carbonzuur ($A = (CH_2)_{3-6}$; $X = \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - N - Q = - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - N - NH_2$)

voor. Zeer bijzondere voorkeur verdient het adipinezuurdihydrazide. In het geval BR voor een alkyleendiamine staat ($n = 0$, $A =$

- 10 (CH₂)₃₋₆, Q = NH₂) wordt de dubbele binding van de bij de condensatie gevormde Schiff'se base voordelig gereduceerd, bijvoorbeeld met natriumboorhydride.

Bepaling van de immuno-capaciteit van de gefixeerde antilichamen
volgens de uitvinding

- De bindingscapaciteit van de geïmmobiliseerde antilichamen volgens de uitvinding wordt bepaald door meting van de antigenen in het bijzonder van enzymen zoals b.v. het anti-carboxypeptidase (CPA), die zich aan de antilichamen binden. Tot dit doel wordt bijvoorbeeld CPA in gelijkblijvende hoeveelheden in PBS aan reageerbuizen toegevoegd, die telkens 100 mg van het gemodificeerde matrixpolymeer HY-MP, echter met verschillende belading aan geïmmobiliseerde monoklonale antilichamen dragen. Het aan de antilichamen van het matrixpolymeer gebonden CPAbestanddeel werd als volgt bepaald:

- 25 α) door bepaling van het verschil van het betreffende proteïnegehalte door middel van de BRADFORD-proef en de enzymatische activiteit, die in de uitgangsooplossing en tenslotte in de restoplossing aanwezig was.

- 30 β) door bepaling van de enzymatische activiteit van het aan de parels van de HY-MP-drager geïmmobiliseerd enzym, bij CPA b.v. met behulp van de ninhydrine-methode. Het aan de drager gebonden bestanddeel aan enzym werd na incubatie met natriumcarbonaatbuffer met pH 10,5 geëluëerd. Nadat de aanpassing van de pH heeft plaatsgevonden, wordt de activiteit van het geëluëerde enzym, bijvoorbeeld van CPA bepaald.

- De bepaling via de enzymactiviteit is in al die gevallen geschikt, waar antilichamen aanwezig zijn, die de enzymactiviteit niet benadelen. Het blijkt, dat de oxydatief gemodificeerde antilichamen, die aan de parels van de HY-MP-drager zijn gefixeerd, de volledige immunologische activiteit ervan voor de binding van het enzym, bijvoorbeeld CPA, behouden.

. 8802236

De molaire verhouding van monoklonaal antilichaam tot CPA bewoog zich in het kader van 2:1 tot 1:1.

Voordelige werkingen

Zoals reeds vermeld strekt de leer volgens de uitvinding zich
5 uit tot specifieke conjugaten van oligosaccharide bevattende antilichamen in de meest algemene zin.

Vermeld worden in het bijzonder monoklonale antilichamen, die tegen antigenen, bijvoorbeeld van de volgende soort, zijn gericht:

. 8802236

Klasse antigeen	Antigeen
bacterieel	tetanus-toxoide
5	H. influenza type b polysaccharide
	difterie-toxine
	Chlamydia trachomatis
	M. leprae
	lipopolysaccharide/endotoxine
	pneumokokken
10	LPS van P. aeruginosa
	exotoxine van P. aeruginosa
	streptokokken groep A koolhydraat
viraal	X31 influenzavirus-nucleoproteïne
	mazelenvirus
15	HSV glycoproteïne D
	mazelenvirus, nucleocapside
	zytomegalie-virus
	influenza A-virussen
	rode hondvirus-antigenen
20	HTLV I
	varicella-zoster
	HBsAg
auto-immuun	dubbelstrengig DNA
	pancreascellen (diabetes mellitus)
25	Myasthenia gravis, antiidiotypen
	thyreotropine-receptor
	reuma-faktor
	acetylcholine-receptor
	schildklier
30	sperma
tumor	mamma-Ca
	prostaat-Ca
	longen-Ca
	maag-Ca
35	melanoom
	GD2 (menselijk melanoom)
	glioom
	rectum-Ca
	leukemie
40	cervix-Ca

Klasse antigeen	Antigeen
weefsel/bloed	rhesus D
	bloedgroepenantigeen A
5	HLA-A,B,C,DR
	intermediaire filamenten
andere	malaria
	Forssman-antigeen
	schaaperythrocyten
10	nitrofenol
	dinitrofenol
	trinitrofenol
	Keyhole limpet hemocyanin (KLH)
	reumafaktor
15	insuline

De fixatie volgens de uitvinding biedt een reeks van voordelen ten opzichte van de stand der techniek, in het bijzonder bij toepassing van dicarbonzuurhydraziden, in het bijzonder adipinezuurhydrazide. Voert men bijvoorbeeld de condensatie bij een pH-waarde van ongeveer 5,5 uit, dan verhindert men een condensatie van de aminogroepen van de antilichamen met de eigen aldehydfuncties ervan.

De chemische binding via het hydrazide is wenselijk stabiel en inert. Niet specifieke binding van de antilichamen wordt geminimaliseerd. Een blokkering na de fixatie van de antilichamen is overbodig.

De onderstaande voorbeelden dienen ter toelichting van de uitvinding.

Voorbeeld I

Koppeling van de aldehydgroepen bevattende monoklonale antilichamen met het gemodificeerde matrixpolymeer HY-MP als drager

Gemodificeerde en geoxydeerde, monoklonale antilichamen uit voorbeeld II worden in concentraties, die tussen 60 en 200 μg variëren, in telkens 1 ml van een acetaatbuffer met pH 5,5 met 400 μl van het gemodificeerde matrixpolymeer MP uit voorbeeld III (100 mg) 16 uur bij 4°C geïncubeerd. Het gehalte aan geïmmobiliseerd antilichaam wordt volgens de BRADFORD-methode uit het verschil tussen de oorspronkelijke en de overblijvende hoeveelheden aan antilichamen bepaald.

De volgens de uitvinding gefixeerde antilichamen hebben in vergelijking tot direct via de oxiraanfunctie gebonden conjugaten een hogere

antigeen-bindingscapaciteit (b.v. ten opzichte van CPA). Deze reikt tot aan de theoretische maximale waarde van twee antigenen per mol antilichaam, in het bijzonder wanneer geringe beladingen aan antilichamen worden toegepast (zie tabel B).

5

Tabel B

Binding van de gezuiverde, geoxydeerde, monoklonale antilichamen aan matrixpolymeer HY-MP

10	Anti- lichaam	Toegepaste antilichamen per g droge drager MP (mg)	Gebonden antilichamen per g droge drager MP (mg)	Antigeen CPA per g drager MP (mg)	Molaire verhouding antigeen tot antilichaam (mol/mol)
15					
	CPA 1	0,7	0,7	0,32	2,0
	CPA 6	0,5	0,5	0,30	2,5
	CPA 6	17,5	7,5	4,5	2,5
	CPA 7	1,0	0,7	0,34	2,1
20	CPA 8	0,8	0,8	0,32	1,65
	CPA 8	25,0	13,0	4,40	2,5
	CPA 2	3,5	1,0	0,36	1,5
	CPA 3	2,2	1,0	0,40	1,7
	CPA 5	3,0	2,0	0,40	1,0

25

Voorbeeld II

Bereiding van de aldehydgroepen bevattende monoklonale anti-CPA-antilichamen

Een reeks door affiniteitschromatografie gezuiverde monoklonale anti-CPA-antilichamen werden vóór de oxydatie met perjodaat tegen 0,1 M acetaatbuffer pH 5,5 gedialyseerd. Elk monoklonaal antilichaam werd met 0,1 M natriumperjodaat opgelost in 0,1 M acetaatbuffer van pH 5,5 (10 ml) behandeld. Bij deze lage pH-waarde wordt de inwendige verknoping van de antilichaam-moleculen onderdrukt. De reactie werd gedurende 1 uur bij 0°C in het donker uitgevoerd.

Men stopt de oxydatiewerking door toevoeging van drie druppels ethyleenglycol voordat men op een Sephadex® G 25 kolom, vooraf in evenwicht gebracht met 0,1 M acetaatbuffer van pH 5, brengt. De geoxydeerde antilichamen worden in een Amicon-ultrafiltratiecel, voorzien van een PM 50-membraan, van 10 ml geconcentreerd en het gehalte aan

8802236

proteïne wordt door middel van de BRADFORD-methode bepaald. De winning van de antilichamen komt gewoonlijk boven 90%.

Voorbeeld III

Modificatie van het matrixpolymeer MP

- 5 2 g van het verknoopte copolymeer van methacrylamide/glycidylmethacrylaat (EUPERGIT[®] C, produkt van Röhm GmbH, Darmstadt) wordt met 0,1 M in de handel verkrijgbaar adipinezuurdihydrazide in 20 ml van een 0,2 M fosfaatbuffer, pH 8,8, 16 uur bij kamertemperatuur behandeld. De gemodificeerde polymere drager wordt uitvoerig met PBS gewassen, met
- 10 0,1 M acetaatbuffer, pH 5,5, in evenwicht gebracht en bij 4°C bewaard.

Conclusies

1. Geïmmobiliseerde, door middel van het gemodificeerde koolhydraatgebied ervan covalent aan een matrixpolymeer gebonden antilichaam, met het kenmerk, dat de binding van het antilichaam door de condensatie
 5 tussen ten minste één aldehydgroep van het geoxydeerde koolhydraatgebied en ten minste één epoxyfunctie van een epoxygroepen dragend matrixpolymeer (MP) door middel van een bifunctioneel reagens (BR), dat aan de ene eindpositie van een ten minste uit drie leden bestaande, afstand houdende eenheid, een voor de condensatie met de aldehydgroep geschikte aminogroep en aan de andere eindpositie een covalent met de
 10 epoxyfunctie reagerende groep draagt, wordt bewerkstelligd.

2. Werkwijze ter bereiding van de geïmmobiliseerde antilichamen volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men de aldehydgroepen door oxydatie van de hemiacetaalgroepen van het koolhydraatgebied met perjodaat vormt.
 15

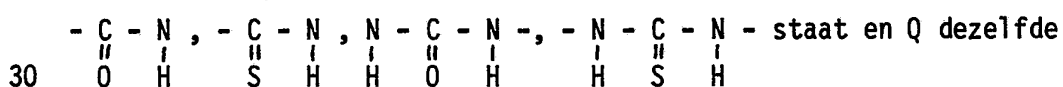
3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat men de oxydatie met perjodaat bij een pH-waarde in het traject van 5 tot 5,5, bij voorkeur in een geschikte inerte buffer, uitvoert.

4. Werkwijze volgens conclusies 2 en 3, met het kenmerk, dat men
 20 voor de afsluiting van de oxydatie met ethyleenglycol behandelt.

5. Werkwijze ter bereiding van de geïmmobiliseerde antilichamen volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men een bifunctioneel reagens BR met de formule

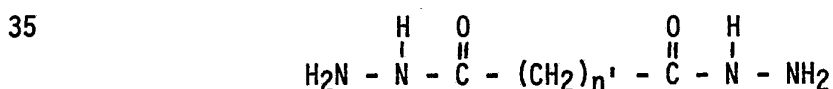


waarbij A voor een ten minste uit drie leden bestaande, afstand houdende eenheid (spacer), n voor 0 of 1, X voor een rest



betekenis als -X-NH₂ bezit of voor -NH₂ staat, toepast.

6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat men als bifunctioneel reagens BR een verbinding met de formule



waarin n' voor 3-6, bij voorkeur 3-4 staat, toepast.

7. Werkwijze ter bereiding van de geïmmobiliseerde antilichamen
 40 volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men als epoxygroepen dragend

matrixpolymeer MP een copolymeer uit in hoofdzaak acrylamide of methacrylamide en glycidyl(meth)acrylaat toepast.

8. Werkwijze ter bereiding van de geïmmobiliseerde antilichamen volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men het reactieprodukt van
5 een bifunctioneel reagens BR volgens conclusie 5 met het matrixpolymeer volgens conclusie 7 bij pH 8,8-9 bereidt.

9. Werkwijze ter bereiding van de geïmmobiliseerde antilichamen volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men het reactieprodukt van een bifunctioneel reagens BR met het matrixpolymeer MP met de aldehyd-
10 groep van het geoxydeerde koolhydraatgebied van het antilichaam condenseert.

10. Werkwijze volgens conclusie 9, met het kenmerk, dat men de reactie in het pH-traject 5-5,5 uitvoert.

++++++