

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-514908

(P2004-514908A)

(43) 公表日 平成16年5月20日(2004.5.20)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	4 B O 5 O
C 1 2 N 9/12	C 1 2 N 9/12	
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543	5 4 5 Z

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2002-546222 (P2002-546222)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成13年11月27日 (2001.11.27)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月26日 (2003.5.26)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/013780		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02002/044731		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成14年6月6日 (2002.6.6)		グレンツァーヘルストラッセ124
(31) 優先権主張番号	100 59 720.3	(74) 代理人	100095832
(32) 優先日	平成12年11月30日 (2000.11.30)		弁理士 細田 芳徳
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(72) 発明者	ウブマイヤー, ハルバラ
			ドイツ連邦共和国 イッフエルドルフ 8
			2393 エーゲルランダーシュトラッセ
			12ツェー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫アッセイにおける結合パートナーとしての分子内共有結合架橋タンパク質の使用

(57) 【要約】

本発明は、分子内共有結合架橋タンパク質の使用、免疫アッセイにおける免疫学的結合パートナーとしての HIV の共有結合架橋逆転写酵素の使用、試料における被検体を測定するための免疫学的試験法（ここで分子内共有結合架橋タンパク質は結合パートナーとして使用される）、HIV の分子内共有結合架橋逆転写酵素、ならびにこれらの逆転写酵素の作製方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫学的試験手順における免疫学的結合パートナーとしての分子内共有結合架橋タンパク質の使用。

【請求項 2】

数個のサブユニットから構成されるタンパク質が使用されることを特徴とする請求項 1 記載の使用。

【請求項 3】

タンパク質として DNA ポリメラーゼまたは RNA ポリメラーゼが使用されることを特徴とする前記請求項の 1 つに記載の使用。

10

【請求項 4】

タンパク質として HIV 逆転写酵素が使用されることを特徴とする前記請求項の 1 つに記載の使用。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 いずれか記載の分子内共有結合架橋タンパク質が免疫学的結合パートナーとして使用されることを特徴とする、試料中の被検体を検出するための免疫学的試験手順。

【請求項 6】

HIV 感染を診断するための方法であることを特徴とする、請求項 5 記載の免疫学的試験手順。

【請求項 7】

逆転写酵素 (RT) の 2 つのサブユニットのみが互いに共有結合架橋され、数個の RT 分子間に分子間架橋が無いことを特徴とする、分子内共有結合架橋 HIV 逆転写酵素。

20

【請求項 8】

MHS (3 - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル)、EDC (1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド)、DSS (ジスクシンイミジルスベリン酸)、HSAB (N - ヒドロキシスクシンイミジル - 4 - アジド安息香酸) またはスルホ SANPAH (スルホスクシンイミジル - 6 (4' - アミド - 2' - ニトロフェニルアミド) ヘキサノエート) が、架橋試薬として使用されることを特徴とする、請求項 7 記載の分子内共有結合架橋 HIV 逆転写酵素。

【請求項 9】

- RT を溶解形態で提供する工程、
 - 任意に、RT を SH 基に対するブロッキング試薬と反応させる工程、
 - 混合物を水性緩衝液に透析させる工程、
 - 活性化 RT を、架橋試薬である MHS (3 - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル)、EDC (1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド)、DSS (ジスクシンイミジルスベリン酸)、HSAB (N - ヒドロキシスクシンイミジル - 4 - アジド安息香酸)、スルホ SANPAH (スルホスクシンイミジル - 6 (4' - アミド - 2' - ニトロフェニルアミド) ヘキサノエート) の 1 つと反応させる工程、
 - 任意に、反応を停止させる工程、
 - 透析により、反応生成物から過剰の反応物を分離する工程、
 - 任意に、透析した反応生成物を UV 光に曝露する工程、

30

40

を含む、請求項 7 または 8 の 1 つに記載の分子内架橋 HIV 逆転写酵素の作製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、試料における被検体を検出するための免疫アッセイ、免疫学的試験手順における免疫学的結合パートナーとしての分子内共有結合架橋タンパク質の使用、特に HIV に由来する共有結合架橋逆転写酵素の使用に関し、ここで分子内共有結合架橋タンパク質は結合パートナーとして使用される。本発明はまた、HIV に由来する分子内共有結合架橋逆転写酵素、およびこの逆転写酵素の作製方法に関する。

50

【0002】

免疫診断試験手順における被検体の検出のための結合パートナーとしてのタンパク質の使用が、長い間にわたり知られている。全ての従来の免疫アッセイにおいて、試料は被検体に特異的である1つ以上の結合パートナーとインキュベートされる。1つまたは複数の結合パートナーは、検出対象の被検体に特異的に結合する。抗体試験の場合、例えばHCV感染の場合、例えば検出対象の抗HCV抗体に特異的に結合するHCV抗原と試験対象の試料とを接触させる。例えば、腫瘍マーカー前立腺特異的抗原(PSA)を検出するための抗原試験において、試料中のPSAと特異的に結合する抗体と試料とを接触させる。

【0003】

その後、全ての免疫アッセイにおいて被検体が検出される。これは、例えば、被検体と免疫学的結合パートナーとからなる複合体に結合する検出可能な標識を用いる場合もう1つの結合パートナーと結合し、続いて検出することにより行なわれうる。

10

【0004】

一般に、免疫アッセイは、異種または同種の試験フォーマットにおいて行なわれる。異種試験フォーマットは、サンドイッチまたは結合試験としてしばしば行なわれる。拮抗的な方法もまた周知であり、被検体または特異的結合パートナーのいずれかが、例えば標識された被検体アナログを添加することにより、被検体と特異的結合パートナーとの複合体から置換される。

【0005】

全ての免疫学的試験方法において、特異的免疫学的結合パートナーとして使用される反応物が安定な形態で存在すること、およびそれらが例えば好ましくない保管条件により破壊されないことが重要である。このリスクは、特異的結合パートナーとして使用されるタンパク質が数個のサブユニットからなる場合に特に生じうる。サブユニットは、互いに、例えばジスルフィド結合により共有結合的に保持され得、または例えば水素結合、逆電荷および/または疎水性相互作用により非共有結合的に保持されうる。

20

【0006】

ある場合において、免疫学的試験に必要な材料は、試験のために調製された作業溶液における保管条件下(例えば、液体試薬として)でまたは免疫学的反応それ自身の間に不安定となり、変性しうる。その結果として、タンパク質の三次元構造および四次元構造は、免疫アッセイにおいて基質がもはや使用され得ないように、変化されうる。

30

【0007】

特異的結合対として使用されるタンパク質のサブユニット成分は、好ましくない条件下で分離しうる。サブユニットのこの解離は、例えば、天然の共有結合の場合、DTTなどの一般の緩衝液添加物によるジスルフィド結合の減少により生じうる。

【0008】

しかしながら、解離のリスクは、電荷または疎水性相互作用により互いに保持されるタンパク質の非共有結合的に連結されるサブユニットの場合、よりいっそう高い。かかるタンパク質のサブユニットは、塩もしくは界面活性剤などの一般の緩衝液添加物またはpHおよび温度における好ましくないバリエーションにより、いっそう非常に容易に解離されうる。個々のおよびよって非保護サブユニットは、したがって、また変性を受けやすい。これは、タンパク質の三次元構造または個々のサブユニットの三次元構造における主要な変更を導きうる。これはまた、重要なエピトープの利用性などの免疫学的特性が、免疫アッセイにおける結合パートナーとして使用されるタンパク質がもはや免疫学的に認識されず、したがってもはや特異的に結合されない程度まで変更されることを意味する。

40

【0009】

サブユニット解離のもう1つのリスクは、異なる標識基を与えられたサブユニットは、化学平衡の調整のために再会合しうることである。特定の場合において、結合試験フォーマットでの抗体試験における使用のための2つのサブユニットから構成されるタンパク質は、万能固相として使用されるために誘導化され、一方、同一のタンパク質がまた、シグナ

50

ル生成成分として使用され、そしてこの目的のために標識（例えば、酵素、蛍光または化学発光標識）に連結される場合、以下のことが起こるのであろう：陽性試料（被検体を含む試料）を用いて初期に生じる較正曲線が、時間が経過するにつれてより平らになる。陰性試料に対するシグナル（ブランク値）は増加し、より高い陽性試料の値にだんだん近づくので、被検体を含まない試料と被検体含有試料とを区別することはもはや可能でない。

【0010】

キノンとの反応により酵素を化学的に修飾する方法は、独国特許出願第DE 26 15 349号に記載されている。これらの修飾は安定性を増加し、改善された酵素活性をもたらす。酵素分子は、互いに、すなわち分子間でおよびまた分子内で架橋されることが言及される。この場合において、免疫反応性エピトープの保存は、関連性がない。免疫診断法におけるキノンを用いて修飾した酵素の使用は、記載されていない。

10

【0011】

De byser およびDe Clercq (Protein Science 1996, 5, p. 278 - 286) は、リジン側鎖を架橋するジメチルスベリミデートによる、HIV-1 逆転写酵素(RT)の2つのサブユニットの架橋を記載している。架橋の目的は、2つのRTサブユニットの二量体化を試験することである。二量体化RTのみ、酵素的に活性である。2つのサブユニットは様々なインヒビターの存在下で共有結合的に架橋される。インヒビターの効力に依存してより強くまたは弱く架橋されるRT分子および多量体が、化学的架橋反応後に形成される。免疫学的に関連性のあるエピトープの架橋の効果または免疫アッセイにおける架橋分子の使用は、重要でない。

20

【0012】

免疫アッセイにおける分子間架橋免疫グロブリンの使用は、EP-A-0 331 068に開示されている。これは、数個の免疫グロブリン分子またはその断片が、共有結合により互いに連結されることを意味する。抗体およびその断片の多量体は、干渉低減試薬として使用される。架橋された免疫グロブリンおよびその断片は、免疫グロブリンに対するヒト血清の干渉因子を除去することが意図される。

【0013】

天然条件下で数個のサブユニットから構成される従来技術で記載した架橋タンパク質は、抗原または免疫学的結合パートナーとしての使用に不適切であるか、または限定的に適切であるのみである。なぜなら、一般に、数個のタンパク質分子からなる分子間多量体が形成されるからである。これらの多量体は、明確なサイズを通常持たないので、免疫アッセイに対して限定的に使用されるのみである。したがって、多量体は、ランダムなサイズ分布を有し、すなわち単量体、二量体、三量体、四量体などが、1つの混合物の中に互いに存在する。明確でない架橋は、エピトープをマスクしうる。したがって、検出対象の試料抗体は、抗原のマスクされたエピトープに結合され得ず、そのために擬陰性結果が得られる。

30

【0014】

免疫学的結合パートナーとして多量体を用いることに関する別の問題は、試料中に存在する干渉因子が多量体タンパク質に非特異的に結合しうるという増加したリスクがあるという事実である。リウマチ因子などの干渉因子は、低親和性の数個の結合部位をしばしば有する。次に、多量体タンパク質が免疫学的結合パートナーとして使用される場合、これは、特に干渉因子が多く、標的、すなわち多量体タンパク質の結合部位を見出すという効果を有するのであろう。これは、擬陽性試験結果を導き得、免疫アッセイの全体的な特異性は、非常に低減される。

40

【0015】

したがって、本目的は、免疫アッセイにおいて結合パートナーとして使用されうる、改良された安定性を有するタンパク質を提供することであった。このように改良されたタンパク質は、良好なエピトープ利用性を有さなければならず、このタンパク質が使用される免疫学的試験手順の特異性が維持されなければならない。

【0016】

50

本目的は、独立形式請求項に記載される発明により達成される。従属形式請求項は、好ましい態様を示す。

【0017】

驚くべきことに、ほとんどもっぱら分子内架橋されるタンパク質が、免疫学的特性の損失なしに作製され得、これらのタンパク質は、免疫学的試験手順において免疫学的結合パートナーとして有利な様式で使用されることがわかった。タンパク質が架橋されない場合に起こる安定性問題は、したがって実質的に避けられる。したがって、本発明は、免疫学的試験手順における免疫学的結合パートナーとしての分子内共有結合架橋タンパク質の使用に関する。

【0018】

当業者によく知られている免疫学的試験手順に必要な全てのタンパク質は、タンパク質として使用されうる。そのフォールディング、すなわち三次元または四次元構造の結果として、免疫アッセイの条件下で非フォールディング、変性または種々のサブユニットへの解離の傾向を有しうる全てのポリペプチドが使用されうる。かかる構造変化が起こる場合、免疫学的に重要なエピトープが、例えば、もはや抗体により特異的に結合されない様式で変更されるというリスクがある。最悪の場合、これは、免疫学的試験結果が陰性であることを意味し、すなわち、結合パートナーとして使用されるタンパク質が変性されるので、それは検出対象の抗体の存在を示さない。これらの不利益は、本発明の分子内共有結合架橋タンパク質の使用により、実質的に避けられる。

【0019】

特に、天然に数個のサブユニットから構成される分子内共有結合架橋タンパク質が使用される。DNA またはRNA ポリメラーゼ、特にHIV 由来の逆転写酵素、および特に好ましくはHIV-1 由来の逆転写酵素が、好ましく使用される。

【0020】

タンパク質は、任意の所望の供給源に由来しうる。架橋されるタンパク質は、生物体またはウイルスなどの天然の供給源から単離されうる。しかしながら、遺伝子工学により作製された組換えタンパク質の使用が好ましい。例えば、Muellerら、J. Biol. Chem. 264/24:13975-13978(1989)に記載されるような発現クローンにより発現される組換え精製RTが、特に好ましく使用される。

【0021】

分子内共有結合架橋タンパク質に関して、免疫学的認識に重要であるエピトープが架橋により変更されないかまたはほんのわずかのみ変更され、試験における他の免疫学的結合パートナーが、まさしく架橋タンパク質ならびに非架橋タンパク質を認識し、かつ特異的に結合することが重要である。したがって、架橋は、試験結果を裏切りうるいずれの免疫学的関連人工産物も生成しないであろう。

【0022】

タンパク質という用語は、少なくとも約50アミノ酸、好ましくは少なくとも100アミノ酸から構成される全てのポリペプチドのことを言う。タンパク質という用語はまた、糖残基、シアリン酸または脂質構造に連結されるタンパク質などの修飾タンパク質を含む。

【0023】

「分子内共有結合架橋」という用語は、もはや非フォールディングし得ない、すなわちその三次元構造およびしたがって重要なエピトープの利用性を失い得ない様式で、ポリペプチド鎖が互いに化学修飾により連結されているタンパク質のことを言う。数個のサブユニットから構成されるタンパク質の場合、分子内共有結合架橋は、三次元ならびに四次元構造を維持する。該修飾は、種々のポリペプチド鎖が互いに離れて拡散するのを妨げる。

【0024】

タンパク質分子内に共有結合連結のみが生じることが、重要である。1つのポリペプチド鎖のみから構成されるタンパク質、したがって天然条件下で1つのサブユニットのみの場合、ポリペプチド鎖の少なくとも2つの部位が連結される。したがって、数個のタンパク

10

20

30

40

50

質からなるオリゴマーは、分子内共有結合架橋によって形成されない。かかるオリゴマーはまた、以下で、ポリマーまたは多量体と呼ばれる。したがって、分子内共有結合架橋タンパク質の分子量は、化学リンカーがタンパク質に共有結合され、したがって、全量が変わらずに増加する場合に、増加するのみである。

【0025】

数個のサブユニットから構成されるタンパク質の場合、本発明の連結は、そのままのタンパク質分子を天然にまた形成するそれらのサブユニットの間で生じるのみである。このことは、本発明の分子内共有結合架橋タンパク質のサイズおよび分子量が、架橋化学物質によりわずかに増加するのみであることを意味する。数個のタンパク質分子間の連結は事実上除外され、その結果、タンパク質のオリゴマーまたは多量体でさえ形成される。

10

【0026】

本発明により、架橋タンパク質は、架橋前後に他の修飾基を提供され得、それは例えば、標識抗原としての適用のため、または架橋タンパク質の固相への結合のために必要である。例えば、それらは、ビオチンもしくはストレプトアビジンとまたは酵素、蛍光もしくは化学発光基などのシグナル生成標識基と連結されうる。かかる修飾は、当業者によく知られている。これらの修飾は、本発明の分子内架橋タンパク質の免疫学的特性を変更しないが、または免疫アッセイにおける特異的な結合パートナーによる認識がまだ確保されている程度までのみ変更するであろう。

【0027】

タンパク質のほとんどもっぱらの分子内連結は、例えば、特に四次元構造を有するタンパク質の場合、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、続くクーマシーブルー染色により検出されうる。本発明によるタンパク質架橋の後、SDS-PAGEゲルにおいて天然のタンパク質の分子量よりも大きいいかなる分子量も裸眼で検出し得ないであろう。例えば、小型化した市販の8~25%のポリアクリルアミドのSDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲル(PharmaciaのPhastTMシステム)が使用される場合、レーン当たり適用されるタンパク質の量は、約500ngである。この量のタンパク質を用いて、天然の分子量より大きい分子量は、本発明によりこのシステムにおいて裸眼で検出され得ない。数個のサブユニット、すなわち数個のポリペプチド鎖を天然に有するタンパク質の場合、架橋後のバンドの分子量は、サブユニットの分子量の合計を超えないであろう。サブユニットの分子量の合計に対応する分子量を有するゲル上のタンパク質バンドは、四次構造を有するタンパク質の成功した分子内架橋に対する試験とみなされうる。したがって、SDS-PAGEは、数個のサブユニットからなるタンパク質の成功した分子内架橋および多量体の不在を確立するために使用されうる。

20

30

【0028】

多量体の不在を検出するための別の方法は、例えば、市販のHPLC装置を用いて行われうるゲル排除クロマトグラフィーとも呼ばれるゲル浸透クロマトグラフィーによる。個々のタンパク質の多量体に対応する分子量を有するタンパク質複合体は、単一で存在するタンパク質よりも、実質的に早く溶出される。本発明により、低い割合のかかる多量体のみが、存在するであろう。HPLCクロマトグラムを測定する場合、これは、分子内架橋のみである本発明のタンパク質の溶出ピーク(積分)に関連して約5%を超えない多量体が存在するであろうことを意味する。

40

【0029】

免疫学的結合パートナーは、免疫アッセイの条件下で他の分子に特異的に結合しうる全ての分子のことを言う。とりわけ、免疫学的結合パートナーは、被検体または被検体に結合した基質に特異的に結合されうるであろう。古典的な一群は、抗原への抗体の特異的な結合、例えばPSAへの抗PSA抗体の結合である。抗体および抗原は、免疫学的結合パートナーである。本発明の分子内共有結合架橋タンパク質は、免疫アッセイにおいて免疫学的結合パートナーとして使用される。抗原は、これらの抗原に対する抗体を検出することが意図される場合、免疫学的結合パートナーとして好ましく使用される。この場合、本発明の架橋されているHIV逆転写酵素による抗HIVRT抗体の検出が好ましく、後

50

の段落に記載される。

【0030】

本発明はまた、試料中の被検体を検出するための免疫学的試験手順に関する。該方法は、分子内共有結合架橋タンパク質が、免疫学的結合パートナーとして使用されることを特徴とする。分子内共有結合架橋タンパク質、特に数個のサブユニットから天然に構成されるものは、免疫アッセイの条件下で非架橋タンパク質よりもかなり安定である。

【0031】

免疫アッセイの種々のフォーマットおよび態様、ならびに酵素反応、蛍光または化学発光物質によるなどの種々の検出方法が、当業者によく知られており、したがって、本明細書で特に説明する必要はない。免疫学的反応の完了後、固相が液相から分離される本発明の異種試験フォーマットが好ましい。

10

【0032】

該方法は、好ましくは、HIV 感染を診断するための免疫アッセイである。患者が HIV 感染を有する場合、これは、血液、血清または血漿試料中のウイルスの一定の抗原に対して形成されている抗体を基礎として検出されうる。HIV-1 の p24 抗原などの HIV 自身のウイルス抗原を検出することもまた、しばしば可能である。これは、HIV 抗原、この場合 p24 に対する特異的な抗体の使用を必要とする。

【0033】

試料における HIV 感染の検出が、組み合わされた抗原および抗体検出試験としてしばしば行われる。かかる試験は、コンビテストと呼ばれる。かかるコンビテストは、WO 98/40744 に記載されている。この場合、HIV 抗原、すなわち HIV-1 または HIV-1 サブタイプ O の p24 抗原および対応する HIV-2 の p26 抗原は、特異的な抗体、ならびに HIV に対する抗体、とりわけ HIV-1 の gp160、gp120、gp41 および HIV-2 の gp140、gp110、gp36 などの病原体のエンベロープタンパク質 (env) に対する抗体により検出される。さらに、HIV-RT に対する抗体もまた、WO 98/40744 のコンビテストにおいて検出される。この目的のために、組換え的に作製される HIV-1 逆転写酵素が、免疫学的結合パートナーとして使用されるが、しかしながら、それは分子内共有結合架橋されていない。

20

【0034】

本発明の HIV 由来の分子内共有結合架橋 RT、とりわけ HIV-1 由来の RT は、好ましくは試料中の HIV 感染を検出するためのコンビテストに使用される。

30

【0035】

本発明の別の主題は、HIV 由来の分子内共有結合架橋逆転写酵素 (天然に2つのサブユニットが存在する酵素) である。HIV-RT は、天然条件下でヘテロ二量体として存在する。HIV-1 RT は、51kDa の1つのサブユニットと66kDa の1つのサブユニットから構成される。組換え形態は、例えば、発現クローンから得られうる (例えば、Mueller ら、1989、J. Biol. Chem. 264/24, p. 13975-13978)。アミノ酸レベルでのいくつかのセクションにおける約60%および100%でさえも同様の程度に起因して、HIV-1 RT は、一般に、HIV-2 RT に対する抗体を検出するためにも使用されうる。HIV という用語は、HIV-1、HIV-2、ならびに HIV-1 サブタイプ O などのウイルスの全てのサブタイプおよびサブグループを含む。分子内共有結合架橋形態の HIV-1 RT が、好ましい。

40

【0036】

驚くべきことに、分子内共有結合架橋 HIV RT が、免疫アッセイの条件下で非架橋形態よりも非常に安定であることがわかった。本発明の RT は、非架橋形態よりもかなり良好であり、例えば、より長いまたは不適当な保管であるいはアッセイ条件下で曝露される温度ストレスに抵抗した。本発明の分子内共有結合架橋 RT は、2つのサブユニットが互いに共有結合されるが、数個の分子の分子間架橋がないことを特徴とする。例えば、すで

50

に説明したゲル排除クロマトグラフィーまたはSDS-PAGEを用いることにより、数個のRT分子のオリゴマーが存在しないことが証明されうる。

【0037】

ホモ二官能性リンカーおよびヘテロ二官能性リンカーが、架橋試薬として好ましく使用される。特に、以下のものが、RTを分子内架橋するために好ましく使用される：MHS（3-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）、EDC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）、DSS（ジスクシンイミジルスベリン酸）、HSAB（N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジド安息香酸）、スルホSANPAH（スルホスクシンイミジル-6（4'-アミド-2'-ニトロフェニルアミド）ヘキサノエート）。すでに説明したように、架橋リンカーの化学反応は、タンパク質または2つのRTサブユニットの分子内架橋を生じるのみであるが、数個のRT分子間の架橋は生じないことが重要である。さらに、免疫学的関連エピトープが化学反応により破壊されないことが重要である。

10

【0038】

本発明の別の主題は、分子内架橋HIV逆転写酵素の作製方法である。該方法は、

- RTを溶解形態で提供する工程、
 - 任意に、RTをSH基に対するブロッキング試薬と反応させる工程、
 - 混合物を水性緩衝液に透析させる工程、
 - 活性化RTを、架橋試薬であるMHS（3-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）、EDC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）、DSS（ジスクシンイミジルスベリン酸）、HSAB（N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジド安息香酸）、スルホSANPAH（スルホスクシンイミジル-6（4'-アミド-2'-ニトロフェニルアミド）ヘキサノエート）の1つと反応させる工程、
 - 任意に、反応を停止させる工程、
 - 透析により、反応生成物から過剰の反応物を分離する工程、
 - 任意に、透析した反応生成物をUV光に曝露する工程、
- を含む。

20

【0039】

RT対架橋試薬の好ましい化学量論は、約1:1 ~ 1:20である。反応物の比は、数個のRT分子間にオリゴマー化が生じないかまたは無視してよいオリゴマー化のみが生じるように選択される。

30

【0040】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明される。

【0041】

実施例1

HIV-1逆転写酵素の分子内架橋

a) MHSによる架橋

HIV-1逆転写酵素（10mg/ml）を、50mMのジエタノールアミン、pH 8.8、25mMのNaCl、1mMのDTT、1mMのEDTAに溶解する。pHを1MのKH₂PO₄溶液を添加することによって6.4に調整する。

40

【0042】

この混合物をNMM（N-メチルマレイニンイミド）含有DMSOの1M溶液の適切なアリコートを追加することによって5mMのNMMに調整し、続いて60分間25℃にて攪拌しながらインキュベートする。続いて、50mMのジエタノールアミン、pH 8.8、25mMのNaClに対して透析する。

【0043】

pHをここで1MのKH₂PO₄溶液を添加することによってpH 7.0に調整する。MHS（3-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）のストック溶液を、DMSO中に調製する（5mg/ml）。1:8（mol 逆転写酵素/m

50

o 1 M H S) の初期化学量論に対応するこの溶液の量を、混合物に添加し、次いで攪拌しながらさらに60分、25 にてインキュベートする。この反応を、リジン反応混合物に10 mMの最終濃度で添加して、さらに30分間インキュベートすることによって停止する。過剰の反応物を、10 mMのリン酸カリウム緩衝液、pH 6.0、50 mMのNaCl、1 mMのEDTAに対する透析によって分離する。

【0044】

透析後、pHを1 Mの K_2HPO_4 溶液のアリコートを追加することによって7.4に調整し、2 mMの最終濃度でシステインを追加する前に、この混合物を攪拌しながらさらに4時間25 でインキュベートする。さらに30分間のインキュベーション後、反応を、NMM (最終濃度5 mM) を追加することによって停止する。この混合物を、50 mMのジエタノールアミン、pH 8.8、25 mMのNaClに対して透析する。

10

【0045】

b) EDC による架橋

HIV-1 逆転写酵素 (10 mg/ml) を、50 mMのジエタノールアミン、pH 8.8、25 mMのNaCl、1 mMのDTT、1 mMのEDTAに溶解する。pHを1 Mの KH_2PO_4 溶液を追加することによって6.4に調整する。

【0046】

この混合物をNMM (N-メチルマレインイミド) 含有DMSOの1 M溶液の適切なアリコートを追加することによって5 mMのNMMに調製し、続いて60分間25 にて攪拌しながらインキュベートする。続いて、10 mMのリン酸カリウム緩衝液、pH 7.0、50 mMのNaClに対して透析する。

20

【0047】

EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド) のストック溶液を、DMSO中に調製する (2 mg/ml)。1:10 (mol 逆転写酵素/mol EDC) の初期化学量論に対応するこの溶液の量を、混合物に添加し、次いで攪拌しながらさらに60分間25 にてインキュベートする。過剰の反応物を、25 mMのリン酸カリウム緩衝液、pH 7.0、50 mMのNaClに対する透析によって分離する。

【0048】

c) DSS による架橋

HIV-1 逆転写酵素 (10 mg/ml) を、50 mMのジエタノールアミン、pH 8.8、25 mMのNaCl、1 mMのDTT、1 mMのEDTAに溶解する。pHを1 Mの KH_2PO_4 溶液を追加することによって6.4に調整する。

30

【0049】

この混合物をNMM (N-メチルマレインイミド) 含有DMSOの1 M溶液の適切なアリコートを追加することによって5 mMのNMMに調製し、続いて60分間25 にて攪拌しながらインキュベートする。続いて、10 mMのリン酸カリウム緩衝液、pH 8.0、25 mMのNaClに対して透析する。

【0050】

DSS (ジスクシンイミジルスベリン酸) のストック溶液を、DMSO中に調製する (2 mg/ml)。1:10 (mol 逆転写酵素/mol DSS) の初期化学量論に対応するこの溶液の量を、混合物に添加し、次いで攪拌しながらさらに60分間25 にてインキュベートする。過剰の反応物を、25 mMのリン酸カリウム緩衝液、pH 7.0、50 mMのNaClに対する透析によって分離する。

40

【0051】

d) HSAB による架橋

HIV-1 逆転写酵素 (10 mg/ml) を、50 mMのジエタノールアミン、pH 8.8、25 mMのNaCl、1 mMのDTT、1 mMのEDTAに溶解する。pHを1 Mの KH_2PO_4 溶液を追加することによって6.4に調整する。

【0052】

50

この混合物をNMM (N-メチルマレインイミド)含有DMSOの1M溶液の適切なアリコートを追加することによって5mMのNMMに調製し、続いて60分間25℃にて攪拌しながらインキュベートする。続いて、10mMのリン酸カリウム緩衝液、pH8.0、25mMのNaClに対して透析する。

【0053】

HSA B (N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジド安息香酸)のストック溶液を、DMSO中に調製する(2mg/ml)。1:5(mol逆転写酵素/molHSA B)の初期化学量論に対応するこの溶液の量を、混合物に添加し、次いで攪拌しながらさらに60分間25℃にてインキュベートする。過剰の反応物を、25mMのリン酸カリウム緩衝液、pH7.0、50mMのNaClに対する透析によって分離する。

10

【0054】

この混合物を、次いでUVランプを用いて7分間照射する。

【0055】

e)スルホSANPAHによる架橋

HIV-1逆転写酵素(10mg/ml)を、50mMのジエタノールアミン、pH8.8、25mMのNaCl、1mMのDTT、1mMのEDTAに溶解する。pHを1MのKH₂PO₄溶液を追加することによって6.4に調整する。

【0056】

この混合物をNMM (N-メチルマレインイミド)含有DMSOの1M溶液の適切なアリコートを追加することによって5mMのNMMに調製し、続いて60分間25℃にて攪拌しながらインキュベートする。続いて、10mMのリン酸カリウム緩衝液、pH8.0、25mMのNaClに対して透析する。

20

【0057】

スルホSANPAH(スルホスクシンイミジル-6(4'-アミド-2'-ニトロフェニルアミド)ヘキサノエート)のストック溶液を、DMSO中に調製する(4mg/ml)。1:5(mol逆転写酵素/molスルホSANPAH)の初期化学量論に対応するこの溶液の量を、混合物に添加し、次いで攪拌しながらさらに60分間25℃にてインキュベートする。過剰の反応物を、25mMのリン酸カリウム緩衝液、pH7.0、50mMのNaClに対する透析によって分離する。

【0058】

この混合物を、次いでUVランプを用いて7分間照射する。

30

【0059】

実施例2

HIV-1逆転写酵素の限定的分子内架橋の検出

a)SDSゲル電気泳動

分子内架橋されたHIV-1逆転写酵素のアリコートを、製造業者の標準的プロトコールに従って、Phastゲル装置(PharmaciaTM)上でのSDSの存在下でポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。

【0060】

未架橋対照は、逆転写酵素のサブユニットに対応する66kDおよび51kDの分子量を有するバンドのみを有する。分子内架橋された逆転写酵素は、サブユニット間の架橋が成功したことを示す110~120kDの分子量を有するバンドを示す。より大きなタンパク質複合体は、検出不可能である、すなわち、逆転写酵素のいくつかの分子の分子内連結は、本発明に従う架橋方法では生じない。

40

【0061】

b)分析ゲル浸透クロマトグラフィー

分子内架橋されたHIV-1逆転写酵素のアリコートを、製造業者の標準的プロトコールに従って、市販されているHPLC装置を用いてTSK3000カラム(TosoHaasTM)上のゲル浸透クロマトグラフィーにより分析した。

【0062】

50

分子内架橋された逆転写酵素は、100 ~ 130 kD の分子量を有する球状タンパク質に対応する保持時間（この場合は7.5分）でカラムから溶出する。クロマトグラムにおいてより短い保持時間を有するより大きなタンパク質複合体は、検出不可能である、すなわち、本発明に従う架橋方法は、オリゴマー構造またはポリマー構造を形成するような逆転写酵素のいくつかの分子の分子間架橋を生じない。クロマトグラムを図1に示す。

【0063】

実施例3

例としてビオチン標識を用いる分子内架橋されたHIV-1逆転写酵素の誘導

分子内架橋されたHIV-1逆転写酵素（実施例1参照）は、ジエタノールアミンまたはリン酸カリウム緩衝液中に存在する。未架橋RTを、比較として、N-メチルマレイミドで処理し、ジエタノールアミンに対して透析する。必要な場合、pHを、NaOHを添加することによって全てのRT混合物において8.6 ~ 8.8に調整する。ビオチン-DDS（ビオチン化-ジアミノジオキサオクタン-ジスクシンイミジルスベリン酸）のストックを、DMSO中に調製する（6mg/ml）。1:4（mol逆転写酵素/molビオチン-DDS）の初期化学量論に対応するこの溶液の量を、混合物に添加し、次いで攪拌しながらさらに60分間25℃にてインキュベートする。この反応を、リジン反応混合物に10mMの最終濃度で添加して、さらに30分間インキュベートすることによって停止する。過剰の反応物を、50mMのジエタノールアミン、pH8.8、25mMのNaClに対する透析によって分離する。

10

【0064】

実施例4

機能試験における安定性チェック

免疫アッセイを、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim製Elesys（登録商標）上で実施して、HIV-1逆転写酵素の安定性を試験した。抗RT抗体を含まない陰性対照（NC）および抗RT抗体を含む陽性対照（PC）に加えて、抗RT反応性を有する2つのHIV陽性ヒト血清を測定した。

20

【0065】

45μlのサンプルを、55μlの試薬1（ビオチン化RT）および55μlの試薬2（ルテニウム標識RT）と共に9分間37℃にてインキュベートした。続いて、ストレプトアビジンコーティングされた磁性ビーズを添加し、この混合物をさらに9分間インキュベートした。ビーズを磁石により捕らえた後、電気化学発光シグナルを定量した。

30

【0066】

本発明の架橋形態および未架橋形態におけるビオチン化逆転写酵素の安定性を比較するため、試薬1（ビオチン化RT）を、試験を実施する前に以下に記載のように18時間42℃にてインキュベートした。同時に調製し、4℃にて貯蔵した試薬1を参考として利用した。全ての他の試薬を実験のために新たに調製した。

【0067】

評価は、シグナルとそれぞれの陰性対照の比率を決定することを意味するシグナルの動的範囲に基づいた。シグナル動力に対する値が大きくなればなるほど、HIV抗体陽性と陰性サンプルとの間の差は大きくなる。これ故、シグナルのより大きな動的範囲が所望される。それぞれの値間の関係を使用して、ストレスRTと非ストレスRTを比較した。結果を表1に示す。

40

【0068】

【表1】

組換え HIV-1-RT-Bi(DDS) ; 未架橋						
ストレスなし		18 時間 42℃ストレス		ストレス/非ストレスの比較		
サンプル	計数	シグナル 動的範囲	計数	シグナル 動的範囲	計数	シグナル 動的範囲
陰性対照	1763	1.0	1049	1.0	60%	100%
陽性対照	16848	9.6	1480	1.4	9%	15%
HIV 血清 1	6209	3.5	1054	1.0	17%	29%
HIV 血清 2	5162	2.9	917	0.9	18%	30%
HIV 血清 3	5832	3.3	1150	1.1	20%	33%
HIV 血清 4	111444	63.2	6267	6.0	6%	9%
組換え HIV-1-RT(MHS)- Bi(DDS) ; 本発明の架橋						
ストレスなし		18 時間 42℃ストレス		ストレス/非ストレスの比較		
サンプル	計数	シグナル 動的範囲	計数	シグナル 動的範囲	計数	シグナル 動的範囲
陰性対照	1304	1.0	1206	1.0	92%	100%
陽性対照	73335	56.2	72611	64.4	106%	114%
HIV 血清 5	8476	6.5	7092	5.9	84%	90%
HIV 血清 6	14504	11.1	10615	8.8	73%	79%
HIV 血清 7	69459	53.3	59347	49.2	85%	92%
HIV 血清 8	168674	129.4	168304	139.6	100%	108%

10

20

【 0 0 6 9 】

上昇させた温度での数時間のストレス後でさえ、本発明の R T 架橋を用いた免疫アッセイにおけるシグナルの動的範囲は、非ストレス R T と比較して少なくともまだ 7 9 % であり、好ましくは少なくとも 9 0 % であったが、一方、陰性対照に基づく動的範囲は、未架橋 R T の場合、せいぜい約 3 0 % であり、時には 3 0 % よりずいぶん低くまたは 2 0 % 未満でさえあった。未架橋 R T を用いた場合、シグナルは、陰性血清のレベルに低下したが、一方、本発明の架橋 R T は、その免疫学的機能を維持したままである。それ故、サンプル抗体によって認識される R T エピトープは、温度ストレスに関わらず実質的に保存される。これは、本発明の架橋 R T が未架橋 R T よりもずいぶん安定であることを意味する。

【 図面の簡単な説明 】

30

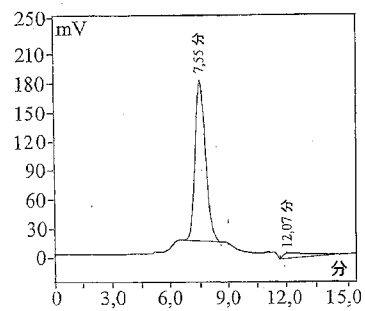
【 図 1 】

図 1 は、架橋後に得られる R T の分子量のゲル浸透クロマトグラフィーによる解析を示す。

。

【 図 1 】

Fig. 1/1



ピーク番号	保持時間 [分]	相対強度 [%]
1	7.55	91.66
2	12.07	8.34

【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Juni 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/44731 A2(51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/569,
33/53, 33/531, 33/543

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/13780

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. November 2001 (27.11.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 59 720.3 30. November 2000 (30.11.2000) DE(71) Anmelder (nur für DE): ROCHE DIAGNOSTICS
GMBH [DE/DE], Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim
(DE).(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
DE, US): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH];
Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): UPMEIER, Barbara
[DE/DE]; Egerlanderstrasse 12 C, 82393 Iffeldorf (DE).
SCHLIEPER, Dittmar [DE/DE]; Egerlanderstrasse 12 C,
82393 Iffeldorf (DE). DONIE, Frederic [DE/DE]; In der
Au 10, 82377 Penzberg (DE).(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für den folgenden Bestimmungsstaat
- Erfinderverklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Erfinderverklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Erfinderverklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF INTRAMOLECULARLY, COVALENTLY CROSS-LINKED PROTEINS AS BINDING PARTNERS IN IMMUNOASSAYS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG INTRAMOLEKULAR KOVALENT VERNETZTER PROTEINE ALS BINDEPARTNER IN IMMUNOASSAYS

(57) Abstract: The invention relates to the use of intramolecularly, covalently cross-linked proteins, to the use of covalently cross-linked reverse transcriptases of HIV as immunological binding partners in immunoassays, to immunological testing methods for determining an analyte in a sample, in which intramolecularly, covalently cross-linked proteins are used as binding partners, to intramolecularly, covalently cross-linked reverse transcriptases of HIV, and to a method for producing these reverse transcriptases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung intramolekular kovalent vernetzter Proteine, die Verwendung kovalent vernetzter Reverse Transkriptase von HIV als immunologische Bindepartner in Immunoassays, immunologische Testverfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, in dem intramolekular kovalent vernetzte Proteine als Bindepartner eingesetzt werden, intramolekular kovalent vernetzte Reverse Transkriptase von HIV, sowie ein Verfahren zur Herstellung dieser Reverse Transkriptase.

WO 02/44731 A2

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

Verwendung intramolekular kovalent vernetzter Proteine als Bindepartner in Immunoassays

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung intramolekular kovalent vernetzter Proteine und insbesondere die Verwendung kovalent vernetzter Reverser Transkriptase von HIV als immunologische Bindepartner in Immunoassays, immunologische Testverfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, in dem intramolekular kovalent vernetzte Proteine als Bindepartner eingesetzt werden, intramolekular kovalent vernetzte Reverse Transkriptase von HIV, sowie ein Verfahren zur Herstellung dieser Reversen Transkriptase.

Die Verwendung von Proteinen als Bindepartner für den Nachweis von Analyten in immundiagnostischen Testverfahren ist seit langem bekannt. In allen gängigen Immunoassays wird die Probe mit einem oder mehreren, für den Analyten spezifischen Bindepartnern inkubiert. Der oder die Bindepartner binden spezifisch an den nachzuweisenden Analyten. Im Falle eines Antikörper-Nachweises – beispielsweise bei einer HCV-Infektion - wird die zu untersuchende Probe beispielsweise mit einem HCV-Antigen in Kontakt gebracht, das den nachzuweisenden Anti-HCV-Antikörper spezifisch bindet. Bei einem Antigen-Nachweis wie beispielsweise beim Nachweis des Tumormarkers prostata-spezifisches Antigen (PSA) wird die Probe mit Antikörpern in Kontakt gebracht, die spezifisch das PSA in der Probe binden.

Anschließend findet in allen Immunoassays der Nachweis des Analyten statt. Dies kann beispielsweise durch die Bindung und anschließende Detektion eines weiteren, mit einer nachweisbaren Markierung versehenen Bindepartners erfolgen, der an den Komplex aus Analyt und immunologischem Bindepartner bindet.

Im allgemeinen werden die Immunoassays im heterogenen oder homogenen Testformat durchgeführt. Die heterogenen Testformate werden häufig als Sandwich- oder Brückentest durchgeführt. Auch kompetitive Verfahren, bei denen entweder der Analyt oder der spezi-

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 2 -

fische Bindepartner aus dem Komplex aus Analyt und spezifischem Bindepartner beispielsweise durch Zugabe eines markierten Analyt-Analogons verdrängt werden, sind allgemein bekannt.

Wichtig ist bei allen immunologischen Testverfahren, dass die als spezifische immunologische Bindepartner eingesetzten Reaktanten in stabiler Form vorliegen und dass diese beispielsweise aufgrund ungünstiger Lagerbedingungen nicht zerstört werden. Diese Gefahr besteht insbesondere dann, wenn die als spezifische Bindepartner eingesetzten Proteine aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt sind. Die Untereinheiten können kovalent wie zum Beispiel über Disulfidbrücken oder nicht kovalent, beispielsweise über Wasserstoffbrücken, entgegengesetzte Ladungen und/oder hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten werden.

In einigen Fällen kommt es unter den Lagerbedingungen der für den immunologischen Test benötigten Einsatzstoffe (beispielsweise als Flüssigreagenz), in den für den Test hergestellten Arbeitslösungen oder im Umfeld der immunologischen Reaktion selbst zu Instabilitäten und Denaturierungen. Diese führen dazu, dass sowohl die Tertiär- als auch die Quartärstruktur des Proteins in einer Weise verändert wird, dass der Einsatzstoff nicht mehr für den Einsatz im Immunoassay verwendet werden kann.

Unter ungünstigen Bedingungen trennen sich die zusammengehörenden Untereinheiten der als spezifische Bindepartner eingesetzten Proteine voneinander. Diese Dissoziation von Untereinheiten kann im Falle von natürlicherweise kovalenten Verbrückungen beispielsweise durch Reduktion von Disulfidbrücken durch übliche Pufferzusätze wie DTT verursacht werden.

Noch größer ist allerdings die Gefahr der Dissoziation von nicht kovalent verbundenen Untereinheiten eines Proteins, die über Ladungen oder hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Bei solchen Proteinen kann die Dissoziation der Untereinheiten bereits sehr leicht durch gängige Pufferzusätze wie Salze oder Detergenzien oder ungünstige pH- und Temperaturschwankungen ausgelöst werden. Eine einzelne, quasi ungeschützte Untereinheit ist damit auch der Denaturierung ausgesetzt. Dadurch kann die Ter-

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 3 -

tiärstruktur des Proteins bzw. der einzelnen Untereinheit stark verändert werden. Dies bedeutet, dass auch die immunologischen Eigenschaften wie beispielsweise die Zugänglichkeit von wichtigen Epitopen so stark verändert werden, dass das als Bindepartner im Immunoassay eingesetzte Protein immunologisch nicht mehr erkannt, das heißt nicht mehr spezifisch gebunden wird.

Eine weitere Gefahr der Dissoziation von Untereinheiten besteht darin, dass aufgrund der Einstellung des chemischen Gleichgewichts mit verschiedenen Markierungsgruppen verschiedene Untereinheiten wieder reassoziieren. Wird im konkreten Fall ein aus zwei Untereinheiten bestehendes Protein für den Einsatz in einem Antikörper-Nachweis im Brückentestformat einerseits für den Einsatz an einer universellen Festphase derivatisiert, andererseits das gleiche Protein aber auch als signalgebende Komponente eingesetzt und für diesen Zweck an einen Marker (z.B. ein Enzym, Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzmarker) gekoppelt, so kann folgendes geschehen: Eine anfänglich mit Positivproben (Proben, die den Analyten enthalten) erzeugte Eichkurve wird über den Zeitverlauf zunehmend flacher. Die Signale für negative Proben (Leerwerte) steigen und nähern sich den Werten für die oberen Positivproben mehr und mehr an, so dass keine Differenzierung mehr zwischen analytfreien und analythaltigen Proben mehr möglich ist.

In der deutschen Patentanmeldung DE 26 15 349 wird ein Verfahren zur chemischen Modifikation von Enzymen durch Umsetzung mit Chinonen beschrieben. Diese Modifikationen bewirken einen Stabilitätsgewinn, der eine verbesserte Enzymaktivität zur Folge hat. Es wird darauf hingewiesen, dass die Vernetzung der Enzymmoleküle untereinander, das heißt intermolekular, aber auch intramolekular erfolgen kann. Der Erhalt immunreaktiver Epitope spielt hierbei keine Rolle. Der Einsatz der mit Chinonen modifizierten Enzyme in immundiagnostischen Verfahren wird nicht beschrieben.

Debyser und De Clercq (Protein Science 1996, 5, S. 278-286) beschreiben die Vernetzung der beiden Untereinheiten der HIV-1 Reversen Transkriptase (RT) mittels Dimethylsuberimidat, wodurch Lysin-Seitenketten miteinander verknüpft werden. Zweck der Vernetzung ist die Untersuchung der Dimerisierung der beiden RT-Untereinheiten. Nur die dimere RT ist enzymatisch aktiv. Die kovalente Vernetzung der beiden Untereinheiten findet in Ge-

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 4 -

genwart verschiedener Inhibitoren statt. Je nach Effektivität des Inhibitors sind nach der chemischen Vernetzungsreaktion mehr oder weniger stark vernetzte RT-Moleküle bzw. Multimere entstanden. Die Auswirkung der Vernetzung auf immunologisch relevante Epitope oder die Verwendung der vernetzten Moleküle in Immunoassays spielt keine Rolle.

In der EP-A-0 331 068 wird die Verwendung von intermolekular vernetzten Immunglobulinen in Immunoassays offenbart. Das heißt mehrere Immunglobulin-Moleküle bzw. deren Fragmente werden miteinander kovalent verknüpft. Die Multimere von Antikörpern bzw. ihren Fragmenten werden als Entstörreagenz eingesetzt. Die vernetzten Immunglobuline bzw. ihre Fragmente sollen auf Immunglobuline gerichtete Störfaktoren in Humanseren beseitigen.

Die im Stand der Technik beschriebenen vernetzten Proteine, die unter natürlichen Bedingungen aus mehreren Untereinheiten bestehen, sind für den Einsatz als Antigene bzw. immunologische Bindepartner nicht oder nur bedingt geeignet, da im allgemeinen intermolekulare Multimere aus mehreren Proteinmolekülen entstehen. Diese Multimere sind für den Einsatz in Immunoassays nur bedingt geeignet, da ihre Größe zumeist nicht genau definiert ist. Die Multimere existieren somit lediglich in statistischer Größenverteilung, das heißt es gibt Mono-, Di-, Tri-, Tetramere etc nebeneinander in einem Ansatz. Durch die undefinierte Vernetzung kann es zur Verdeckung von Epitopen kommen. Dies kann dazu führen, dass beispielsweise ein nachzuweisender Proben-Antikörper nicht an die verdeckten Epitope des Antigens binden kann und somit ein falsch negatives Ergebnis erhalten wird.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung von Multimeren als immunologische Bindepartner ist die Tatsache, dass das Risiko unspezifischer Bindung von Störfaktoren an die multimeren Proteine steigt, die in der Probe vorhanden sind. Störfaktoren wie beispielsweise Rheumafaktoren haben oftmals mehrere schwach affine Bindungsstellen. Werden nun multimeren Proteine als immunologische Bindepartner eingesetzt, kann dies dazu führen, dass insbesondere die Störfaktoren viele Angriffspunkte, das heißt Bindungsstellen bei den multimeren Proteinen finden. Als Folge davon können falsch-positive Testergebnisse erhalten werden, und die Spezifität des Immunoassays wird insgesamt stark verringert.

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 5 -

Aufgabe war es daher, hinsichtlich ihrer Stabilität verbesserte Proteine bereitzustellen, die in Immunoassays als Bindepartner eingesetzt werden können. Die so verbesserten Proteine sollten eine gute Epitopzugänglichkeit besitzen, und es sollte die Spezifität des immunologischen Nachweisverfahren, in dem die Proteine eingesetzt werden, gewahrt bleiben.

Die Aufgabe wird gelöst durch die in den unabhängigen Ansprüchen beschriebene Erfindung. Die abhängigen Ansprüche stellen bevorzugte Ausführungsformen dar.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass sich praktisch ausschließlich intramolekular vernetzte Proteine ohne Verlust ihrer immunologischen Eigenschaften herstellen lassen und diese in vorteilhafter Weise in immunologischen Testverfahren als immunologische Bindepartner eingesetzt werden können. Die ohne Vernetzung auftretenden Stabilitätsprobleme der Proteine werden somit weitgehend verhindert. Die Erfindung betrifft daher die Verwendung intramolekular kovalent vernetzter Proteine als immunologische Bindepartner in immunologischen Testverfahren.

Als Proteine können alle dem Fachmann geläufigen, für immunologische Testverfahren erforderliche Proteine verwendet werden. Es können alle Polypeptide eingesetzt werden, die aufgrund ihrer Faltung, das heißt ihrer Tertiär- oder Quartärstruktur dazu neigen können, unter den Bedingungen eines Immunoassays ihre Faltung zu verlieren, zu denaturieren oder in ihre verschiedenen Untereinheiten zu dissoziieren. Bei einer solchen strukturellen Änderung besteht die Gefahr, dass immunologisch wichtige Epitope so verändert werden, dass sie beispielsweise von Antikörpern nicht mehr spezifisch gebunden werden. Im schlimmsten Fall bedeutet dies, dass ein immunologischer Test negativ ausfällt, das heißt die Anwesenheit des nachzuweisenden Antikörpers nicht anzeigt, weil die als Bindepartner eingesetzten Proteine denaturiert sind. Diese Nachteile werden durch den erfindungsgemäßen Einsatz der intramolekular kovalent vernetzten Proteine weitgehend vermieden.

Insbesondere werden solche intramolekular kovalent vernetzten Proteine eingesetzt, die natürlicherweise aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind. Bevorzugt werden DNA-

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 6 -

oder RNA-Polymerasen, besonders bevorzugt Reverse Transkriptase von HIV, ganz besonders bevorzugt Reverse Transkriptase von HIV-1 eingesetzt.

Die Herkunft der Proteine kann beliebiger Natur sein. Die zu vernetzenden Proteine können aus ihrer natürlichen Quelle, also beispielsweise einem Organismus oder Virus isoliert werden. Bevorzugt ist jedoch die Verwendung mittels gentechnologischer Methoden rekombinant hergestellter Proteine. Ganz besonders bevorzugt wird eine rekombinant hergestellte aufgereinigte RT verwendet, die von einem Expressionsklon wie er beispielsweise bei Müller et al. in J. Biol. Chem. 264/24: 13975-13978 (1989) beschrieben ist, exprimiert wird.

Bei den intramolekular kovalent vernetzten Proteinen ist es wichtig, dass die für die immunologische Erkennung entscheidenden Epitope durch die Vernetzung nicht oder nur so geringfügig verändert werden, dass der andere immunologische Bindepartner im Test das vernetzte Protein genauso gut erkennt und spezifisch bindet wie das unvernetzte Protein. Durch die Vernetzung dürfen also keine immunologisch relevanten Artefakte erzeugt werden, die das Testergebnis verfälschen können.

Unter der Bezeichnung Protein werden alle Polypeptide verstanden, die aus mindestens etwa 50 Aminosäuren, bevorzugt aus mindestens 100 Aminosäuren bestehen. Modifizierte Proteine, die beispielsweise mit Zuckerresten, Sialinsäuren oder Lipidstrukturen verknüpft sind, werden ebenfalls unter dem Begriff Protein verstanden.

Unter dem Begriff "intramolekular kovalent vernetzt" werden Proteine verstanden, deren Polypeptidkette mittels chemischer Modifikation so miteinander verknüpft ist, dass diese nicht mehr auseinanderfallen kann, das heißt ihre Tertiärstruktur und damit die Zugänglichkeit wichtiger Epitope nicht verliert. Im Falle eines Proteins, das aus mehreren Untereinheiten besteht, bewirkt die intramolekulare kovalente Vernetzung, dass sowohl die Tertiär- als auch die Quartärstruktur erhalten bleibt. Die verschiedenen Polypeptidketten können aufgrund der Modifikation nicht mehr auseinanderriffundieren.

- 7 -

Wesentlich ist, dass die kovalente Verknüpfung nur innerhalb eines Proteinmoleküls erfolgt. Bei Proteinen, die unter natürlichen Bedingungen nur aus einer Polypeptidkette und somit nur aus einer Untereinheit bestehen, erfolgt eine Verknüpfung von mindestens zwei Stellen innerhalb einer Polypeptidkette. Es entsteht durch die intramolekular kovalente Vernetzung daher kein Oligomer aus mehreren Proteinen. Solche Oligomere werden im folgenden auch als Poly- oder Multimere bezeichnet. Das Molekulargewicht der intramolekular kovalent vernetzten Proteine wird also nur insofern erhöht, als die chemische Verknüpfungssubstanz kovalent im Protein gekoppelt ist und damit die Gesamtmasse geringfügig erhöht wird.

Bei Proteinen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, erfolgt die Verknüpfung erfindungsgemäß nur zwischen denjenigen Untereinheiten, die auch natürlicherweise ein intaktes Proteinmolekül bilden. Das heißt die Größe bzw. das Molekulargewicht des erfindungsgemäß intramolekular kovalent vernetzten Proteins werden nur geringfügig durch die vernetzende chemische Substanz erhöht. Praktisch ausgeschlossen sind Verknüpfungen, die innerhalb mehrerer Proteinmoleküle erfolgen, so dass sich Oligo- oder gar Polymere der Proteine bilden.

Erfindungsgemäß können die vernetzten Proteine vor oder nach der Vernetzung mit weiteren Modifikationsgruppen versehen werden, die beispielsweise für den Einsatz als markierte Antigene oder für die Bindung der vernetzten Proteine an eine Festphase erforderlich sind. Beispielhaft seien hier die Verknüpfung mit Biotin oder Streptavidin oder mit signalgebenden Markierungsgruppen wie Enzymen, Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzgruppen erwähnt. Dem Fachmann sind solche Modifikationen geläufig. Durch diese Modifikationen dürfen sich die immunologischen Eigenschaften der erfindungsgemäß intramolekular vernetzten Proteine nicht oder nur insoweit verändern, dass eine Erkennung durch die spezifischen Bindepartner im Immunoassay immer noch gewährleistet ist.

Die nahezu ausschließlich intramolekulare Verknüpfung der Proteine kann insbesondere für Proteine mit Quartärstruktur beispielsweise mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung nachgewiesen werden. Es sollen nach der erfindungsgemäßen Vernetzung des Proteins in einem SDS-PAGE-Gel mit

- 8 -

dem bloßen Auge keine größeren Molekulargewichte erkennbar sein als dem natürlichen Molekulargewicht des Proteins entspricht. Wird beispielsweise ein miniaturisiertes, kommerziell erhältliches SDS-Polyacrylamid-Gradientengel von 8 bis 25 % Polyacrylamid des Phast™-Systems der Firma Pharmacia eingesetzt, beträgt die aufgetragene Proteinmenge pro Spur etwa 500 ng. Bei dieser Menge lassen sich in diesem System erfindungsgemäß mit dem bloßen Auge keine größeren Molekulargewichte erkennen als dem natürlichen Molekulargewicht entspricht. Bei Proteinen, die natürlicherweise mehrere Untereinheiten, das heißt mehrere Polypeptidketten besitzen, darf das Molekulargewicht einer Bande nach der Vernetzung nicht die Summe der Molekulargewichte der Untereinheiten übersteigen. Proteinbanden auf dem Gel, die ein Molekulargewicht aufweisen, welches der Summe des Molekulargewichts der Untereinheiten entspricht, können als Nachweis für eine erfolgreiche intramolekulare Vernetzung eines Proteins mit Quartärstruktur angesehen werden. Mittels SDS-PAGE kann also einerseits die erfolgreiche intramolekulare Vernetzung eines aus mehreren Untereinheiten bestehenden Proteins und andererseits die Abwesenheit von Multimeren nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Abwesenheit von Multimeren nachzuweisen, bietet die Gel-permeationschromatographie, auch Gelausschluss-Chromatographie genannt, die beispielsweise mittels einer handelsüblichen HPLC-Apparatur durchgeführt werden kann. Proteinkomplexe, die ein Molekulargewicht aufweisen, das einem Multimeren des einzelnen Proteins entspricht, werden deutlich früher eluiert als einzeln vorliegende Proteine. Solche Multimere dürfen erfindungsgemäß nur zu einem niedrigen Prozentsatz vorliegen. Gemessen am Integral eines HPLC-Chromatogramms bedeutet dies, dass die Multimere nur bis zu einem Anteil von bis zu ca. 5 Prozent gemessen am eluierten Peak (Integral) des erfindungsgemäß nur intramolekular vernetzten Proteins betragen dürfen.

Als immunologische Bindepartner werden alle Moleküle bezeichnet, die unter den Bedingungen eines Immunoassays an andere Moleküle spezifisch binden können. Insbesondere sollen immunologische Bindepartner spezifisch den Analyten oder eine an den Analyten gebundene Substanz spezifisch binden können. Eine klassische Konstellation ist die spezifische Bindung eines Antikörpers an ein Antigen, beispielsweise die Bindung eines Anti-PSA-Antikörpers an PSA. Sowohl Antikörper als auch Antigen stellen immunologische

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 9 -

Bindepartner dar. Erfindungsgemäß werden die intramolekular kovalent vernetzten Proteine als immunologische Bindepartner in Immunoassays eingesetzt. Bevorzugt werden Antigene als immunologischen Bindepartner eingesetzt, wenn der Nachweis eines gegen diese Antigene gerichteten Antikörpers erfolgen soll. Bevorzugt sei hier der in einem unteren Abschnitt erläuterte Nachweis von Anti-HIV-RT-Antikörpern mittels erfindungsgemäß vernetzter HIV Reverse Transkriptase genannt.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein immunologisches Testverfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass als immunologischer Bindepartner ein intramolekular kovalent vernetztes Protein eingesetzt wird. Es hat sich gezeigt, dass intramolekular kovalent vernetzte Proteine, insbesondere solche, die natürlicherweise aus mehreren Untereinheiten bestehen, unter den Bedingungen eines Immunoassays deutlich stabiler sind als unvernetzte Proteine.

Die verschiedenen Formate und Ausführungsformen von Immunoassays sowie die verschiedenen Nachweisverfahren wie beispielsweise über enzymatische Reaktionen, fluoreszierende oder chemilumineszierende Substanzen sind dem Fachmann geläufig und brauchen daher hier nicht gesondert erläutert zu werden. Bevorzugt wird erfindungsgemäß ein heterogenes Testformat, bei dem nach erfolgter immunologischer Reaktion die Abtrennung der festen von der flüssigen Phase erfolgt, gewählt.

Bevorzugt handelt es sich bei dem Verfahren um einen Immunoassay zur Diagnose von HIV-Infektionen. Liegt bei einem Patienten eine HIV-Infektion vor, so kann diese anhand der gegen bestimmte Antigene des Virus gebildeten Antikörper in einer Blut-, Serum- oder Plasmaprobe nachgewiesen werden. Häufig lassen sich auch die Virus-Antigene des HIV selbst nachweisen wie beispielsweise das p24-Antigen von HIV-1. Hierzu ist der Einsatz spezifischer, gegen das HIV-Antigen – hier: gegen p24 gerichteter Antikörper erforderlich.

Oftmals findet der Nachweis einer HIV-Infektion in einer Probe als kombinierter Antigen- und Antikörper-Nachweis-Test statt. Solche Tests werden auch als Kombitests bezeichnet. In der WO 98/40744 wird ein solcher Kombitest offenbart. Hier werden sowohl HIV-Antigene, das heißt p24-Antigen von HIV-1 bzw. HIV-1 Subtyp O und das entsprechende p26-

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 10 -

Antigen von HIV-2 mittels spezifischer Antikörper detektiert als auch gegen HIV gerichtete Antikörper gegen Hüllproteine (env) des Erregers wie gp160, gp120, gp41 von HIV-1 und gp140, gp110, gp36 von HIV-2. Weiterhin werden in dem Kombitest gemäß WO 98/40744 auch Antikörper gegen HIV-RT nachgewiesen. Als immunologischer Bindepartner wird hierzu rekombinant hergestellte HIV-1 Reverse Transkriptase eingesetzt, die jedoch nicht intramolekular kovalent verknüpft ist.

Erfindungsgemäß wird intramolekular kovalent verknüpfte RT von HIV, insbesondere RT von HIV-1 bevorzugt in einem Kombitest zum Nachweis einer HIV-Infektion in einer Probe eingesetzt.

Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung ist intramolekular kovalent vernetzte Reverse Transkriptase von HIV, ein Enzym, das natürlicherweise in zwei Untereinheiten vorliegt. Die HIV RT liegt unter natürlichen Bedingungen als Heterodimer vor. HIV-1 RT besteht aus einer Untereinheit von 51 kDa und einer Untereinheit von 66 kDa. Die rekombinante Form ist beispielsweise über Expressionsklone verfügbar (beispielsweise von Müller et al. 1989 in J. Biol. Chem. 264/24, S. 13975-13978). Aufgrund eines Homologiegrades von etwa 60 %, abschnittsweise sogar 100 % auf Aminosäureebene kann die HIV-1 RT im allgemeinen dazu verwendet werden, auch gegen HIV-2 RT gerichtete Antikörper zu erkennen. Die Bezeichnung HIV beinhaltet HIV-1, HIV-2, sowie alle Subtypen und Untergruppierungen des Virus wie beispielsweise den HIV-1 Subtyp O. Bevorzugt wird HIV-1 RT in intramolekular kovalent vernetzter Form.

Es hat sich überraschender Weise gezeigt, dass durch die intramolekulare kovalente Vernetzung HIV RT unter den Bedingungen des Immunoassays deutlich stabiler ist als in unvernetzter Form. Auch Temperaturbelastungen, wie sie beispielsweise bei längerer oder unsachgemäßer Lagerung oder auch unter Assaybedingungen ausgesetzt ist, hält die erfindungsgemäße RT deutlich besser stand als in unvernetzter Form. Die erfindungsgemäße intramolekular kovalent vernetzte RT zeichnet sich dadurch aus, dass die beiden Untereinheiten miteinander kovalent verknüpft sind, wobei keine intermolekularen Verknüpfungen mehrerer Moleküle vorliegen. Der Nachweis, dass keine Oligomere mehrerer RT-Mole-

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 11 -

ktile vorliegen, kann beispielsweise mit der bereits erläuterten Gelausschluss-Chromatographie oder mittels SDS-PAGE erfolgen.

Als Vernetzungsreagenzien werden bevorzugt homo- und heterobifunktionelle Linker eingesetzt. Insbesondere werden bevorzugt MHS (3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester), EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid), DSS (Disuccinimidylsuberat), HSAB (N-Hydroxysuccinimidyl-4-Azidobenzoat), Sulfo-SANPAH (Sulfosuccinimidyl-6(4'-Amido-2'-Nitrophenylamido)hexanoat) zur intramolekularen Vernetzung der RT eingesetzt. Wie bereits erläutert, ist es wichtig, dass durch die chemische Reaktion der vernetzenden Linker nur eine intramolekulare Vernetzung des Proteins bzw. der beiden RT-Untereinheiten, nicht aber eine Vernetzung mehrerer RT-Moleküle untereinander erfolgt. Weiterhin wichtig ist es, dass durch die chemische Reaktion keine immunologisch relevanten Epitope zerstört werden.

Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung intramolekular vernetzter Reverse Transkriptase von HIV. Das Verfahren umfasst die Schritte

- Bereitstellen der RT in gelöster Form
- gegebenenfalls Umsetzen der RT mit einem Blockierungsreagenz für SH-Gruppen
- Dialyse des Ansatzes gegen wässrigen Puffer
- Umsetzen der aktivierten RT mit einem der Vernetzungsreagenzien

MHS (3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester), EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid), DSS (Disuccinimidylsuberat), HSAB (N-Hydroxysuccinimidyl-4-Azidobenzoat), Sulfo-SANPAH (Sulfosuccinimidyl-6(4'-Amido-2'-Nitrophenylamido)hexanoat)

- gegebenenfalls Stoppen der Reaktion
- Abtrennen der überschüssigen Reaktanten vom Reaktionsprodukt durch Dialyse
- gegebenenfalls Belichten des dialysierten Reaktionsprodukts mit UV-Licht.

Die bevorzugte Stöchiometrie von RT zu Vernetzungsreagenz beträgt etwa 1:1 bis 1:20.

Die Verhältnisse der Reaktanten werden so gewählt, dass keine oder nur eine vernachlässigbar geringe Oligomerisierung mehrerer RT-Moleküle untereinander stattfindet.

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 12 -

Figur 1 zeigt die Analyse der nach der Vernetzung erhaltenen Molekulargewichte der RT mittels Gelpermeationschromatographie.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

Beispiel 1

Intramolekulare Vernetzung von HIV-1 Reverser Transkriptase

a) Vernetzung mit MHS

HIV-1 Reverse Transkriptase (10 mg/ml) liegt gelöst vor in 50 mM Diethanolamin, pH 8,8, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA. Der pH-Wert wird durch Zugabe einer 1 M KH_2PO_4 -Lösung auf pH 6,4 eingestellt.

Durch Zugabe eines entsprechenden Aliquots einer 1 M Lösung NMM (N-Methylmaleinimid) in DMSO wird der Ansatz ad 5 mM NMM aufgestockt und anschließend für 60 min bei 25 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend erfolgt eine Dialyse gegen 50 mM Diethanolamin, pH 8,8, 25 mM NaCl.

Der pH-Wert wird nun durch Zugabe einer 1 M KH_2PO_4 -Lösung auf pH 7,0 korrigiert. Vom MHS (3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester) wird eine Stammlösung in DMSO hergestellt (5 mg/ml). Die einer Angebotsstöchiometrie von 1:8 (mol Reverse Transkriptase / mol MHS) entsprechende Menge dieser Lösung wird zum Ansatz hinzugegeben, dieser dann wiederum für 60 min bei 25 °C unter Rühren inkubiert. Die Reaktion wird abgestoppt durch Aufstocken des Reaktionsgemisches ad 10 mM Lysin unter einer weiteren Inkubation für 30 min. Die Abtrennung überschüssiger Reaktanten erfolgt durch Dialyse gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA.

Nach der Dialyse wird der pH-Wert durch Zugabe eines Aliquots einer 1 M K_2HPO_4 -Lösung auf pH 7,4 eingestellt, der Ansatz wird für 4 h bei 25 °C unter Rühren weiterinkubiert, bevor Cystein ad 2 mM zugeben wird. Nach weiteren 30 min Inkubation wird die

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 13 -

Reaktion durch Zugabe von NMM (ad 5 mM) abgestoppt. Der Ansatz wird dialysiert gegen 50 mM Diethanolamin, pH 8,8, 25 mM NaCl.

b) Vernetzung mit EDC

HIV-1 Reverse Transkriptase (10 mg/ml) liegt gelöst vor in 50 mM Diethanolamin, pH 8,8, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA. Der pH-Wert wird durch Zugabe einer 1 M KH_2PO_4 -Lösung auf pH 6,4 eingestellt.

Durch Zugabe eines entsprechenden Aliquots einer 1 M Lösung NMM (N-Methylmaleinimid) in DMSO wird der Ansatz ad 5 mM NMM aufgestockt und anschließend für 60 min bei 25 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend erfolgt eine Dialyse gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, 50 mM NaCl.

Vom EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid) wird eine Stammlösung in DMSO hergestellt (2 mg/ml). Die einer Angebotsstöchiometrie von 1:10 (mol Reverse Transkriptase / mol EDC) entsprechende Menge dieser Lösung wird zum Ansatz hinzugegeben, dieser dann wiederum für 60 min bei 25 °C unter Rühren inkubiert. Die Abtrennung überschüssiger Reaktanten erfolgt durch Dialyse gegen 25 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, 50 mM NaCl.

c) Vernetzung mit DSS

HIV-1 Reverse Transkriptase (10 mg/ml) liegt gelöst vor in 50 mM Diethanolamin, pH 8,8, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA. Der pH-Wert wird durch Zugabe einer 1 M KH_2PO_4 -Lösung auf pH 6,4 eingestellt.

Durch Zugabe eines entsprechenden Aliquots einer 1 M Lösung NMM (N-Methylmaleinimid) in DMSO wird der Ansatz ad 5 mM NMM aufgestockt und anschließend für

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 14 -

60 min bei 25 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend erfolgt eine Dialyse gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0, 25 mM NaCl.

Vom DSS (Disuccinimidylsuberat) wird eine Stammlösung in DMSO hergestellt (2 mg/ml). Die einer Angebotsstöchiometrie von 1:10 (mol Rev. Transkriptase / mol DSS) entsprechende Menge dieser Lösung wird zum Ansatz hinzugegeben, dieser dann wiederum für 60 min bei 25 °C unter Rühren inkubiert. Die Abtrennung überschüssiger Reaktanten erfolgt durch Dialyse gegen 25 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, 50 mM NaCl.

d) Vernetzung mit HSAB

HIV-1 Reverse Transkriptase (10 mg/ml) liegt gelöst vor in 50 mM Diethanolamin, pH 8,8, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA. Der pH-Wert wird durch Zugabe einer 1 M KH_2PO_4 -Lösung auf pH 6,4 eingestellt.

Durch Zugabe eines entsprechenden Aliquots einer 1 M Lösung NMM (N-Methylmaleinimid) in DMSO wird der Ansatz ad 5 mM NMM aufgestockt und anschließend für 60 min bei 25 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend erfolgt eine Dialyse gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0, 25 mM NaCl.

Vom HSAB (N-Hydroxysuccinimidyl-4-Azidobenzoat) wird eine Stammlösung in DMSO hergestellt (2 mg/ml). Die einer Angebotsstöchiometrie von 1:5 (mol Rev. Transkriptase / mol HSAB) entsprechende Menge dieser Lösung wird zum Ansatz hinzugegeben, dieser dann wiederum für 60 min bei 25 °C unter Rühren inkubiert. Die Abtrennung überschüssiger Reaktanten erfolgt durch Dialyse gegen 25 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, 50 mM NaCl.

Der Ansatz wird anschließend für 7 min mit einer UV-Lampe belichtet.

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 15 -

e) Vernetzung mit Sulfo-SANPAH

HIV-1 Reverse Transkriptase (10 mg/ml) liegt gelöst vor in 50 mM Diethanolamin, pH 8,8, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA. Der pH-Wert wird durch Zugabe einer 1 M KH_2PO_4 -Lösung auf pH 6,4 eingestellt.

Durch Zugabe eines entsprechenden Aliquots einer 1 M Lösung NMM (N-Methylmaleinimid) in DMSO wird der Ansatz ad 5 mM NMM aufgestockt und anschließend für 60 min bei 25 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend erfolgt eine Dialyse gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0, 25 mM NaCl.

Vom Sulfo-SANPAH (Sulfosuccinimidyl-6(4'-Amido-2'-Nitrophenylamido)hexanoat) wird eine Stammlösung in DMSO hergestellt (4 mg/ml). Die einer Angebotsstöchiometrie von 1:5 (mol Rev. Transkriptase / mol Sulfo-SANPAH) entsprechende Menge dieser Lösung wird zum Ansatz hinzugegeben, dieser dann wiederum für 60 min bei 25 °C unter Rühren inkubiert. Die Abtrennung überschüssiger Reaktanten erfolgt durch Dialyse gegen 25 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, 50 mM NaCl.

Der Ansatz wird anschließend für 7 min mit einer UV-Lampe belichtet.

Beispiel 2**Nachweis der ausschließlich intramolekularen Vernetzung von HIV-1 Reverser Transkriptase****a) SDS-Gelelektrophorese**

Aliquots der intramolekular vernetzten HIV-1 Reversen Transkriptase wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS an einer Phast-Gel-Apparatur (Fa. Pharmacia™) nach einer Standardvorschrift des Herstellers analysiert.

Die nicht vernetzte Kontrolle weist ausschließlich Banden mit Molekulargewichten von 66 kD und 51 kD auf, die den Untereinheiten der Reversen Transkriptase entsprechen. Intra-

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 16 -

molekular vernetzte Reverse Transkriptase lässt Banden mit Molekulargewichten von 110-120 kD erkennen, die eine erfolgreiche Vernetzung der Untereinheiten untereinander beweisen. Größere Proteinkomplexe sind nicht nachweisbar, d.h. mit den erfindungsgemäßen Vernetzungsverfahren kommt es nicht zu einer intermolekularen Verbrückung mehrerer Moleküle Reverser Transkriptase.

b) Analytische Gelpermeationschromatographie

Ein Aliquot der intramolekular vernetzten HIV-1 Reversen Transkriptase wurden einer Gelpermeationschromatographie an einer TSK 3000 Säule (Toso HaasTM) mittels einer handelsüblichen HPLC-Apparatur nach einer Standardvorschrift des Herstellers analysiert.

Die intramolekular vernetzte Reverse Transkriptase eluiert von der Säule mit einer Retentionszeit, die globulären Proteinen mit Molekulargewichten von 100-130 kD entspricht (hier 7,5 min). Größere Proteinkomplexe, die eine kürzere Retentionszeit im Chromatogramm aufweisen würden, sind nicht nachweisbar, d.h. mit den erfindungsgemäßen Vernetzungsverfahren kommt es nicht zu einer intermolekularen Verbrückung mehrerer Moleküle Reverser Transkriptase zu oligomeren oder polymeren Strukturen. Das Chromatogramm ist in Figur 1 dargestellt.

Beispiel 3

Derivatisierung von intramolekular vernetzter HIV-1 Reverser Transkriptase am Beispiel der Biotinmarkierung

Intramolekular vernetzte HIV-1 Reverse Transkriptase (siehe Beispiel 1) liegt in Diethanolamin oder Kaliumphosphatpuffer vor. Die unvernetzte RT als Vergleich wird mit N-Methylmaleimid behandelt und gegen Diethanolamin dialysiert. Sofern erforderlich wird in allen RT-Ansätzen durch Zugabe von NaOH ein pH-Wert von pH 8,6 – 8,8 eingestellt. Vom Biotin-DDS (Biotinyl-diaminodioxaoctan-disuccinimidylsberat) wird eine Stammlösung in DMSO hergestellt (6 mg/ml). Die einer Angebotsstöchiometrie von 1:4

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 17 -

(mol Rev. Transkriptase / mol Biotin-DDS) entsprechende Menge dieser Lösung wird zum Ansatz hinzugegeben, dieser dann wiederum für 60 min bei 25 °C unter Rühren inkubiert. Die Reaktion wird abgestoppt durch Aufstocken des Reaktionsgemisches ad 10 mM Lysin unter einer weiteren Inkubation für 30 min. Die Abtrennung überschüssiger Reaktanten erfolgt durch Dialyse gegen 50 mM Diethanolamin, pH 8.8, 25 mM NaCl.

Beispiel 4

Stabilitätsprüfung im Funktionstest

Zur Überprüfung der Stabilität der HIV-1 Reversen Transkriptase wurde ein Immunoassay am Elecsys® der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim durchgeführt. Vermessen wurden neben einer Negativkontrolle (NK), die keine Anti-RT-Antikörper enthält und einer Positivkontrolle (PK), die Anti-RT-Antikörper enthält, jeweils zwei HIV positive Humansenen mit Anti-RT-Reaktivität.

Dafür wurden 45 µl Probe zusammen mit 55µl Reagenz 1 (biotinylierte RT) und 55 µl Reagenz 2 (Ruthenium-markierte RT) für 9 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Streptavidin-beschichtete Magnetbeads zugesetzt und die Mischung weitere 9 min inkubiert. Danach erfolgte ein magnetisches Capturing der Beads und die quantitative Erfassung des Elektrochemilumineszenzsignals.

Um die Stabilität der biotinylierten Reversen Transkriptase in erfindungsgemäß vernetzter und in unvernetzter Form vergleichend zu überprüfen, wurde vor Durchführung des Tests das Reagenz 1 (biotinylierte RT) die unten angegebene Zeit 18 Stunden lang bei 42 °C belastet. Als Bezugsgröße diente ein gleichzeitig angesetztes und bei 4 °C gelagertes Reagenz 1. Alle anderen Reagenzien wurden für die Versuche jeweils frisch angesetzt.

Die Auswertung erfolgt über die Signaldynamik, das heißt man ermittelt den Quotienten aus dem erhaltenen Signal und der jeweiligen Negativkontrolle. Je größer der Wert für die Signaldynamik ist, desto besser kann eine Differenzierung zwischen HIV-Antikörper-positiven und -negativen Proben erfolgen. Eine große Signaldynamik ist also erstrebenswert.

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 18 -

Für den Vergleich von belasteter RT zu unbelasteter RT wurden die jeweiligen Werte in Relation zueinander gesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

rekombinante HIV-1-RT-Bi(DDS); nicht vernetzt						
Proben	unbelastet		Belastung 18 h 42 °C		Vergleich belastet/unbelastet	
	Counts	Signal- dynamik	Counts	Signal- dynamik	Counts	Signal- dynamik
Negativkontrolle	1763	1,0	1049	1,0	60%	100%
Positivkontrolle	16848	9,6	1480	1,4	9%	15%
HIV-Serum 1	6209	3,5	1054	1,0	17%	29%
HIV-Serum 2	5162	2,9	917	0,9	18%	30%
HIV-Serum 3	5832	3,3	1150	1,1	20%	33%
HIV-Serum 4	111444	63,2	6267	6,0	6%	9%
rekombinante HIV-1-RT(MHS)- Bi(DDS); erfindungsgemäß vernetzt						
Proben	unbelastet		Belastung 18 h 42 °C		Vergleich belastet/unbelastet	
	Counts	Signal- dynamik	Counts	Signal- dynamik	Counts	Signal- dynamik
Negativkontrolle	1304	1,0	1206	1,0	92%	100%
Positivkontrolle	73335	56,2	77611	64,4	106%	114%
HIV-Serum 5	8476	6,5	7092	5,9	84%	90%
HIV-Serum 6	14504	11,1	10615	8,8	73%	79%
HIV-Serum 7	69459	53,3	59347	49,2	85%	92%
HIV-Serum 8	168674	129,4	168304	139,6	100%	108%

Es zeigt sich, dass auch nach mehrstündiger Belastung bei einer erhöhten Temperatur im Vergleich zu unbelasteter RT die Signaldynamik im Immunoassay mit erfindungsgemäß vernetzter RT noch mindestens 79%, bevorzugt mindestens 90 % beträgt, während die Signaldynamik bezogen auf die Negativkontrolle bei unvernetzter RT nur bei höchstens etwa 30 % liegt, zum Teil bei deutlich unter 30 % oder sogar unter 20 %. Die Signale fallen bei Verwendung unvernetzter RT auf das Niveau von Negativseren ab, während die erfindungsgemäß vernetzte RT seine immunologische Funktion beibehält. Die von den Probenantikörpern erkannten Epitope der RT bleiben also trotz Temperaturbelastung weitgehend erhalten. Dies bedeutet, dass die erfindungsgemäß vernetzte RT deutlich stabiler ist als die unvernetzte.

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 19 -

Ansprüche

1. Verwendung intramolekular kovalent vernetzter Proteine als immunologische Bindepartner in immunologischen Testverfahren.
2. Verwendung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass ein Protein eingesetzt wird, das aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist.
3. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass als Protein eine DNA- oder RNA-Polymerase eingesetzt wird.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass als Protein Reverse Transkriptase von HIV eingesetzt wird.
5. Immunologisches Testverfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass als immunologischer Bindepartner ein intramolekular kovalent vernetztes Protein gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 eingesetzt wird.
6. Immunologisches Testverfahren nach Anspruch 5 dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Verfahren zur Diagnose von HIV-Infektionen handelt.
7. Intramolekular kovalent vernetzte Reverse Transkriptase (RT) von HIV, dadurch gekennzeichnet, dass ausschließlich die beiden Untereinheiten der RT miteinander kovalent vernetzt sind, wobei keine intermolekularen Verknüpfungen mehrerer RT-Moleküle miteinander vorliegen.
8. Intramolekular kovalent vernetzte Reverse Transkriptase von HIV nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Vernetzungsreagenz MHS (3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester), EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid), DSS (Disuccinimidylsuberat), HSAB (N-Hydroxysuccinimidyl-4-Azidobenzoat), Sulfo-SANPAH (Sulfosuccinimidyl-6(4'-Amido-2'-Nitrophenylamido)hexanoat) ein-

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

- 20 -

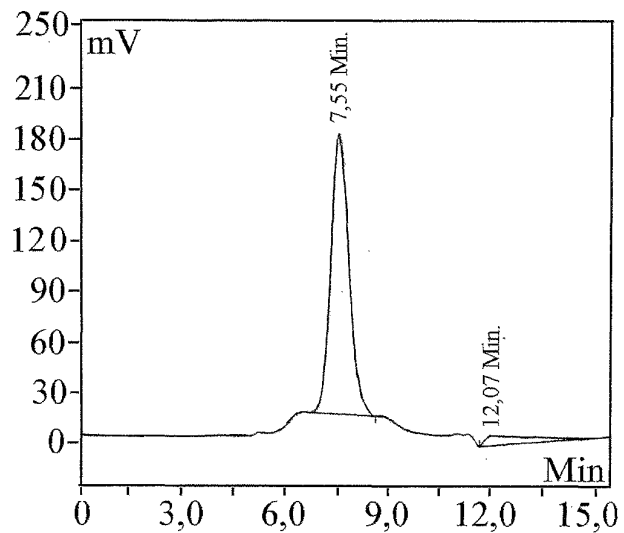
gesetzt wird.

9. Verfahren zur Herstellung intramolekular vernetzter Reverser Transkriptase von HIV gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8 umfassend die Schritte
- Bereitstellen der RT in gelöster Form
 - gegebenenfalls Umsetzen der RT mit einem Blockierungsreagenz für SH-Gruppen
 - Dialyse des Ansatzes gegen wässrigen Puffer
 - Umsetzen der aktivierten RT mit einem der Vernetzungsreagenzien
MHS (3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester), EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid), DSS (Disuccinimidylsüberat), HSAB (N-Hydroxysuccinimidyl-4-Azidobenzoat), Sulfo-SANPAH (Sulfosuccinimidyl-6(4'-Amido-2'-Nitrophenylamido)hexanoat)
 - gegebenenfalls Stoppen der Reaktion
 - Abtrennen der überschüssigen Reaktanten vom Reaktionsprodukt durch Dialyse
 - gegebenenfalls Belichten des dialysierten Reaktionsprodukts mit UV-Licht.

WO 02/44731

PCT/EP01/13780

Fig. 1/1



Peak-No.:	Ret. Time [Min.]	rel. Area [%]
1	7,55	91,66
2	12,07	8,34

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Juni 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/044731 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/569, 33/53, 33/531, 33/543 CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/13780
- (22) Internationales Anmeldedatum: 27. November 2001 (27.11.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 59 720.3 30. November 2000 (30.11.2000) DE
- (71) Anmelder (nur für DE): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim (DE).
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von DE, US): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CII]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): UPMEIER, Barbara [DE/DE]; Egerländerstrasse 12 C, 82393 Iffeldorf (DE); SCHLIEPER, Dittmar [DE/DE]; Egerländerstrasse 12 C, 82393 Iffeldorf (DE); DÖNTE, Frederic [DE/DE]; In der Au 10, 82377 Penzberg (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Erklärungen gemäß Regel 4.17:**
hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für den folgenden Bestimmungsstaat
— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Veröffentlicht:**
mit internationalem Recherchenbericht
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 13. Februar 2003
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF INTRAMOLECULARLY, COVALENTLY CROSS-LINKED PROTEINS AS BINDING PARTNERS IN IMMUNOASSAYS

A3 (54) Bezeichnung: VERWENDUNG INTRAMOLEKULAR KOVALENT VERNETZTER PROTEINE ALS BINDEPARTNER IN IMMUNOASSAYS

A3 (57) Abstract: The invention relates to the use of intramolecularly, covalently cross-linked proteins, to the use of covalently cross-linked reverse transcriptases of HIV as immunological binding partners in immunoassays, to immunological testing methods for determining an analyte in a sample, in which intramolecularly, covalently cross-linked proteins are used as binding partners, to intramolecularly, covalently cross-linked reverse transcriptases of HIV, and to a method for producing these reverse transcriptases.

A3 (57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung intramolekular kovalent vernetzter Proteine, die Verwendung kovalent vernetzter Reverse Transkriptase von HIV als immunologische Bindepartner in Immunoassays, immunologische Testverfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, in dem intramolekular kovalent vernetzte Proteine als Bindepartner eingesetzt werden, intramolekular kovalent vernetzte Reverse Transkriptase von HIV, sowie ein Verfahren zur Herstellung dieser Reverse Transkriptase.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 01/13780
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/569 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEBYSER ZEGER ET AL: "Chemical crosslinking of the subunits of HIV-1 reverse transcriptase." PROTEIN SCIENCE, vol. 5, no. 2, 1996, pages 278-286, XP009000136 ISSN: 0961-8368	7-9
A	page 279, col. 1, lines 41 - 48, page 281, col. 2, line 5 - page 282, col. 1, line 6, fig: 1, 2, 4, 5 --- -/--	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 September 2002		Date of mailing of the international search report 24/10/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patantaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2340, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoesel, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 01/13780

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MUELLER B ET AL: "CO-EXPRESSION OF THE SUBUNITS OF THE HETERODIMER OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE IN ESCHERICHIA COLI" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Vol. 264, no. 24, 25 August 1989 (1989-08-25), pages 13975-13978, XP001037290 ISSN: 0021-9258 page 13977, col.2, Z.2-5	7-9
A	---	1-6
X	ISHIKAWA SETSUKO ET AL: "Whole saliva dried on filter paper for diagnosis of HIV-1 infection by detection of antibody IgG to HIV-1 with ultrasensitive enzyme immunoassay using recombinant reverse transcriptase as antigen." JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS, vol. 10, no. 1, 1996, pages 35-41, XP009000109 ISSN: 0887-8013 page 36, fig. 1 and 2	1,2,5,6
A	---	3,4,7-9
L	JANIS KUBY: "IMMUNOLOGY" 1994, W.H. FREEMAN & COMPANY, NEW YORK XP002213873 ISBN: 0-7167-2643-2 page 113, fig.5-4	1,2,5,6
X	KUO K-W ET AL: "IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ALPHA BUNGAROTOXIN DETOXIFIED WITH GLUTARALDEHYDE" KAOHSIUNG JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES, vol. 6, no. 8, 1990, pages 408-417, XP009000124 ISSN: 0257-5655 page 409, col.1, paragr. 2, page 413, col 1, line 4 - page 14, col. 1, lines 1 - 18, fig. 5 and 6	1,2,5
A	---	3,4,6-9
A	US 5 258 501 A (KOZULIC BRANKO ET AL) 2 November 1993 (1993-11-02) col.1, lines 10-44, example 1 and 5	1-9
A	DE 26 15 349 A (SNAMPROGETTI) 14 October 1976 (1976-10-14) the whole document	1-9

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 01/13780

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5258501	A	02-11-1993 GB 2225324 A	30-05-1990
DE 2615349	A	14-10-1976 IT 1034957 B	10-10-1979
		AU 508947 B2	17-04-1980
		AU 1255176 A	06-10-1977
		BE 840450 A1	07-10-1976
		CH 626402 A5	13-11-1981
		CS 194238 B2	30-11-1979
		DD 123608 A5	05-01-1977
		DE 2615349 A1	14-10-1976
		DK 145676 A	10-10-1976
		FR 2366303 A1	28-04-1978
		GB 1546237 A	23-05-1979
		HU 175295 B	28-06-1980
		IL 49356 A	31-03-1980
		JP 51123884 A	28-10-1976
		LU 74712 A1	11-11-1976
		NL 7603740 A	12-10-1976
		NO 761187 A ,B,	12-10-1976
		SE 7604136 A	24-10-1976
		TR 18669 A	23-06-1977
		YU 90576 A1	30-04-1983
		ZA 7601886 A	30-03-1977

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/13780
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/569 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Forscherteil der Mindestprüfstaffel (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Forscherteile aber nicht zum Mindestprüfstaffel gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, MPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DEBYSER ZEGER ET AL: "Chemical crosslinking of the subunits of HIV-1 reverse transcriptase." PROTEIN SCIENCE, Bd. 5, Nr. 2, 1996, Seiten 278-286, XP009000136 ISSN: 0961-8368	7-9
A	S. 279, Sp. 1, Z. 41 - 48, S. 281, Sp. 2, Z. 5 - S. 282, Sp. 1, Z. 6, Fig: 1, 2, 4, 5 -/-	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angegeben) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
18. September 2002	24/10/2002	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5816 Patentstr. 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Beauftragter Hoesel, H	

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/13780
C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Dat. Anspruch Nr.
X	MUELLER B ET AL: "CO-EXPRESSION OF THE SUBUNITS OF THE HETERODIMER OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE IN ESCHERICHIA COLI" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 264, Nr. 24, 25. August 1989 (1989-08-25), Seiten 13975-13978, XP001037290 ISSN: 0021-9258 S. 13977, Sp. 2, Z. 2 - 5	7-9
A	---	1-6
X	ISHIKAWA SETSUKO ET AL: "Whole saliva dried on filter paper for diagnosis of HIV-1 infection by detection of antibody IgG to HIV-1 with ultrasensitive enzyme immunoassay using recombinant reverse transcriptase as antigen." JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS, Bd. 10, Nr. 1, 1996, Seiten 35-41, XP009000109 ISSN: 0887-8013 S. 36, Fig. 1 und 2	1,2,5,6
A	---	3,4,7-9
L	JANIS KUBY: "IMMUNOLOGY" 1994, W.H. FREEMAN & COMPANY, NEW YORK XP002213873 ISBN: 0-7167-2643-2 S. 113, Fig. 5-4	1,2,5,6
X	KUO K-W ET AL: "IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ALPHA BUNGAROTOXIN DETOXIFIED WITH GLUTARALDEHYDE" KAOHSIUNG JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES, Bd. 6, Nr. 8, 1990, Seiten 408-417, XP009000124 ISSN: 0257-5655 S. 409, Sp.1, 2. Absatz, S. 413, Sp. 1, Z. 4 - S. 14, Sp. 1, Z. 1 - 18, Fig. 5 und 6	1,2,5
A	---	3,4,6-9
A	US 5 258 501 A (KOZULIC BRANKO ET AL) 2. November 1993 (1993-11-02) Sp. 1, Z. 10 - 44, Beispiele 1 und 5	1-9
A	DE 26 15 349 A (SNAMPROGETTI) 14. Oktober 1976 (1976-10-14) das ganze Dokument	1-9

Formblatt PCT/ISA/E10 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Abkürzungszeichen:

PCT/EP 01/13780

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
US 5258501	A	02-11-1993	GB 2225324 A	30-05-1990
DE 2615349	A	14-10-1976	IT 1034957 B	10-10-1979
			AU 508947 B2	17-04-1980
			AU 1255176 A	06-10-1977
			BE 840450 A1	07-10-1976
			CH 626402 A5	13-11-1981
			CS 194238 B2	30-11-1979
			DD 123608 A5	05-01-1977
			DE 2615349 A1	14-10-1976
			DK 145676 A	10-10-1976
			FR 2366303 A1	28-04-1978
			GB 1546237 A	23-05-1979
			HU 175295 B	28-06-1980
			IL 49356 A	31-03-1980
			JP 51123884 A	28-10-1976
			LU 74712 A1	11-11-1976
			NL 7603740 A	12-10-1976
			NO 761187 A ,B,	12-10-1976
			SE 7604136 A	24-10-1976
			TR 18669 A	23-06-1977
			YU 90576 A1	30-04-1983
			ZA 7601886 A	30-03-1977

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,R O,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 シュリーパー,ディットマー

ドイツ連邦共和国 イッフェルドルフ 82393 エーゲルランダーシュトラッセ 12 ツェー

(72)発明者 ドニー,フレデリック

ドイツ連邦共和国 ペンツベルク 82377 インデルアウ 10

Fターム(参考) 4B050 CC02 CC05 DD01 FF05C FF20C GG08 LL03

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004514908A5	公开(公告)日	2005-04-14
申请号	JP2002546222	申请日	2001-11-27
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ウプマイヤーバルバラ シュリーパーディットマー ドニーフレーデリック		
发明人	ウプマイヤー,バルバラ シュリーパー,ディットマー ドニー,フレーデリック		
IPC分类号	C12N9/12 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/5306 G01N33/54393 G01N33/56988		
FI分类号	G01N33/53.D C12N9/12 G01N33/543.545.Z		
F-TERM分类号	4B050/CC02 4B050/CC05 4B050/DD01 4B050/FF05C 4B050/FF20C 4B050/GG08 4B050/LL03		
优先权	10059720 2000-11-30 DE		
其他公开文献	JP2004514908A JP3759594B2		

摘要(译)

本发明涉及分子内共价交联蛋白的用途，HIV共价交联逆转录酶在免疫测定中作为免疫结合配偶体的用途，用于测量样品中分析物的免疫学测试方法(分子内共价交联蛋白用作结合配偶体)，HIV的分子内共价交联逆转录酶，以及制备这些逆转录酶的方法。