



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 28 888 T2 2006.08.24

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 992 512 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 28 888.6

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 307 762.7

(96) Europäischer Anmeldetag: 01.10.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 12.04.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 14.12.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 24.08.2006

(51) Int Cl.⁸: C07J 5/00 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

102836 P 02.10.1998 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, N.Y.,
US

(72) Erfinder:

Warren, Harold C., Rush, New York 14543, US;
Snyder, Brian A., Rochester, New York 14616, US;
Sprague, Lisa D., Naples, New York 14512, US;
Lynn, Shirley Y., Rochester, New York 14615, US;
Contestable, Paul B., Rochester, New York 14624,
US; Groth, Holly L., Hamlin, New York 14464, US

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

(54) Bezeichnung: Reduziertes Cortisolkonjugat

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 eingelebt, 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 betrifft Hapten- und Konjugatmarken, die eine verbesserte Spezifität für Anti-Cortisolantikörper aufweisen, Verfahren für deren Herstellung und den Gebrauch in Immuntests für die Erkennung von Cortisol. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Konjugate, die Meerrettichperoxidase und reduziertes Cortisol umfassen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Cortisol ist das Hauptglucocorticoid in Menschen. Es wird hergestellt und ausgeschüttet durch die Zona Fasciculata und die Zona Reticularis des adrenalen Cortex. Es ist an der Regulation des Kohlenhydrat-, Protein- und Fettmetabolismus beteiligt. Cortisolspiegel können aufgrund von Operationen und anderen Traumatas um das Zehnfache ansteigen, da das Steroid wirkt, um vor Gefäßkollaps zu schützen, Entzündung reduziert und das Immunsystem unterdrückt.

[0003] Es gibt drei primäre medizinische Veränderungen, die mit Hyperadrenalinismus assoziiert sind; Cushingssyndrom, Hyperaldosteronismus und kongenitale Adrenalhyperplasie. Cushingssyndrom ist der Begriff, der verwendet wird, um jeden Zustand zu beschreiben, der durch eine erhöhte Konzentration von zirkulierenden Glucocorticoiden, normalerweise Cortisol, entsteht (Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation; Lawrence A. Kaplan, Amadeo, J. Pesce, CV Mosby Company, 1989, S. 673–4).

[0004] Die Erkennung und Mengenbestimmung des Cortisols im menschlichen Serum, Plasma oder Urin ist entscheidend für die richtige Diagnose, Behandlung und Nachverfolgung, die durch mit Cortisol zusammenhängenden Konditionen entstehen.

[0005] Kompetitive Bindungsmuntests für Cortisol umfassen Anti-Cortisolantikörper, die normalerweise an ein immobilisiertes oder immobilisierbares Substrat gebunden sind und markiertes Cortisol oder markierte Analoga (Derivative) von Cortisol. Es soll verstanden werden, daß, wenn auch immer Bezug genommen wird auf markiertes Cortisol, wenn nicht anders angedeutet, der Begriff so gemeint ist, daß er markierte Analoga (Derivative) von Cortisol umfaßt. Markiertes Cortisol konkurriert mit Cortisol um eine limitierte Zahl von Anti-Cortisolantikörper-Bindestellen. Signale, die von freiem oder gebundenem markiertem Cortisol empfangen werden, werden als ein Maß für die Menge des Cortisols bestimmt.

[0006] Die Empfindlichkeit und die Spezifität eines Immuntests für Cortisol hängen von dem markierten Cortisol ab. Es ist wichtig, daß markiertes Cortisol effektiv um die begrenzte Anzahl von Anti-Cortisolbindungsstellen mit Steroiden konkurriert, die strukturell ähnlich zu Cortisol sind, das in der Probe vorhanden ist. Sonst kann eine klinisch akzeptable Bestimmung der Menge des Cortisols in der Probe nicht erhalten werden.

[0007] Individuen, die eine Defizienz des Enzyms 11 β -Hydroxylase aufweisen oder die Metyrapon erhalten, haben eine extrem erhöhte Menge von 11-Desoxycortisol, das strukturell zu Cortisol ähnlich ist (Fundamentals of Clinical Chemistry, Tietz, N. W., W. B. Saunders Co., 1987, S. 569) und das potentiell mit markiertem Cortisol um die Bindung an Anti-Cortisolantikörper konkurrieren kann. Andere cortisolähnliche Steroide, die in der Probe anwesend sein können, die potentiell mit dem markierten Cortisol um die Anti-Cortisolantikörper konkurrieren können, schließen Prednisolon, Cortison und Corticosteron ein. Solche Konkurrenz mit markiertem Cortisol für Anti-Cortisolantikörper wird Kreuzreakтивität genannt.

[0008] Kommerzielle Cortisoltests können Kreuzreaktivität mit allen oben angegebenen Steroiden zeigen. Zum Beispiel wurde eine Kreuzreaktivität mit 11-Desoxycortisol um mehr als 10% beobachtet; was die Genauigkeit des Tests für Cortisol ernsthaft beeinträchtigt. Aquakultur 117, Seiten 351–63 (1993) beschreibt 3-Carboxymethyl-oxim verbundene Cortisolkonjugate zur Verwendung in ansteigenden Antikörpern und in Immuntests.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die Probleme, die mit Tests des Stands der Technik auf Cortisol assoziiert waren, wurden durch die Verwendung der Konjugate überwunden, die weiter unten beschrieben werden.

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen, die neue konjugierte Cortisolkonjugate um-

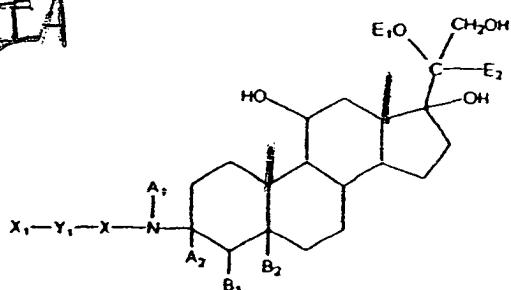
fassen, Verfahren zu deren Herstellung und den Gebrauch in Immuntests auf Cortisol.

[0011] In einem anderen Aspekt betrifft sie Konjugate des reduzierten Cortisols als Immunogene oder Hapten zur Hervorrufung von Anti-Cortisol- oder anti-reduzierten Cortisol-Antikörpern.

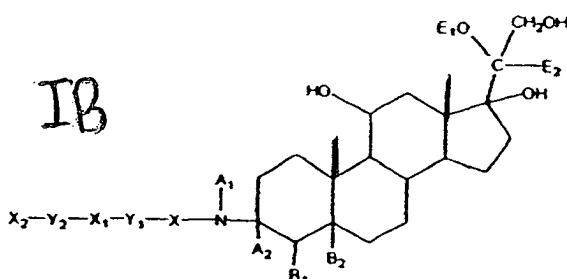
[0012] Es wurde unerwarteterweise gefunden, daß markierte reduzierte Cortisolkonjugate der vorliegenden Erfindung effektiv mit Cortisol-ähnlichen Steroiden um die Bindung an Anti-Cortisolantikörper konkurrieren, wobei sie signifikant weniger Kreuzreaktivität aufweisen, verglichen mit markierten Cortisolkonjugaten des Standes der Technik. Immuntest auf Cortisol umfassen markierte reduzierte Cortisolkonjugate der vorliegenden Erfindung, die sowohl verbesserte Spezifität als auch Empfindlichkeit für die Bestimmung von Cortisol aufweisen.

[0013] Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung ein reduziertes Cortisolkonjugat der Formel IA, IB und ID zur Verfügung, die über Verbindungen der von Formel IC hergestellt werden können.

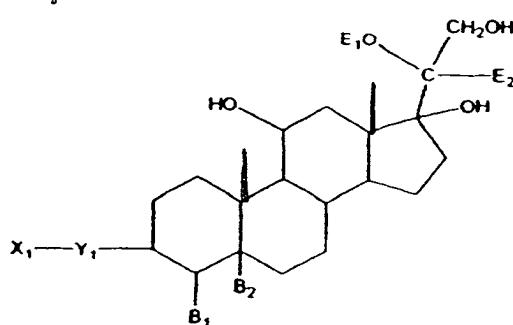
IA



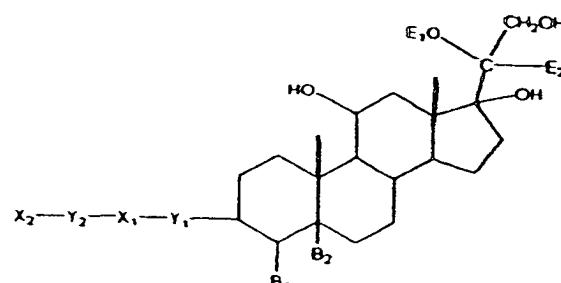
IB



IC



ID

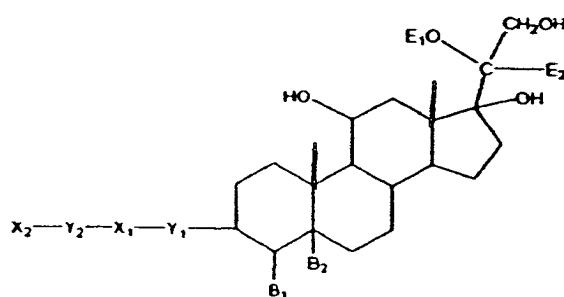
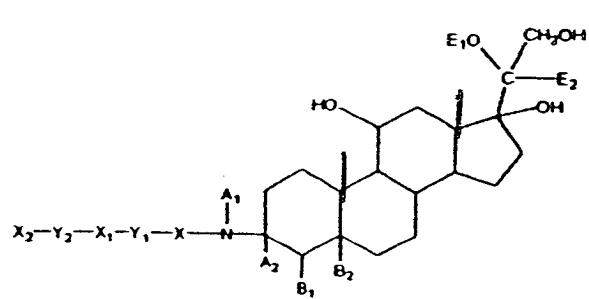
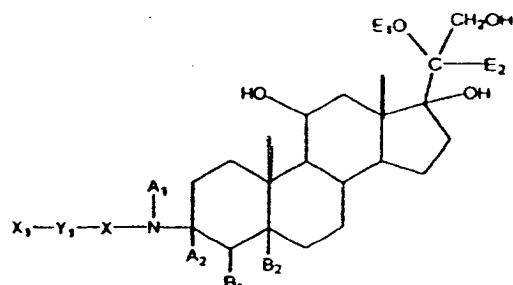


5 IC

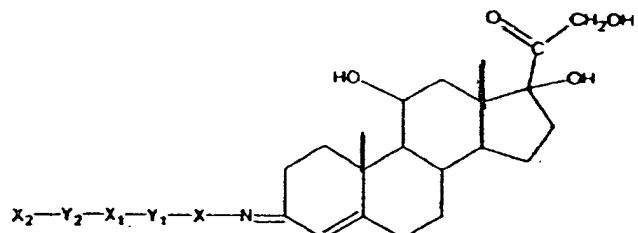
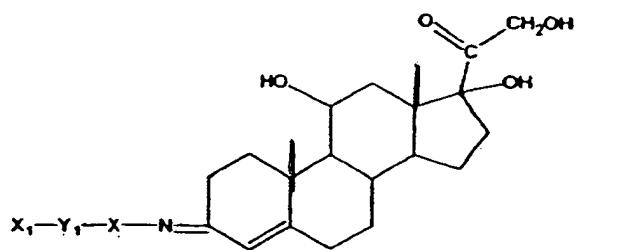
ID

worin X O, S, Sulfonyl oder Phosphono ist; X₁ ist ein markiertes oder nicht markiertes natürliches oder synthetisches Polymer oder ein Marker; Y₁ ist eine Verbindungsgruppe oder eine Bindung; X₂ ist ein markiertes oder nicht markiertes natürliches oder synthetisches Polymer oder ein Marker; A₁ und A₂ sind jeweils Wasserstoff oder A₁ und A₂ bilden gemeinsam eine Einzelbindung; B₁ und B₂ sind jeweils Wasserstoff, oder B₁ und B₂ bilden zusammen eine Einzelbindung; und E₁ und E₂ sind jeweils Wasserstoff, oder E₁ und E₂ bilden zusammen eine Einzelbindung; unter der Voraussetzung, daß mindestens eines von A₁ und A₂ oder B₁ und B₂ oder E₁ und E₂ jeweils Wasserstoff sind.

[0014] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf Verfahren für die Herstellung von reduzierten Cortisolkonjugaten. Dementsprechend stellen wir ein Verfahren für die Herstellung von reduzierten Cortisolkonjugaten mit folgender Formel zur Verfügung:

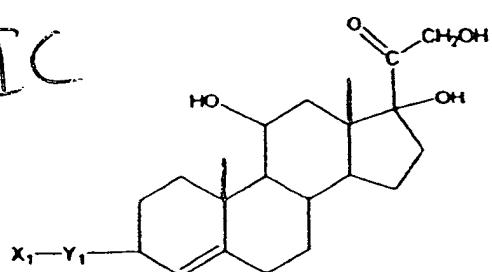


worin X, X₁, Y₁, X₂, Y₂, A₁, A₂, B₁, B₂, E₁ und E₂ wie oben definiert sind, umfassend:
Reagieren einer Verbindung der Formel

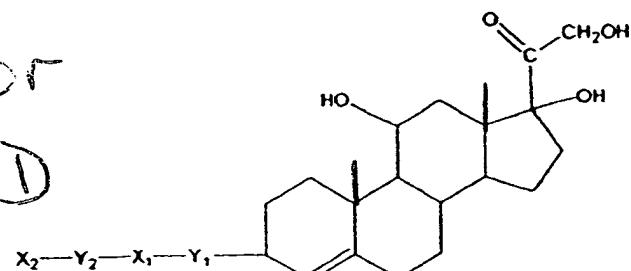


II A

, II B

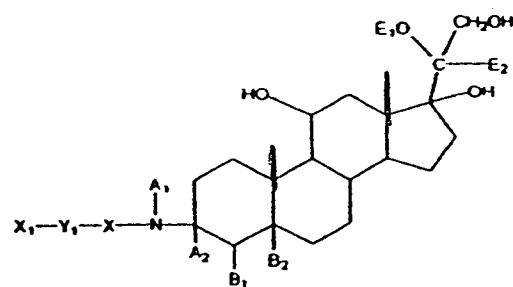
III C

OR

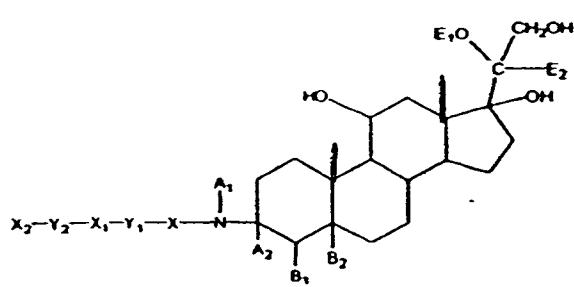
III D

mit einem reduzierenden Mittel.

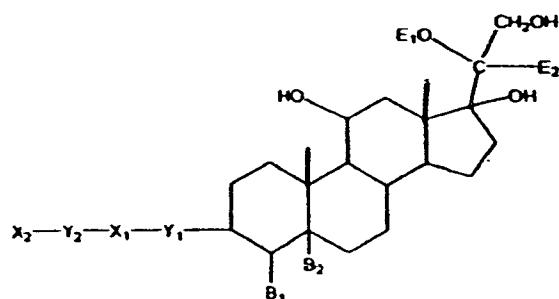
[0015] Eine alternative Methode wird zur Herstellung von reduzierten Cortisolkonjugaten mit der Formel zur Verfügung gestellt:



IA



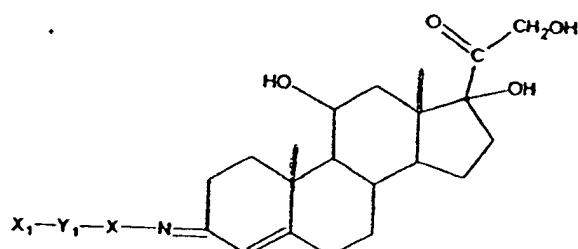
, IB



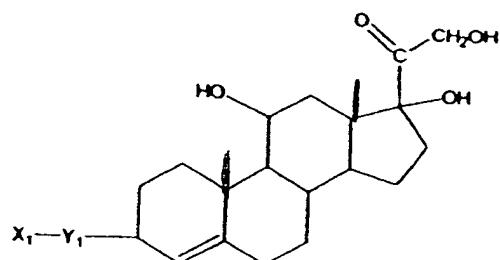
ID

worin X, X₁, Y₁, X₂, Y₂, A₁, A₂, B₁, B₂, E₁ und E₂ wie oben definiert sind, umfassend in folgenden Schritten:

(i) Reagieren einer Verbindung der Formel

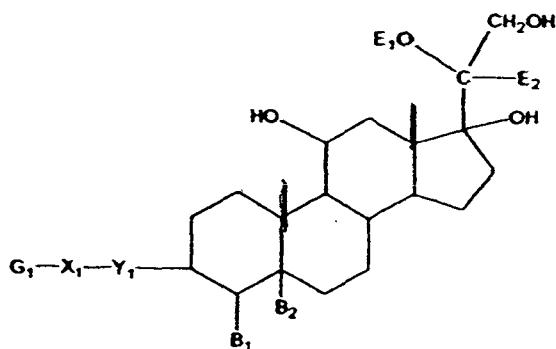
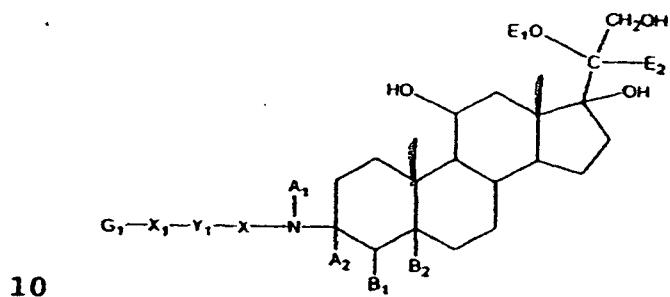


IIA



IIC

mit einem reduzierenden Mittel, wodurch eine Verbindung der Formel IA oder IC gebildet wird; und
(ii) gegebenenfalls, Reagieren einer Verbindung der Formel IA oder IC mit einem ersten Kopplungsmittel, wobei die Verbindung der Formel

**IIIA****IIIC**

gebildet wird, worin G_1 eine Kopplungsgruppe darstellt;

(iii) gegebenenfalls, Reagieren von X_2 mit einem zweiten Kopplungsmittel, wobei X_2-G_2 gebildet wird, worin G_2 die Kopplungsgruppe darstellt, die in der Lage ist, eine kovalente Bindung mit der Kopplungsgruppe G_1 zu bilden, und worin G_1 und G_2 dieselben sein können;

(iv) gegebenenfalls, Reagieren einer Verbindung der Formel IA oder IC mit X_2-G_2 , worin G_2 in der Lage ist, eine kovalente Bindung mit einer funktionellen Gruppe X_1 zu bilden, wodurch reduziertes Cortisolkonjugat IB oder ID gebildet wird;

(v) gegebenenfalls, Reagieren von Verbindung IIIA oder IIIC mit X_2 , worin G_1 in der Lage ist, eine kovalente Bindung mit einer funktionellen Gruppe von X_2 zu bilden, wodurch reduziertes Cortisolkonjugat IB oder IC gebildet wird,

(vi) gegebenenfalls, Reagieren von Verbindung IIIA oder IIIC mit X_2-G_2 , wodurch reduziertes Cortisolkonjugat IB oder ID gebildet wird.

[0016] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren für die qualitative oder quantitative Erkennung von Cortisol zur Verfügung, das die neuen markierten reduzierten Cortisolkonjugate verwendet.

[0017] Dementsprechend stellen wir ein Verfahren zur Durchführung eines kompetitiven Tests auf Cortisol zur Verfügung, umfassend die Schritte von:

A) Inkontaktbringen einer Probe, von der vermutet wird, daß sie Cortisol enthält mit

(i) einem immobilisierten oder immobilisierbaren Rezeptor, der Cortisol bindet, wodurch Cortisol gebildet wird, das gebunden ist und Cortisol, das nicht an dem immobilisierten oder immobilisierbaren Rezeptor gebunden ist,

(ii) einem markierten reduzierten Cortisolkonjugat der Formel IA, IB, IC oder IC, wie oben definiert, wobei markiertes reduziertes Cortisolkonjugat gebildet wird, das gebunden und markiertes reduziertes Cortisolkonjugat, das nicht an dem immobilisierten oder immobilisierbaren Rezeptor gebunden ist;

B) Nachweisen von entweder dem markierten reduzierten Cortisolkonjugat, das gebunden ist, oder dem markierten reduzierten Cortisolkonjugat, das nicht an den immobilisierten oder immobilisierbaren Rezeptor gebunden ist, als ein Maß der Menge von Cortisol in der Probe.

[0018] Als ein Alternativverfahren kann die Testmethode, die oben beschrieben wurde, kombiniert werden mit einem Schritt, worin das markierte reduzierte Cortisolkonjugat, das gebunden ist, getrennt wird von dem markierten reduzierten Cortisolkonjugat, das nicht gebunden ist, zu dem immobilisierten oder immobilisierbaren Rezeptor;

[0019] Eine Alternativmethode zur Durchführung eines kompetitiven Tests auf Cortisol unter der Verwendung eines trockenen analytischen Elements ist ebenfalls dargestellt. Dar trockene analytische Element umfaßt

- a) eine Verteilungszone,
- b) eine oder mehrere Reagenzzenen,
- c) einen Träger und

gemeinsam oder getrennt in einer oder mehreren der Zonen, einen immobilisierten Rezeptor, der Cortisol bindet, und gegebenenfalls ein markiertes reduziertes Cortisolkonjugat der Formel IA, IB, IC oder ID, wie oben definiert, worin die Methode folgende Schritte umfaßt:

- A) Inkontaktbringen der Verteilungszone des trockenen analytischen Elements mit
 - i) einer Probe, von der vermutet wird, daß sie Cortisol enthält, wodurch Cortisol gebildet wird, das gebunden ist und Cortisol, das nicht an den immobilisierten Rezeptor gebunden ist,
 - ii) dem markierten reduzierten Cortisolkonjugat, wenn es nicht in dem trockenen analytischen Element vorhanden ist, wodurch markiertes reduziertes Cortisolkonjugat gebildet wird, das gebunden ist und markiertes reduziertes Cortisolkonjugat, das nicht an den immobilisierten Rezeptor gebunden ist,
- B) gegebenenfalls Trennung des markierten reduzierten Cortisolkonjugats, das gebunden ist von dem markierten reduzierten Cortisolkonjugat, das nicht an den immobilisierten Rezeptor gebunden ist; und
- C) Nachweisen von entweder dem markierten reduzierten Cortisolkonjugats, das gebunden ist oder dem markierten reduzierten Cortisolkonjugat, das nicht an den immobilisierten Rezeptor gebunden ist, als ein Maß der Menge von Cortisol in der Probe.

[0020] Im weiteren Sinne betrifft die vorliegende Erfindung Haptene oder Immunogene der Formeln IA, IB, IC oder ID wie oben definiert und Zusammensetzungen, die die Immunogene umfassen. Sie betrifft ebenfalls Verfahren zur Herstellung von Anti-Cortisolantikörpern, bei der die Immunogene der vorliegenden Erfindung verwendet werden, indem das Wirtstier immunisiert wird, durch Isolierung von Blut des Wirts und Trennung der Antikörper, die Cortisol binden, aus dem Bluts serum oder Plasma des Wirtstiers. In einem weiteren Verfahren wird die Milz, der Thymus oder andere Gewebe oder Organe, die mit Antikörper-produzierenden Zellen besiedelt sind, von dem immunisierten Wirtstier entfernt, Antikörper-produzierende Hybridoma werden durch den Gebrauch von Antikörper-produzierenden Zellen der Milz, des Thymus oder anderer Organe, die entfernt sind hergestellt, und Antikörper, die Cortisol binden, werden daraus isoliert.

[0021] In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Reduzierung von Kreuzreakтивität in Immuntests auf Cortisol, unter der Verwendung von markierten reduzierten Cortisolkonjugaten der Formeln IA, IB, IC oder ID.

[0022] Die markierten reduzierten Cortisolkonjugate der vorliegenden Erfindung, wie angegeben, konkurrieren effektiv mit cortisolähnlichen Steroiden um die Bindung an Anti-Cortisolantikörper, wobei sie signifikant weniger Kreuzreaktivität im Vergleich mit früheren künstlichen markierten Cortisolkonjugaten haben.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0023] Die Erfindung wird im Hinblick auf ein spezifisches reduziertes Cortisolkonjugat genau beschrieben, das Rinderserumalbumin und Meerrettichperoxidase umfaßt. Dies wurde gemacht, um die vorliegende Erfindung zu erläutern und ist nicht dazu gedacht, in irgendeiner Weise die Erfindung auf dieses spezielle Beispiel zu begrenzen. Andere reduzierte Cortisolkonjugate, deren Synthese und Gebrauch als Immunogene oder als reduzierte Cortisolmarker in kompetitiven und nicht-kompetitiven Immuntests und in anderen Aspekten, die aus der hier präsentierten Lehre offensichtlich sind oder die dem Fachmann bekannt wären, sind ebenfalls vorgesehen.

[0024] Ein "natürliches Polymer" zum Zweck der vorliegenden Erfindung ist hier definiert als eines, das von einer biologischen Quelle abstammt, einschließlich, aber nicht begrenzt auf Mikroorganismen, Pilze, Viren, Menschen, Kühe, Schweine, Mäuse, Katzen, Hunde, Ratten oder Insekten. Solche natürlichen Polymere schließen Proteine, Peptide, Glycoproteine, Lipoproteine und rekombinante und chemisch veränderte Spezies ein, Polysaccharide, Cellulosen, Collagene und Latexe. Die etwas spezifischeren Beispiele schließen Dextrane, Schweine-, Menschen-, Mäuse-, Ratten- und Rinderserumalbumine oder -globuline, Streptavidin, Antikörper, Enzyme, wie z.B. die Peroxidase, die β -Galactosidase und die alkalische Phosphatase ein.

[0025] Ein "synthetisches Polymer" ist hier definiert als ein Polymer, das nicht notwendigerweise direkt von einer biologischen Quelle abstammt. Es ist eines, das durch Verfahren hergestellt wurde, die dem sachkundigen Techniker gut bekannt sind. Zum Beispiel durch Monomerkondensation mittels Emulsionspolymerisation, ionische Kettenpolymerisation, Carbonylpolymerisation, radikalische Kettenpolymerisation und dergleichen. Es schließt Homopolymere, wie Polyacrylamide, Polymethacrylate, Polystyrole, substituierte Polyacrylamide,

Polymethacrylate und Polystyrole und Copolymeren, die zwei oder mehrere verschiedene monomerische Einheiten umfassen, wie Acrylamide oder substituierte Acrylamide, Styrol oder substituierte Styrole und dergleichen ein, die für einen Fachmann in dieser Technik gut bekannt sind. Es schließt Blockcopolymere ein, Graft-copolymeren, wäßrige lösliche und wäßrige unlösliche Polymere und kovalente und nicht-kovalente Kombinationen mit natürlichen Polymeren.

[0026] Der Begriff "Marker", wie er hier definiert ist, schließt ein: chemische Elemente, Verbindungen und Enzyme, die befähigt sind, direkt oder indirekt gemessen zu werden, durch Gebrauch von zum Beispiel Absorption, Fluoreszenz oder reflektierender Spektrophotometrie oder durch Strahlungserkennungsmethoden. Ein Marker kann ein natürliches oder synthetisches Polymer sein. Zum Beispiel ist Meerrettichperoxidase beides, ein Marker und ein natürliches Polymer. Aber ein Marker ist nicht notwendigerweise ein natürliches oder synthetisches Polymer.

[0027] Ein Marker, der in der Lage ist, direkt erkannt zu werden, ist einer der intrinsisch in der Lage ist, ein erkennbares Signal zu erzeugen. Solche Marker schließen organische und anorganische Substanzen ein, die zu Fluoreszenz oder Phosphoreszenz in der Lage sind, wie zum Beispiel, aber nicht begrenzt auf, Fluorescin und Derivat davon und N-(3-Fluoranthyl)-maleimid, Radionuklide, wie zum Beispiel Kohlenstoff 14, Tritium und Phosphor 32 und dergleichen. Eingeschlossen sind Substanzen, die adäquate spektrale Absorption haben, wie zum Beispiel, aber nicht begrenzt auf, Azo-oxo-, Azo-tetrazo-, Azin-, Oxazin-, Thiazin-, Chinolin-, Indamin-, Pyron- und Pyrazolonfarbstoffe.

[0028] Ein Marker, der zu einer indirekten Erkennung in der Lage ist, erfordert die Anwesenheit von einer oder mehreren zusätzlichen Substanzen zur Produktion eines erkennbaren Signals. Solche Marker schließen typischerweise Enzyme ein, sind aber nicht darauf begrenzt, die die Anwesenheit von Substraten, Co-Faktoren, Metallen und ähnlichem erfordern. Peroxidasen, im besonderen Meerrettichperoxidase, ein gebräuchlicher Marker, bedarf eines Elektronendonors und eines oxidierenden Mittels, wie zum Beispiel Luminol, di- oder tri-Arylimidazole Leukodyes und Wasserstoffperoxid, um jeweils ein chemilumineszentes Produkt oder Färbung herzustellen. Andere Enzyme, wie zum Beispiel β-Galactosidase, Glucoseoxidase oder alkalische Phosphatase und dergleichen, sind ebenfalls vorgesehen.

[0029] Im allgemeinen schließen Marker radioaktive Markierungen, Enzyme, Chromophore, Fluorophore, stabile freie Radikale und enzymatische Co-Faktoren, Inhibitoren und allosterische Effektoren ein.

[0030] Ein "reduzierendes Mittel" für den Gebrauch der vorliegenden Erfindung ist jede Verbindung oder Reagenzbeimischung, die befähigt ist, eine Doppelbindung zu hydrieren, wie z.B. Kohlenstoff-Kohlenstoff, Kohlenstoff-Stickstoff, Kohlenstoff-Sauerstoff und Kohlenstoff-Schwefel-Doppelbindungen.

[0031] Nützliche reduzierende Mittel schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf: Aluminiumhydrid, Lithium-aluminiumhydrid, Borhydrid und Salze davon. Katalytische Hydrierung über Palladium, Platin oder Nickel oder andere hydrierende Methoden können auch verwendet werden. Natriumborhydrid ist ein bevorzugtes reduzierendes Mittel.

[0032] Eine "Kopplungsgruppe" ist hier definiert als eine chemische Gruppe, die eines oder mehrere Atome umfaßt. Eine Kopplungsgruppe verbindet ein Molekül mit einem anderen, wie z.B. ein natürliches Polymer mit einem natürlichen Polymer, ein synthetisches Polymer mit einem synthetischen Polymer, ein natürliches Polymer mit einem synthetischen Polymer, einen Marker an ein natürliches oder synthetisches Polymer, einen Marker an ein reduziertes Cortisol, einen Marker an ein Cortisol usw. durch Bildung einer kovalenten Bindung mit jedem der Moleküle.

[0033] Die Kopplungsgruppe kann eine substituierte oder nicht-substituierte gerade Kette beinhalten oder verzweigtes Alkyl oder Heteroalkyl, wie z.B. Oxyalkyl, Thialkyl, Aminoalkyl, substituierte oder nicht-substituierte Alkenyle, eine oder mehrere substituierte oder nicht-substituierte Kohlenwasserstoff-Heterocyclische Ringe, einen oder mehrere substituierte oder nichtsubstituierte Aryl- oder Heteroarylringe, wie z.B., aber nicht begrenzt auf, Imidazoyl, Isoxazoyl, Pyridyl, Piperidyl, Piperazinyl, Pyrazoyl, Triazoyl, Oxadiazoyl, Pyridazinyl, Pyrimidyl, Pyrazinyl, Chinolinyl und Chinazolinyl.

[0034] Verbinden oder Koppeln von Makromolekülen, wie z.B. natürliche oder synthetische Polymere an andere Makromoleküle oder Verbinden von kleinen Molekülen, wie Cortisol oder Analoga von Cortisol an Makromoleküle ist im Stand der Technik gut bekannt. Spezifisch im Hinblick auf Cortisol, ist Kohlenstoff 3 (C3) mit Nucleophilen reaktiv, die einschließen Amine, Oxime und Thio-Oxime und andere bekannte Verbindungen im

Stand der Technik. Die nucleophile Spezies kann ein koppelndes (verbindendes) Mittel, ein Marker, ein natürliches oder synthetisches Polymer sein. Wenn sie ein Kopplungsmittel ist oder andere Spezies, hat sie eine reaktive funktionale Gruppe (ein Marker, etc.), nach einer kovalente Bindung an das C3 des Cortisol kann es mit einem anderen Kopplungsmittel oder anderen Spezies, die eine dementsprechende reaktive funktionale Gruppe haben, reagiert werden. So derivatisiertes Cortisol haben, kann als Startpunkt verwendet werden, um die reduzierten Cortisolverbindungen der vorliegenden Erfindung herzustellen. Details der Kopplungsschemie und Verbindungsgruppen können in zahlreichen Publikationen gefunden werden, die einschließen: US Patente 3,654,090; 3,791,932; 3,875,011; 4,016,043; 4,040, 907; 4,092,479; 4,213,894; 4,243,749; 4,376,165; 4,410,643; 4,752,658; 4,828,978; 4,879,249; 4,997,772; 5,053,497; 5,106,732; 5,147,777; 5,155,166; 5,162,219; 5,177,023; 5,284,948; 5,298,403; 5,308,749; 5,374,516; 5,391,483; 5,397,695; 5,401,633; 5,527,709; 5,543,311; 5,578,457; 5,652,346; 5,763,588; 5,770,390 und Referenzen in denselben; Yoshitake et al., Eur. J. Biochem., 101, 395, (1979) und Tjssen, in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology S. 221–278 (1985) und Referenzen darin.

[0035] Kurz gesagt, kann eine Verbindungsgruppe und Molekül, an das es kovalent gebunden ist, verbunden werden durch Amide, Ester, Ether, Thioester und Disulfidverbindungen. Zum Beispiel ist die Kopplungsschemie, die einschließt, daß die Moleküle, die verbunden werden sollen, mit kondensierenden Mitteln, wie Carbodiimiden, Maleimiden, Ethylchloroformat und Glutaraldehyd reagieren, in diesem Gebiet gut bekannt.

[0036] Der Begriff "Probe" betrifft jede Substanz, die den Analyt von Interesse enthält. Eine Probe kann eine biologische Flüssigkeit sein, so wie z.B. cerebrale Spinalflüssigkeit, Samen, vaginale Sekretionen, Gesamtblut oder die gesamten Blutkomponenten, eingeschlossen rote und weiße Blutkörperchen, Plättchen und andere Flüssigkeiten oder Gewebe des Körpers, die den Analyt von Interesse enthalten können. Gegebenenfalls können Proben erhalten werden aus Wasser, Erde und Pflanzen.

[0037] Immuntests, die die natürlichen immunologischen Reaktionen ausnützen, haben weit verbreitet Gebrauch gefunden als analytische Technik in der klinischen Chemie. Wegen der Spezifität der Reaktionen sind sie im Speziellen von Vorteil im Quantifizieren der biologischen Analyte, die in sehr geringer Konzentration in biologischen Flüssigkeiten vorhanden sind. Solche Analyte schließen zum Beispiel Antikörper, therapeutische Wirkstoffe, Narkotika, Enzyme, Hormone, Proteine etc. ein.

[0038] In kompetitiven Bindungstests wird ein markierter Analyt (der Begriff schließt immunkompetente Analoga des Analyten ein) mit einem unmarkierten Analyt in Konkurrenz gesetzt zur Reaktion mit einer bestimmten Menge eines geeigneten Rezeptors, der oft an einem festen Substrat immobilisiert ist oder dafür zur Immobilisation befähigt ist. Der markierte Analyt, der am Rezeptor gebunden ist, wird vom freien markierten Analyt getrennt. Unbekannte Konzentrationen des Analyten können bestimmt werden durch das gemessene Signal entweder des gebundenen oder des freien markierten Analyten. Die Reaktion findet wie folgend statt:



[0039] Immuntests können in Lösung ausgeführt werden, in Testvorrichtungen, wo lösliche und unlösliche Komponenten getrennt werden können oder in trockenen analytischen Elementen. Immuntests können heterogen oder homogen sein, so wie diese Begriffe in der Technik bekannt sind. In heterogenen Tests werden gebundene und freie markierte Immunoreaktanten (markierter Analyt oder markierter Rezeptor eines Analyten) nach vorheriger Signalmessung getrennt; wo hingegen in homogenen Tests die Trennung von freien und gebundenen markierten Immunoreaktanten nicht erforderlich ist. Die reduzierten Cortisolkonjugate der vorliegenden Erfindung können in beiden sowohl homogenen als auch heterogenen Tests verwendet werden.

[0040] Zahlreiche Publikationen, die sich auf Immuntests und Immuntestverfahren beziehen, die viele der oben genannten Publikationen enthalten, die sich auf Verbindungsgruppen und Kopplungsschemie beziehen, sind dem Fachmann zugänglich. Zusätzliche Publikationen schließen ein: US Patente 4,372,745; 4,670,381; 4,483,921; 4,517,288; 4,822,747; 4,824,778; 4,829,012; 4,839,299; 4,847,194; 4,847,195; 4,853,335; 4,855,226; 4,857,453; 4,857,454; 4,859,610; 4,863,876; 4,868,106; 4,868,130; 4,879,219; 5,663,054; 5,776,933 und alle darin genannten Referenzen; und Immunoassays in the Clinical Laboratory, Nakamura et al., eds., Alan R. Liss, Inc., (1979); Quantitative Enzyme Immunoassay, Engvall et al., eds., Blackwell Scientific Publications, (1978); Clinical Chemistry, Sommer et al., v. 32, S. 1770–1774, (1986); Clinical Chemistry, Sommer et al., S. 201–206 (1990); A Primer for Multilayer Immunoassay, Berke, American Chemical Society Conference Proceeding, S. 303–312, Plenum Press, (1988); und alle darin genannten Referenzen.

[0041] In kompetitiven Immuntests können markierte Analyte und Proben, die freie Analyte enthalten, gleich-

zeitig oder getrennt zu einem Vermisch gegeben werden, das immobilisierte oder immobilisierbare Rezeptor enthält, der den Analyten bindet.

[0042] Im Fall der trockenen analytischen Elemente sind markierte Analyte und immobilisierte Rezeptoren, wenn sie vor dem Kontakt mit der Probe zusammen in dem Element anwesend sind, bevorzugt in getrennten Zonen anwesend.

[0043] Konventionelle Materialien und Mittel zum Zusammensetzen der trockenfilmanalytischen Elemente sind zum Beispiel in US Patenten 3,867,258; 3,992,158; 4,042,435; 4,050,898; 4,066,403; 4,153,668; 4,258,001; 4,292,272 und 4,430,436 beschrieben.

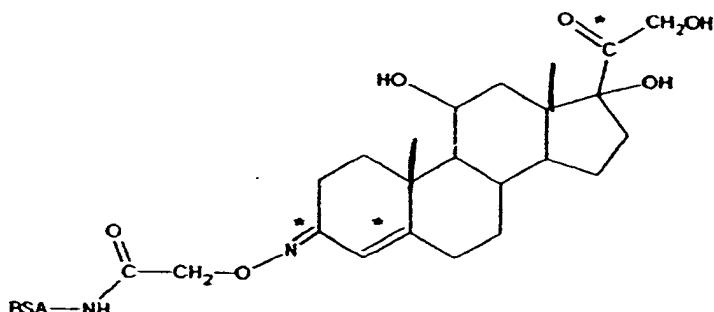
[0044] Verfahren, um Antikörper zu gewinnen, die spezifische Moleküle binden, durch Immunisierung passender Wirtstiere, sind gut bekannt. Diese Verfahren sind gut dokumentiert und beschrieben, zum Beispiel in folgenden Publikationen: Methods in Immunology, Garvey, J. S., Cremer, N. E. und Sussdorf, D. H., W. A. Benjamin, Inc., Third Ed. (1977) und Handbook of Experimental Immunology herausgegeben von Weir, D. M., Blackwell Scientific Publications, Third Ed., (1978).

[0045] Verfahren zur Herstellung von Hybridomazelllinien zur Sekretion von Antikörpern sind ebenso gut bekannt und werden zum Beispiel in US Patenten 4,950,592; 5,338,671 und 5,650,324 zur Verfügung gestellt.

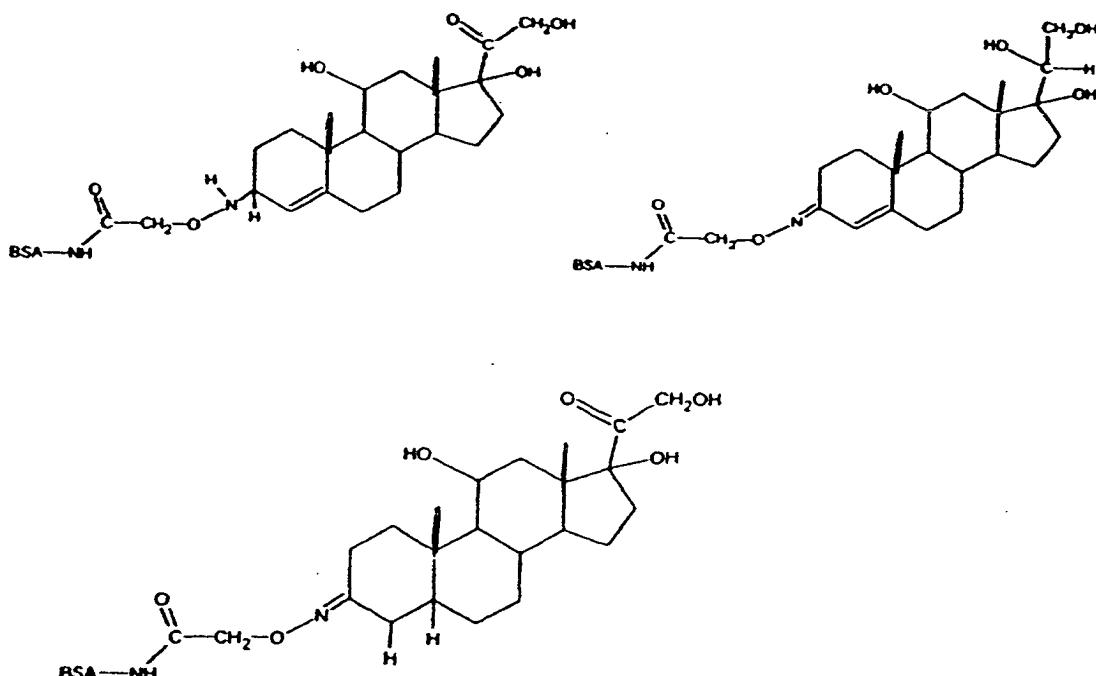
Herstellung von HRP-markiertem reduziertem Cortisol-3-CMO-BSA

[0046] Ein Verfahren wird unten zur Verfügung gestellt, das die Herstellung des Meerrettichperoxidase (HRP) markierten reduzierten Cortisolkonjugats verdeutlicht. In diesem Verfahren wurde die Reduktion des Rinderserumalbumin-Cortisoloximkonjugats (Cortisol-3-CMO-BSA) mit Natriumborhydrid vor der Konjugation mit HRP ausgeführt; nichtsdestotrotz kann die Reduktion von Cortisol im Anschluß an die Kopplung mit HRP ausgeführt werden.

[0047] Es gibt drei Stellen zur Reduktion des Cortisol-3-CMO-BSA, die in der unten gezeigten Struktur durch einen Stern gekennzeichnet sind.



[0048] Jede einzelne oder alle von diesen Stellen können durch eine Behandlung mit einem reduzierenden Mittel oder einem reduzierenden Gemisch, das zu einer Hydrierung einer Doppelbindung in der Lage ist. Reduziert werden, was Produkte ergibt, die eine einzelne Stelle reduziert, aufweisen, wie in den unten gezeigten Strukturen.



[0049] Ebenso wie Verbindungen, die jeweils zwei Stellen reduziert haben, woraus sich drei verschiedene reduzierte Spezies ergeben, und alle drei Stellen reduziert haben, wie es dem fachkundigen Techniker leicht ersichtlich ist. Andere Konjugate, die Cortisol einschließen, die nach Reduktion die Verbindungen wie generell definiert in Struktur IA, IB, IC und ID ergeben, werden analog verschieden reduzierte Cortisol-Spezies, wie oben am Beispiel mit Cortisol-3-CMO-BSA dargestellt, bilden. Verbindungen, die eine kovalente Bindung zum C3 des Cortisols haben, das nicht in der Lage ist, hydriert zu werden, werden nur an der Ring-Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung und/oder der Kohlenstoff-Sauerstoff-Doppelbindung (Carbonylgruppe) des Cortisols reduziert. Alle reduzierten Formen im Einzelnen oder in jeder Kombination werden von der vorliegenden Erfindung vorgesehen.

BEISPIEL 1:

Herstellung von 3-Cortisolcarboxymethyloxim, konjugiert an Rinderserumalbumin (3-CMO-BSA)

Hydrocortison-3-(O-Carboxymethyl)oxim:

[0050] Rinderserumalbumin (Cortisol-3-CMO-BSA) wurde wie oben beschrieben hergestellt. Alternativ kann es von Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, gekauft werden. Eine Vorratslösung von N-Hydroxysuccimid (NHS) wurde durch Auflösung von 20 mg von NHS in 3,0 ml Dioxan hergestellt. Eine Stocklösung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wurde auch hergestellt durch Auflösung von 30 mg von DCC in 2,5 ml von Dioxan. Zu einem Glasfläschchen, das 40 mg Cortisol-3-carboxymethyloxim (Cortisol-3-CMO) enthielt, wurden 1,744 ml der NHS-Vorratslösung und 1,744 ml der DCC-Vorratslösung gegeben. Die Mischung wurde gerührt und für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zu 1,0 g Rinderserumalbumin (BSA) wurden 12 ml 0,1 M Natriumhydrogencarbonat gegeben. Die Lösung wurde gemischt, bis sie klar war und am Ende der Dreistunden-Inkubation wurden 3,0 ml des aktivierten Cortisol-3-CMO zu der BSA-Lösung gegeben. Die Mischung wurde gerührt und bei Umgebungstemperatur für zwei Stunden inkubiert. Nach der Zweistunden-Inkubation wurden 15 ml 0,1 M Natriumphosphat, 0,3 M Natriumchlorid (pH 6,0)-Puffer dazugegeben. Das Vermisch wurde durch 5,0 µm und 0,45 µm Sartorius Minisarts filtriert und dann auf einer 5 × 70 cm Superdex 200 PG Säule bei einer Flußrate von 8,0 ml/min chromatographiert. Das erste Gefäß, das dem Hauptpeak entsprach und die folgenden zehn (eine Minute) Fraktionen wurden gesammelt und zusammengefaßt. Fasse die Fraktionen zusammen. Die zusammengefaßten Fraktionen wurden für ungefähr 15 Stunden gegen Wasser dialysiert. Die Dialyse wurde wiederholt. Das Dialysat wurde durch eine 0,2 µm Sartorius Minsart gefiltert und in kleinen Aliquots gefriergetrocknet und bis zum Gebrauch gefroren gehalten.

BEISPIEL 2:

Reduktion und Aktivierung von Cortisol-3-CMO-BSA

[0051] Cortisol-3-CMO-BSA (24 mg) wurde in 4 ml einer Lösung von 50 mM Natriumcarbonat und 100 mM Natriumchlorid bei einem pH von 9,5 gelöst. Ein Aliquot, 0,6 ml, einer wäßrigen Lösung von Natriumborhydrid (4 mg pro ml) wurde zu der Cortisol-3-CMO-BSA-Lösung hinzugegeben, die daraufhin kontinuierlich für 30 Minuten bei 20°C gemischt wurde. Der pH wurde dann durch Verwendung von 200 µl einer 0,5 M Natriumphosphatlösung auf eine Größe im Bereich zwischen pH 7,2 bis 7,5 eingestellt, um überschüssiges Borhydrid zu zersetzen. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt, bis das Sprudeln ausblieb, und wurde für ungefähr 15 Minuten stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde dann durch einen 0,45 µ-Filter gefiltert und auf einen Sephadex G25 1,6 × 14,5 cm Säule, vor-äquilibriert mit 0,02 M Phosphat, pH 7,0, bei einer Flußrate von ungefähr 40 ml/Stunde chromatographiert. Die Fraktionsgröße, die gesammelt wurde, lag bei ungefähr 0,67 ml (1 Minute). Fünfzehn der konzentriertesten Fraktionen, d.h., daß diese Fraktionen eine große Absorption bei 280 nm haben, wurden zusammengefaßt.

[0052] Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cylohexan-1-carboxylat (SMCC) wurde in N,N-Dimethylformamid (DMF) auf eine Endkonzentration von 9,6 mg/ml gelöst. Zu 10 ml des reduzierten Cortisol-3-CMO-BSA, das in dem oben angeführten chromatographischen Schritt gesammelt wurde, wurden 186 µl der SMCC-Lösung gegeben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und dann für eine Stunde bei 20°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 800 µl einer wasserhaltigen Lösung von Glycin (10%, Gewicht/Volumen) gelöscht. Das gelöschte Reaktionsgemisch wurde dann chromatographisch auf einer 3,2 × 10 cm Säule, die mit Sephadex G25 gefüllt und mit einer Lösung von 0,1 M Phosphat und 5 mM Ethylenediamintetraaceticacid (EDTA), pH 6,0 vor-äquilibriert, bei einer Fließrate von ungefähr 161 ml/Stunde analysiert. Ein Milliliter-Fraktionen wurden gesammelt. Acht der konzentriertesten Fraktionen (die eine hohe Absorption bei 280 nm haben) wurden zusammengefaßt und zur Konjugation an aktivierte HRP verwendet.

BEISPIEL 3:

Aktivierung von HRP

[0053] Meerrettichperoxidase wurde in 0,1 M Phosphat, pH 7,5, bei einer End-HRP-Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Fünf Milliliter der HRP-Lösung wurden in ein 20 ml Reaktionsgefäß transferiert. Ein 0,5 ml Aliquot von S-Acetylthioessigsäure, N-Hydroxysuccinimidylester (SATA) in DMF (25 mg/ml) wurde zum Reaktionsgefäß dazugegeben, welches die HRP-Lösung enthält. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und dann bei 20°C für sechzig Minuten inkubiert. Ein Aliquot (500 µl) der Lösung, das 0,05 M EDTA und 2,5 M Hydroxylamin bei pH 7,0 enthielt, wurde zu der Reaktionsmischung dazugegeben, vorsichtig gemischt und dann bei 20°C für 15 Minuten inkubiert. Die Mischung wurde dann chromatographisch auf einer 2,0 × 10 cm Säule und auf Sephadex G25 mit einer Lösung von 0,1 M Phosphat und 5 mM EDTA bei einem pH von 6,0 vor-äquilibriert, bei einer Flußrate von ungefähr 63 ml/Stunde analysiert. Ein-Minuten-Fraktionen wurden gesammelt. Elf der konzentriertesten Fraktionen (sie haben eine große Absorption bei 403 nm) wurden zusammengefaßt.

BEISPIEL 4:

Kopplung von aktiverter HRP und reduziertem aktiviertem Cortisol-3-CMO-BSA

[0054] Das aktivierte reduzierte Cortisol-3-CMO-BSA, 21,47 ml, wurde mit 11,55 ml der aktivierte HRP kombiniert. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und bei 20°C für zwanzig Stunden inkubiert. Ein Aliquot (224 µl) einer Lösung, die Merkaptoethanol in Wasser enthielt (1% des Thiol pro Volumen) wurde zu der Reaktionsmischung gegeben und die Lösung wurde vorsichtig gemischt und für ungefähr 15 Minuten stehengelassen. Ein 476 µl Aliquot einer Lösung, die 10 mg/ml N-Ethylmaleimid in DMF enthielt, wurden dann zu dem Reaktionsgemisch gegeben und für zusätzliche zwanzig Minuten nach dem Mischen inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde dann chromatographisch auf einer 4,4 × 50 cm Säule, die Superdex 200 enthält, mit einer Lösung von 0,1 M Phosphat und 0,3 M Natriumchlorid bei einem pH von 6,0 vor-äquilibriert bei einer Flußrate von ungefähr 344 ml pro Stunde analysiert. Ein-Minute-Fraktionen wurden gesammelt. Sechsundzwanzig der konzentriertesten Fraktionen, die um das erste Eluat zentriert sind, die eine maximale Absorption bei 280 nm hatten, wurden zusammengefaßt.

[0055] Die Absorption der Konjugatesammlung und der HRP-Lösung (in Beispiel 2 oben, vor der Aktivierung und ausreichend gelöst in Phosphatpuffer, um eine akkurate Absorptionsmessung zu erhalten) wurden jeweils

bei 280 nm und 403 nm, A_{403} cj, A_{280} cj und A_{403} HRP, A_{280} HRP bestimmt. Die Konzentration des reduzierten Cortisol-3-CMO-BSA-Konjugats, basierend auf der BSA-Konzentration, wurde aus diesen Messungen durch Gebrauch der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{BSA}(\text{mg/ml}) = A_{280}\text{cj} - (A_{403}\text{cj}/[A_{403}\text{HRP}/A_{280}\text{HRP}])/0,76$$

BEISPIEL 4:

Evaluierung des Konjugats

[0056] Die Evaluierung des HRP markierten reduzierten Cortisol-3-CMO-BSA (hier als HRP-RC-Konjugat bezeichnet) wurde durch Gebrauch der Ortho-Clinical Diagnostic VITROS ECi chemilumineszenz-basierten Testmethodik evakuiert.

[0057] Die folgenden Reagenzien wurden zum Gebrauch mit dem VITROS ECi-System hergestellt.

Markerlösung:

- 100 ng/ml reduziertes Cortisol-3-CMO-BSA-HRP (oder 20 ng/ml von einem vergleichbaren HRP-Cortisol-konjugatmarker, der nicht Konjugatmarker der vorliegenden Erfindung ist, aber der durch dieselben Verfahren wie der Marker der Erfindung außer dem Reduktionsschritt gegangen ist)
- 2,86 g/l Natriumphosphat, dibasisch, wasserfrei
- 7,3 g/l Natriumphosphat, homobasisch, Monohydrat
- 0,01 g/l Ferricyankalium
- 2,5 g/l 8-Anilino-1-naphthalinschwefelsäure
- 20 g/l Rinderserumalbumin
- 0,03 g/l Apo-Meerrettichperoxidase
- 0,2% Rinderalphaglobulin (Cohn-Faktion IV-I)
- 1 g/l Rindergammaglobulin
- 5 g/l normales Schafserum
- 100 g/l durch Aktivkohle gefiltertes menschliches Plasma
- 20 g/l Kathon (ein Konservierungsmittel-enthaltendes 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3 und 2-Methyl-4-isothiazolin-3)
- pH 6,4

Biotinylierte Schaf-polyklonale Anti-Cortisollösung:

- 1,5 µg/ml biotinyliertes Schafanticortisolgammaglobulin
- 21 g/l Natriumphosphat, dibasisch, wasserfrei
- 1,8 g/l Natriumchlorid
- 1,1 g/l Zitronensäure
- 20 g/l Rinderserumalbumin
- 20 g/l Kathon
- pH 5,4

Waschreagenz:

- 0,39 g/l Borsäure
- 0,35 g/l Dinatriumtetraborat
- 0,58 g/l Natriumchlorid
- 0,5 g/l TRITON X-100 (Octylphenoxypolyethoxyethanol)
- 0,5% w/w BRONIDOX (ein Konservierungsmittel-enthaltendes 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan)
- pH 8,4

Signalreagenz:

Teil A

- 3,88 g/l Borsäure
- 14,2 g/l Natriumtetraborat

- 1,06 g/l Natriumcitrat
- 0,08 g/l Natriumbenzoat
- 0,1 g/l Natriumazid
- 0,008 g/l Diethylentriaminpentaessigsäure
- 0,58 g/l Glycin
- 0,4 g/l Luminol

Teil B

- 0,9 g/l Zitronensäure
- 1,68 g/l Natriumcitrat
- 0,08 g/l Natriumbenzoat
- 0,62 g/l Natriumperborat
- 0,06 g/l 3-Chlor-4-hydroxyacetanilid
- 5,84 g/l Natriumchlorid

[0058] Ein Aliquot (75 µl) von anti-cortisolbiotinyliertem Schafantikörper, 30 µl Probe, Serum-enthaltendes Cortisol oder ein Steroid, das strukturell ähnlich dem Cortisol ist (unten), und 75 µl von HRP-RC-Konjugat wurden zu der VITROS ECi-Probe hinzugegeben, an das Streptavidin vorher gebunden war. Die Lösung wird bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, dann durch den Gebrauch der oben angegebenen Waschreagenzien gewaschen.

[0059] Ein 200 µl Aliquot der oben angegebenen Signalreagenzlösung (100 µl von Teil A und 100 µl von Teil B werden kurz vor Gebrauch kombiniert) wurde dann zu dem Probenbehälter hinzugegeben. Die Lösung wurde für 5 Minuten bei 37°C inkubiert, und dann wurde die chemilumineszente Intensität gemessen.

BEISPIEL 5:

Kreuzreaktivität

[0060] Das oben angegebene Verfahren wurde verwendet, um die Konzentration von potentiellen Kreuzreaktanten zu bestimmen (Steroid, das strukturell ähnlich zu Cortisol ist: 11-Desoxycortisol, Prednison, Corticoseron und Cortison), die 50% einer festen Menge eines komparativen HRP-markierten Cortisolkonjugats (nicht-reduziertes Cortisol, HRP-NRC) oder HRP-RC-Konjugat, gebunden an eine feste Menge von Anti-Cortisolantikörper verdrängt haben.

[0061] Verschiedene Spiegel der potentiellen Kreuzreaktanten wurden zu dem Probengefäß hinzugegeben, welches entweder das Vergleichs-markierte Cortisolkonjugat enthielt (nicht-reduziertes Cortisol, HRP-NRC) oder HRP-RC-Konjugat der vorliegenden Erfindung, wie oben beschrieben.

[0062] Die Konzentration von Kreuzreaktanten, die sich in einer Lichtsignalmessung widerspiegelt, die 50% des maximal Erreichbaren (alle Konjugate verdrängt) entspricht, wurde bestimmt und verwendet, um die Prozent der Kreuzreaktivität, wie unten beschrieben, zu berechnen und deren Ergebnisse in Tabelle 1 aufgelistet sind.

[0063] Die Prozent Kreuzreaktivität sind definiert als die Konzentration des Cortisols, das 50% von dem HRP-NRC-Vergleichs-Konjugat verdrängt (oder des HRP-RC-Konjugats), geteilt durch die Konzentration des Kreuzreaktanten, der 50% von dem HRP-NRC-Vergleichs-Konjugat verdrängt (oder des HRP-RC-Konjugats) multipliziert mal 100, wie durch das weiter oben beschriebene Testverfahren, erhalten.

TABELLE 1

Prozent Kreuzreakтивität

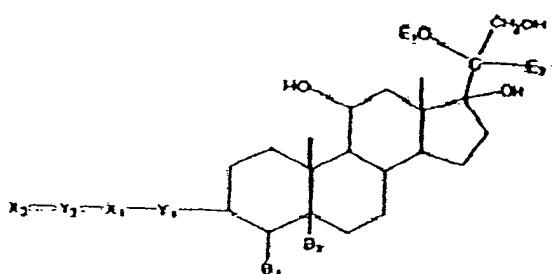
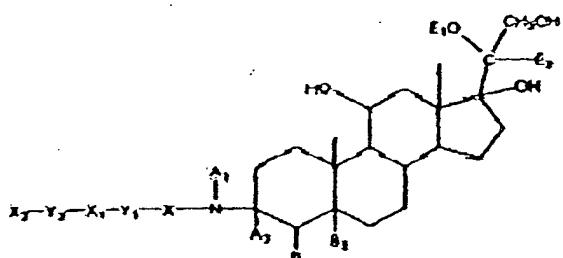
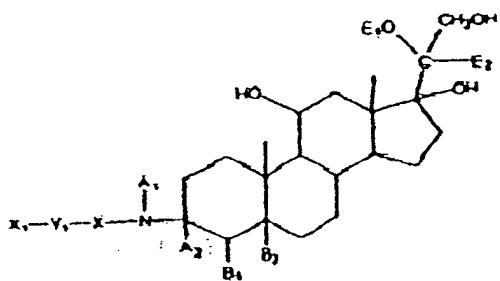
Verbindung	HRP-NRC Vergleichs-Marker	HRP-RC Erfindungsmarker
Cortisol	100	100
Prednisolon	34,8	24,6
11- Desoxycortisol	28,5	2,2
Cortison	5,5	1,8
Corticosteron	4,4	3,3

[0064] Diese Daten zeigen deutlich, daß das repräsentative HRP-RC-Konjugat der vorliegenden Erfindung signifikant weniger Kreuzreaktivität in einem Immuntest für Cortisol zur Verfügung stellt. Dementsprechend werden Cortisoltests, die markiertes reduziertes Cortisol, wie beschrieben in der vorliegenden Erfindung verwenden, eine verbesserte Genauigkeit ergeben; dies resultiert in einer verbesserten Diagnose, Behandlung und Nachverfolgung.

[0065] Die vorliegende Erfindung wurde im Detail unter speziellen Bezug auf bestimmte bevorzugte Ausführungsformen davon beschrieben.

Patentansprüche

1. Reduziertes Cortisolkonjugat der Formel:



worin X O, S, Sulphonyl oder Phosphono ist;

X₁ ist ein markiertes oder nicht-markiertes natürliches oder synthetisches Polymer oder ein Marker;

Y₁ ist eine Verbindungsgruppe oder eine Bindung;

X₂ ist ein markiertes oder nicht-markiertes natürliches oder synthetisches Polymer oder ein Marker;

Y₂ ist eine Verbindungsgruppe oder eine Bindung;

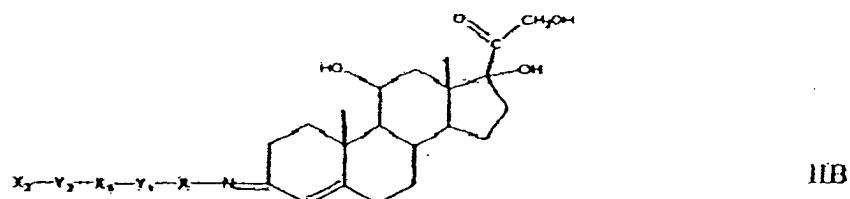
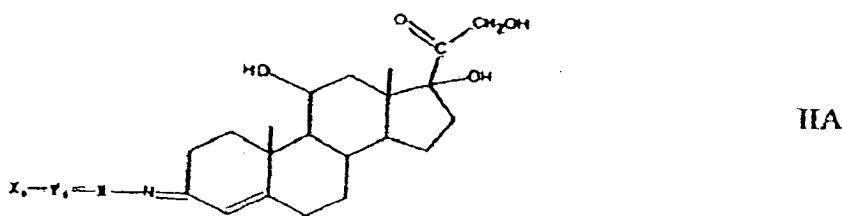
A₁ und A₂ sind jeweils Wasserstoff oder A₁ und A₂ bilden gemeinsam eine Einzelbindung;

B₁ und B₂ sind jeweils Wasserstoff oder B₁ und B₂ bilden zusammen eine Einzelbindung; und

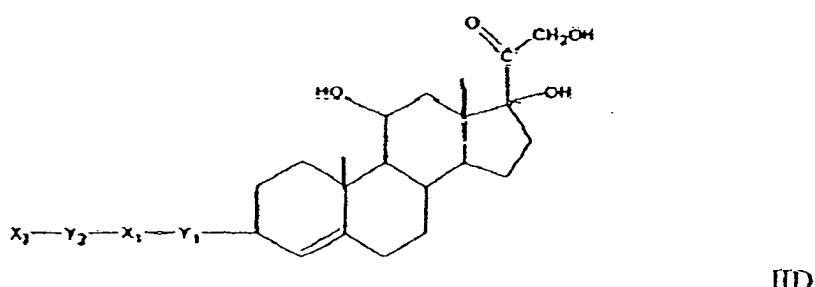
E₁ und E₂ sind jeweils Wasserstoff oder E₁ und E₂ bilden zusammen eine Einzelbindung;

unter der Voraussetzung, daß mindestens eines von A₁ und A₂ oder B₁ und B₂ oder E₁ und E₂ jeweils Wasserstoff sind.

2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei X O ist und X₁ Rinderserumalbumin ist.
3. Konjugat nach Anspruch 2, worin Y₁ Methylencarbonyloxy ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, worin X₂ eine Peroxidase, wie zum Beispiel Meerrettichperoxidase, ist.
5. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in einer wäßrigen Zusammensetzung.
6. Verfahren zur Herstellung eines reduzierten Cortisolkonjugats wie in einem der Ansprüche 1 bis 4 definiert, umfassend:
Reagieren einer Verbindung der Formel



oder

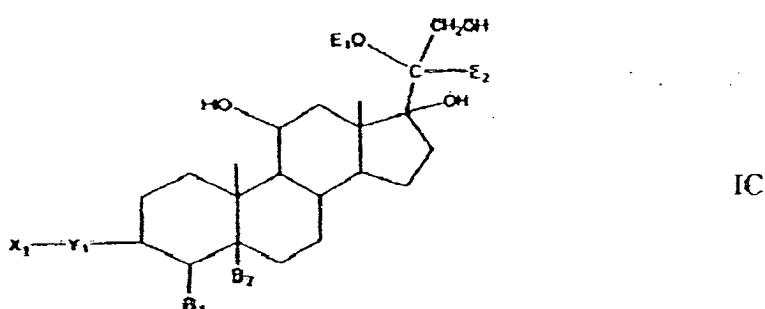


mit einem reduzierenden Mittel.

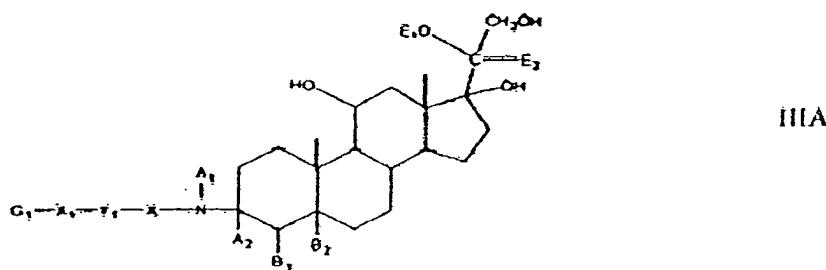
7. Verfahren nach Anspruch 6, worin das reduzierende Mittel ein Borhydrid ist.

8. Verfahren zur Herstellung eines reduzierten Cortisolkonjugats wie in einem der Ansprüche 1 bis 4 definiert, umfassend:

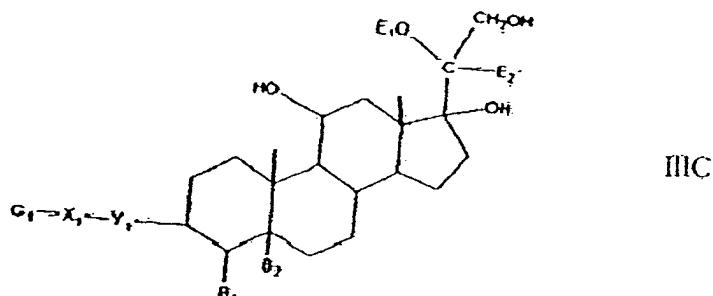
- (i) Reagieren einer Verbindung der Formel IIA wie in Anspruch 6 definiert mit einem reduzierenden Mittel, wodurch eine Verbindung der Formel IA gebildet wird; und
- (ii) gegebenenfalls, Reagieren einer Verbindung der Formel IA oder IC, wobei IC eine Verbindung ist, die die Formel



aufweist, worin X₁, Y₁, B₁, B₂, E₁ und E₂ wie in Anspruch 1 definiert sind; mit einem ersten Kopplungsmittel, wodurch eine Verbindung der Formel



oder



gebildet wird, worin G_1 eine Kopplungsgruppe ist;

- (iii) gegebenenfalls, Reagieren von X_2 mit einem zweiten Kopplungsmittel, wodurch X_2-G_2 gebildet wird, worin G_2 eine Kopplungsgruppe ist, die in der Lage ist eine kovalente Bindung mit der Kopplungsgruppe G_1 zu bilden und worin G_1 und G_2 dieselben sein können;
- (iv) gegebenenfalls, Reagieren einer Verbindung der Formel IA oder IC mit X_2-G_2 , worin G_2 in der Lage ist eine kovalente Bindung mit einer funktionellen Gruppe X_1 zu bilden, wodurch reduziertes Cortisolkonjugat IB oder ID gebildet wird;
- (v) gegebenenfalls, Reagieren von Verbindung IIIA oder IIIC mit X_2 , worin G_1 in der Lage ist eine kovalente Bindung mit einer funktionellen Gruppe von X_2 zu bilden, wodurch reduziertes Cortisolkonjugat IB oder ID gebildet wird;
- (vi) gegebenenfalls, Reagieren von Verbindung IIIA oder IIIC mit X_2-G_2 , wodurch reduziertes Cortisolkonjugat IB oder ID gebildet wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das erste Kopplungsmittel 4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester ist und das zweite Kopplungsmittel S-Acetylthioessigsäure-N-hydroxysuccinimidylester ist.

10. Verfahren zur Durchführung eines kompetitiven Tests auf Cortisol, umfassend die Schritte von:
- A) in Kontakt bringen einer Probe, von der vermutet wird, daß sie Cortisol enthält mit i) einem immobilisierten oder immobilisierbaren Rezeptor, der Cortisol bindet, wodurch Cortisol gebildet wird, das gebunden ist und Cortisol das nicht an den immobilisierten oder immobilisierbaren Rezeptor gebunden ist, ii) einem markierten reduzierten Cortisolkonjugat wie in einem der Ansprüche 1 bis 4 definiert, wobei mindestens eines von X_1 und X_2 ein markiertes natürliches oder synthetisches Polymer oder ein Marker ist, wodurch markiertes reduziertes Cortisolkonjugat gebildet wird, das gebunden ist und markiertes reduziertes Cortisolkonjugat, das nicht an den immobilisierten oder immobilisierbaren Rezeptor gebunden ist;
 - B) Nachweisen von entweder dem markierten reduzierten Cortisolkonjugat, das gebunden ist, oder dem markierten reduzierten Cortisolkonjugat, das nicht an den immobilisierten oder immobilisierbaren Rezeptor gebunden ist, als ein Maß der Menge von Cortisol in der Probe.

11. Verfahren zur Durchführung eines kompetitiven Bindungstests auf Cortisol unter der Verwendung eines trockenen analytischen Elements, umfassend: a) eine Verteilungszone; b) eine oder mehrere Reagenzzen; c) einen Träger und d) gemeinsam oder getrennt in einer oder mehrerer der Zonen einen immobilisierten Rezeptor, der Cortisol bindet und gegebenenfalls ein markiertes reduziertes Cortisolkonjugat wie in einem der Ansprüche 1 bis 4 definiert, wobei mindestens einer von X_1 und X_2 ein markiertes natürliches oder synthetisches Polymer oder ein Marker ist, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt von:

- A) in Kontakt bringen der Verteilungszone des trockenen analytischen Elements mit
- i) einer Probe, von der vermutet wird, daß sie Cortisol enthält, wodurch Cortisol gebildet wird, das gebunden

ist und Cortisol, das nicht an den immobilisierten Rezeptor gebunden ist,
ii) dem markierten reduzierten Cortisolkonjugat, wenn es nicht in dem trockenen analytischen Element vorhanden ist, wodurch markiertes reduziertes Cortisolkonjugat gebildet wird, das gebunden ist und markiertes reduziertes Cortisolkonjugat, das nicht an dem immobilisierten Rezeptor gebunden ist; und
B) Nachweisen von entweder dem markierten reduzierten Cortisolkonjugat, das gebunden ist oder dem markierten reduzierten Cortisolkonjugat, das nicht an den immobilisierten Rezeptor gebunden ist, als ein Maß der Menge von Cortisol in der Probe.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder Anspruch 11, weiterhin umfassend Abtrennen des markierten reduzierten Cortisolkonjugats, das gebunden ist, von dem markierten reduzierten Cortisolkonjugat, das nicht an den immobilisierten oder immobilisierbaren Rezeptor gebunden ist.

13. Verfahren zur Herstellung von anti-Cortisolantikörpern, umfassend die Schritte von:
A) Immunisieren eines Wirtstieres mit einem reduzierten Cortisolkonjugat wie in einem der Ansprüche 1 bis 4 definiert, wodurch Antikörper hergestellt werden, die Cortisol binden;
B) Isolieren der Antikörper, die Cortisol binden, aus dem Blutserum oder Plasma des Wirtstiers; oder
C) Entfernen der Milz, lymphatischer Gewebe oder anderer Gewebe oder Organe die mit Antikörper-produzierenden Zellen besiedelt sind;
D) Entfernen der Antikörper-produzierenden Zellen;
E) Herstellen von Hybridomen aus den Antikörper-produzierenden Zellen;
F) Selektieren der Hybridome, die Antikörper produzieren, die Cortisol binden; und
G) Isolieren der Antikörper, die Cortisol binden.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen