

61.894/SZE

KIVONAT

73804

Immunvizsgálat oldható fibrinpolimerek meghatározására

A találmány tárgya eljárás monoklonális ellenanyagok előállítására. Az eljárás során immunizált, mikroorganizmus-mentes állatot használnak. A találmány tárgya továbbá eljárás ezeknek a monoklonális ellenanyagoknak az alkalmazására, valamint egy immunizált mikroorganizmus-mentes állatból származó poliklonális ellenanyagok alkalmazására *in vitro* és *in vivo* klinikai diagnosztikumokban és gyógyszerekben. A találmány tárgya továbbá egy fibrinspecifikus monoklonális ellenanyag.

Fibrin

P9503875

S.B.G. & K.

Nemzetközi
Szabadalmi IrodaH-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

61.894/SZE

A

Immunvizsgálat oldható fibrinpolimerek meghatározására

A jelen találmány tárgya eljárás monoklonális ellenanyagok előállítására. Az eljárás során immunizált, mikroorganizmus-mentes állatot használunk. A találmány tárgya továbbá eljárás ezeknek a monoklonális ellenanyagoknak az alkalmazására, valamint egy immunizált mikroorganizmus-mentes állatból származó poliklonális ellenanyagok alkalmazására *in vitro* és *in vivo* klinikai diagnosztikumokban és gyógyszerekben. A találmány tárgya továbbá egy fibrinspecifikus monoklonális ellenanyag.

Általában Kohlernek és Milsteinnek tulajdonítják azt, hogy ők tervezték meg azokat a technikákat, amelyek sikeresen eredményezték az első monoklonális ellenanyagot termelő hibridómák létrejöttét [G. Kohler és C. Milstein: Nature 256, 495-497 (1975); Eur. J. Immunol. 6, 511-519 (1976)]. Ellenanyagot termelő sejteket (lép B-limfociták) mielóma sejtekkel fúzionáltatva (a csontvelő primer tumorok rosszindulatú sejtjei) hibrid sejtvonalat hoztak létre, amely egyetlen fúzionált sejthibridből származik (ezt nevezik hibridómának vagy klónnak). A hibridóma mind a limfocitáktól mind a mielóma sejtvonaltól örökölt bizonyos jellemzőket. A limfocitákhoz hasonlóan a hibridóma egyetlen típusú immunglobulint szekretált; emellett, a mielóma sejtekhez hasonlóan, a hibridómának rendelkezik a végtelen számú sejtosztódásra való képességgel. Ennek a két tulajdonságnak a kombinációja jelentős előnyöket biztosít a szokványos antiszérumokkal szemben.

A vakcinált állatokból származó antiszérumok poliklonális ellenanyagok változó keverékei, amelyeket soha nem lehet pontosan reprodukálni. A monoklonális ellenanyagok nagyon specifikus, egyetlen típusú immunglobulinok. Az egyetlen

típusba tartozó immunglobulinokat az antigénen levő egyik, és kizárólag egyetlen antigén determinánssra vagy epitopra specifikus hibridóma szekretálja. Az antigén egy komplex molekula, amely több antigén determinánssal rendelkezik. Például, ha az antigén egy fehérje, akkor egy antigén determináns lehet a számos peptidszekvencia egyike [általában 6-7 aminosav hosszúságú; M.Z. Atassi: Mol. Cell. Biochem. 32, 21-43 (1980)], a teljes fehérjemolekulán belül. Ennélfogva az egyetlen antigén ellen készült monoklonális ellenanyagok eltérhetnek egymástól, attól függően, hogy melyik determináns indukálja a képződésüket; de bármely adott hibridóma esetén az összes termelt ellenanyag azonos. Emellett, a hibridóma sejtvonalat könnyen lehet *in vivo* vagy *in vitro* szaporítani, és a monoklonális ellenanyagokat magas koncentrációban eredményezi.

Egy monoklonális ellenanyag próbaként használható az antigénje azonosítására. Tehát a monoklonális ellenanyagokat használják az *in vitro* diagnosztikumban, azaz például a radioimmúnesszében és az enzimhez kötött immúnesszében (ELISA), valamint az *in vivo* diagnosztikumoknál, azaz például az egy radioaktív izotóppal jelzett monoklonális ellenanyaggal végzett *in vivo* képalkotásnál. Emellett egy monoklonális ellenanyag használható egy gyógyszer bejuttatásánál vivőanyagként, az ellenanyag antigénjét megcélozva.

Azonban, mielőtt egy monoklonális ellenanyagot használhatnánk erre a célra, az lényeges, hogy az ellenanyag képes legyen a számunkra érdekes, azaz megcélzott antigénhez kötődni. Ezt az eljárást úgy hajtjuk végre, hogy átvizsgáljuk a keletkezett hibridómákat, hogy meghatározzuk, melyik hibridóma, ha van egyáltalán ilyen, termeli azt a monoklonális ellenanyagot, amely képes a megcélzott antigénhez kötődni. Ez a szűrővizsgálat nagyon munkaigényes lehet, mivel például akár több ezer monoklonális ellenanyagot is át kell vizsgálni, mielőtt sikerül azt a hibridómát azonosítani, amely képes a megcélzott antigénhez kötődni. Ennek

megfelelően szükség van egy olyan eljárásra monoklonális ellenanyagok előállítására, amely növeli annak a valószínűségét, hogy a hibridóma ellenanyagot termel a megcélzott antigénnel szemben.

A jelen találmány tárgya eljárás monoklonális ellenanyagok előállítására egy antigénnel szemben, azzal jellemezve, hogy:

(a) egy mikroorganizmus-mentes állatot immunizálunk az említett antigénnel, hogy lehetővé tegyük, hogy az ellenanyagot termelő sejtek az említett antigén elleni ellenanyagot termeljék,

(b) az említett ellenanyag-termelő sejteknek legalább egy részét eltávolítjuk az említett mikroorganizmus-mentes állatból,

(c) hibridómát hozunk létre, oly módon, hogy az egyik említett ellenanyag-termelő sejtet egy immortalizáló sejtrel fúzionáltatjuk, mikoris az említett hibridóma képes monoklonális ellenanyagot termelni az említett antigénnel szemben,

(d) az említett hibridómát szaporítjuk, és

(e) az említett hibridóma által termelt monoklonális ellenanyagokat kinyerjük.

A jelen találmány tárgya továbbá eljárás egy monoklonális ellenanyag vagy egy mikroorganizmus-mentes állatból származó poliklonális ellenanyag felhasználására. A jelen találmány tárgya továbbá egy fibrin-specifikus monoklonális ellenanyag, valamint eljárás az ilyen monoklonális ellenanyag alkalmazására.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrákat.

1(A). ábra

Az MH1 és a DesAABB fibrin monomer immunreaktivitásának meghatározása affinitáskromatográfiával.

1(B). ábra

Kontroll kísérlet, a Sepharose DesAABB fibrin monomer mátrix kötési kapacitásának meghatározására, a fibrinogén-specifikus 45J ellenanyagot használva.

2. ábra

A keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerek és keresztkötéses DesAABB fibrin polimerek immunreaktivitása az oldható DesAABB fibrin polimerek *in vitro* vizsgálatában, MH1 felhasználásával.

3. ábra

A DesAA fibrin előállítás plazma fibrinogén batroxobin-es kezelésével.

4. ábra

Oldható DesAABB fibrin polimerek immunreaktivitása az oldható DesAABB fibrin polimerek *in vitro* vizsgálatában, MH1 felhasználásával.

5. ábra

Az MH1 ellenanyag immunreaktivitása aktivált XIII-as faktorról (XIIIa faktor) kezelt fibrinogénnel.

6. ábra

Az oldható DesAABB fibrin polimer *in vitro* képződésének mérése, az oldható fibrin MH1 vizsgálat alkalmazásával.

7. ábra

Az oldható fibrin plazmából való tisztításának demonstrálása, Sepharose-MH1 oszlop felhasználásával.

8. ábra

Az oldható DesAABB fibrin polimerek mérése mellkasi fájdalomra panaszkodó és bizonyítottan szívinfarktuszban szenvedő betegek vérében.

A jelen találmány tárgya mikroorganizmus-mentes állatok alkalmazása monoklonális ellenanyagok előállításában. A mikroorganizmus-mentes állatokat először a XIX. század vége felé fejlesztették ki, és kiterjedten alkalmazzák azóta.

Egy mikroorganizmus-mentes állat egy olyan gnotobióta, amely mentes az élet minden kimutatható, asszociált formájától, beleértve a baktériumokat, vírusokat, gombákat, protozoákat és más szaprofita vagy parazita formákat. A gnotobióta egy olyan állat vagy törzs, amely aszeptikus császármetszésből vagy tojások aszeptikus keltetéséből származik, steril technikákkal nevelik fel és folyamatosan steril körülmények között, izolátorban tartják, és amelyben bármely asszociált flórát és faunát, ha egyáltalán jelen van, a jelenleg elfogadott módszerekkel teljesen meg lehet határozni. (Meg kell jegyezni, hogy minden egér hordoz egy látens leukemogén vírust, és emiatt egy egeret, amely mikroorganizmus-mentes, de benne van az említett leukemogén vírus, a jelen találmány szempontjából mikroorganizmus-mentes állatnak kell tekinteni.)

Egy mikroorganizmus-mentes rendszer lényege a nemkívánt mikroorganizmusok bejutásának megakadályozása. A műanyagból, fémből, gumiból és üvegből levő fizikai korlátok mellett, amelyek között tartjuk az állatokat, a rendszernek működési, operációs korlátokra is szüksége van, azaz a levegő szűrésére, az étel és a víz sterilizálására, kesztyűvel való manipulálásra, ami a korlárendszer integráns részér képezi. Emellett az egyéb anyagoknak az izolátorba való bejuttatását is steril körülmények között kell végezni.

Az a vélemény alakult ki, hogy bármely mikroorganizmus-mentes állat használható a jelen találmányban. A legáltalánosabb mikroorganizmus-mentes állatok közé tartozik az egér, a sertés, a patkány, a nyúl, a tengerimalac, a kecske, a birka, a főemlősök és a szárnyasok, de az egeret részesítjük előnyben, főleg a Balb/c egeret.

Számos publikáció foglalkozik a mikroorganizmus-mentes állatok létrehozásával, gondozásával és fenntartásával [Wostmann, B.S. szerk.: Gnotobiotics: Standards and Guidelines for the Breeding, Care and Management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. (1970); Coates, M.E. és mtsai.: The Germfree Animal in Research, Academic Press, London (1968); Pleasants, J.R. Gnotobiotics, Handbook of Laboratory Animal Science 1, szerk.: Melby, E.C. és mtsai., CRC Press, Boca Raton, Fla., 117, (1974)]. A fenti publikációkat a továbbiakban referenciának tekintjük.

Az alábbiakban Wostman, B.S. (szerk.) cikkéből származó összefoglalót közöljük [Wostmann, B.S. szerk.: Gnotobiotics: Standards and Guidelines for the Breeding, Care and Management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. (1970)], amelyben leírjuk a mikroorganizmus-mentes patkányok és egerek készítését, gondozását és fenntartását. Megjegyezzük, hogy ez a készítés, gondozás és fenntartás hasonlít egyéb állatok készítéséhez, gondozásához és fenntartásához.

A létesítményeket, berendezést és az állattartási eljárásokat úgy kell megtervezni és működtetni, hogy maximális környezeti kontrollt, optimális komfortot és jólétet biztosítsunk az állatoknak. A ketrecek, etetőket és itatókat úgy kell megtervezni és kivitelezni, hogy maximális komfortot biztosítsanak az állatoknak, az ételt és a vizet tegyék könnyen elérhetővé, és a tisztítást valamint sterilizést tegyék egyszerűvé és hatékonyá.

A mikroorganizmus-mentes állatokkal kiterjedten folytatott munkához előnyös területnek a következőkből kell állnia:

1. munkaterület az izolátorok összeállításához és sterilizéséhez,
2. terület az izolátorok állatokkal való tartásához, és



3. laboratóriumi terület a gnotobiotikus környezet rutinszerű ellenőrzéséhez.

Iroda és tápkészítő terület is lehet a területen.

A gnotobiotikus izolátorok tartására használt szobai környezetnek meg kell felelnie a szokványos laboratóriumi rágcsálók tartására megállapított standardoknak. A struktúrának rovarmentesnek (rovarbiztosnak) kell lennie, a falaknak és a padlónak nedvességmentesnek kell lennie. A világításnak egyenletesnek kell lennie, egész év során ugyanazt világos-sötét ciklust kell alkalmazni. A szellőztetésnek gyorsan el kell távolítania minden, a kémiai sterilizálás által okozott gőzt, és a klímát az alábbiak szerint kell szabályozni.

Hőmérséklet Az általánosan elfogadott állatszoba hőmérsékletet (21-27 °C) lejjebb lehet állítani, hogy az izolátor hőmérsékletét 22 °C és 26 °C között tartsuk.

Nedvesség A relatív nedvességtartalmat (RH) az emberi komfortszintnek megfelelő értéken kell tartani, azaz 40-60 százalékon. Ha azonban a szoba levegőjét használjuk az izolátor levegőztetésére, akkor 40-50 %-os RH érték az ajánlott.

Levegőztetés A szoba légcseréjének elégnek kell lennie ahhoz, hogy gyorsan eltávolítson minden, a kémiai sterilizálás során keletkező gőzt. Óránként 10-15-szörös légcseréje javasolt. Frisslevegős szellőztetővel ellátott maszkoknak kell kéznél lenni, hogy megvédjük a személyzetet a kémiai gázok veszélyes szintjétől.

Mikroorganizmus-mentes berendezés Lásd a szakirodalmat [Sacquiet, E.: Equipment design and management: General technique of maintaining germ-free animals, 1-22, In: M.E. Coates (szerk.) The germfree animal in research, Academic Press, London (1968); Trexler, P.C.: Equipment design and management: Transport of germ-free animals and current developments in equipment design, 23-35, In: M.E. Coates (szerk.) The germfree animal in research, Academic Press, London (1968)].



A környezeti mikroorganizmusok kizárása abszolút szigetelést tesz szükségessé. Az izolátor sikeres működtetése attól függ, hogy fenn tudjuk-e tartani minden időpontban ezt a szigetelést. Két általános típusú izolátort lehet beszerezni, fémből és műanyagból. Néhány fémből készült egységet úgy állítanak elő, hogy a 138 kPa belső gőznyomást is kibírja [Reyniers, J.A.: Design and operation of apparatus for rearing germ-free animals, Ann. N.Y. Acad. Sci. 78, 47 (1959); Miyakawa, M.: The Miyakawa remote-control germ-free rearing unit, Ann. N.Y. Acad. Sci. 78, 37 (1959)]. A többi berendezést általában egy nagy autoklávba teszik a kezdeti sterilizációhoz [Gustafsson, B.E.: Lightweight stainless steel systems for rearing germ-free animals, Ann. N.Y. Acad. Sci. 78, 17 (1959)].

Manapság leggyakrabban a flexibilis-film izolátort használják [Trexler, P.C. és L.I. Reynolds: Flexible film apparatus for the rearing and use of germ-free animals, Appl. Microbiol. 5, 406 (1957)]. Általában flexibilis rétegzett vinilből készül, kémiaiilag kell sterilizálni, és könnyen adaptálható a specifikus igényekhez. Egy másik típus, amely egymáshoz kapcsolt nagy nyloncsövekből áll, autoklávban sterilizálható [Lev, M.: An autoclavable plastic unit for rearing animals under germfree conditions, J. Appl. Bacteriol. 25, 30 (1962)]. Plexi izolátorokat és egyszer használatos flexibilis film-egységeket is kifejlesztettek. Ezek közül számos elég könnyű ahhoz, hogy kettőt vagy hármat egymás tetejére tegyünk, ezzel alapterületet lehet megtakarítani.

Általában egy speciális hengert használnak a táp és a segédanyagok sterilizálására a hőérzékeny izolátoroknál. Úgy kell megtervezni, hogy nagy szűrőfelülettel rendelkezzen, ami megkönnyíti a levegő távozását a nagyvákuummal működő autoklávoknál [Trexler, P.C.: An isolator system for control of contamination, Lab. Anim. Care 13, 572 (1963)]. Egy másik módszer szerint hengerhez egy dréncső csatlakoztatható, amely a levegőbe szellőzik a levegő és a kondenzátum



eltávolítására a sterilizálás során [Jaworski, N.E. és C.E. Miller: Refinement of the cylinder technique for supplying germfree isolators, Lab. Anim. Care 13, 591 (1963)].

Sterilizálás Az izolátorban használt minden berendezésnek, tápnek, alomnak, víznek és levegőnek teljesen sterilnek kell lennie. A használt módszereket és körülményeket az egyes dolgok természete határozza meg.

A nyomás alatti gőz a legjobban ismert sterilizációs módszer. Különösen alkalmas olyan porózus anyagok sterilizálására, amelyek hőre stabilak. Minden olyan felületet, amely mikroorganizmusokat hordozhat, közvetlen érintkezésbe kell hozni a gőzzel. Az érintkezés időtartama függ a használt hőmérséklettől. Az ajánlás szerint a sterilizandó anyagnak a hő számára legkevesebb hozzáférhető részét (a csomagok középpontját) legalább 15 percig 121 °C-on kell tartani. A sterilizáció biztosítására végzett alapos ellenőrzés után magasabb hőmérséklet és rövidebb expozíciós idő is használható. A táp, az alom és egyéb anyagok standard csomagmérete nagyon fontos abból a szempontból, hogy biztosítsuk a gőz konstans, előre látható penetrációs idejét.

Száraz hőt használnak az izolátor levegőutánpótlásának biztosítására [Miyakawa, M.: The Miyakawa remote-control germ-free rearing unit, Ann. N.Y. Acad. Sci. 78, 37 (1959); Gustafsson, B.E.: Lightweight stainless steel systems for rearing germ-free animals, Ann. N.Y. Acad. Sci. 78, 17 (1959)].

A hőre érzékeny, nem-porózus anyagok, főleg a flexibilis film-egységek sterilizálására gyakran használják a peracetsavat (CH_3COOOH). Ezt a savat 2 százalékos oldatban alkalmazzák egy nedvesítő anyaggal (detergens) együtt [Trexler, P.C. és L.I. Reynolds: Flexible film apparatus for the rearing and use of germ-free animals, Appl. Microbiol. 5, 406 (1957)]. Más vegyszerek használhatók speciális helyzetekben, azaz például a hipokloritok, jodofórok, vagy kvaterner ammóniumvegyületek a folyadékcsapdában, hogy a hisztorektómiával született

újszülötteket bevigyék, vagy HgCl_2 -t használnak arra, hogy a tojásokat kiköltés előtt steril körülmények között vigyék be.

Etilénoxid (ETO) használható a nem-nedvesedő, hőre érzékeny darabok sterilizálására. A sterilizálás ideje függ a hőmérséklettől, a páratartalomtól, a nyomástól és az ETO koncentrációjától. Az ETO kémiaiilag reagálhat az alom és a táp komponenseivel, és így toxikus vagy nem kívánt vegyületek keletkeznek. A gyúlékonysága és mérgező tulajdonsága miatt az ETO sterilizálásra való rutinszerű felhasználását a kereskedelmi forgalomban levő gázkeverékekre kell korlátozni, amelyek maximum 20% ETO-t tartalmaznak.

Az üvegszál szűrőket általánosan használják a levegő sterilizálására.

A folyadékok membránszűrése arra használható, hogy elkerüljük a hővel való érintkezést, feltéve, hogy ezek a membránok abszolút szűrők, azaz például olyan szűrők, amelyek kiszűrik a 0,22 mikrométernél nagyobb átmérőjű részecskéket.

A gamma-sugarakkal vagy elektronsugár-forrásokkal való besugárzás használható tápok vagy más speciális anyagok sterilizálására. A használt dózis $2,5 - 6 \times 10^6$ rad.

Belső környezete

Hőmérséklet: A belső izolátor hőmérséklete a szobai környezet függvénye és $22-26^\circ\text{C}$ között kell tartani.

Páratartalom: Az izolátorban lecsapódhat a nedvesség, ha túlterhelik, ha nem elegendő a szellőzés, vagy ha a kettő egyszerre fordul elő. Az izolátorba belépő levegő relatív páratartalmának 50% alatt kell lenni, előnyösen 40 % fölött.

Levegőellátás: Az izolátorban óránként 12-20-szoros légcserét kell biztosítani, és 8-13 cm vízoszlopnak megfelelő pozitív túlnyomást. A levegőt bejuttathatjuk központi forrásból, vagy az egyes egységek egyedi légbefúvói

segítségével. Egy turbina-típusú légkompresszor a javasolt berendezés a központi levegőellátási rendszerhez, mivel az olajdugattyú típus hajlamos arra, hogy olajat porlasszon a levegőellátási rendszerbe.

Egy légdiffúzió izolátornál [Trexler, P.C.: Equipment design and management: Transport of germ-free animals and current developments in equipment design, 23-35, In: M.E. Coates (szerk.) The germfree animal in research, Academic Press, London (1968)] nem fordul elő a levegőzés leállása, ha megszűnik az energiaellátás. Ennek a típusnak azonban az a hátránya, hogy kisebb a légcseré óránként, és nincs meg benne az a pozitív védőnyomás, amely meg tudja akadályozni a fertőződést, ha a szigetelésen kisebb rések keletkeznek.

Intézkedések vészhelyzetben: Ha a levegőellátásban csak néhány perces zavar áll be az energia kiesése vagy mechanikai hiba miatt, akkor megfelelő előzetes intézkedéseket kell tenni, hogy fenntartsuk a levegő nyomását az izolátorban. A nem alátámasztott film izolátorok összeomlása az állatok megfulladásához vezethet, de a sokkal közvetlenebb veszély az, hogy az állatok elérhetik és megrongálhatják a filmet vagy a kesztyűket. Az egyedi izolátor levegőellátáshoz csak egy szükségáramforrásra van szükség. Egy központi légellátási rendszerben kell lenni egy második turbinakompresszornak, a folyamatos levegőellátáshoz.

A hőmérséklet és a nyomás grafikus rögzítése ajánlott. Egy audiovizuális riasztórendszert kell beépíteni egy központi levegőellátási rendszerbe, amelynek akkor kell működésbe lépnie, ha akár az energiakimaradás akár mechanikai hiba miatt csökken a vonalnyomás. Hasonló riasztórendszereknek kell jelezniük a bevitt levegő hőmérsékletében beállt nemkívánatos fluktuációkat. Az egyedi izolátor levegőrendszerek esetében a szobai környezet folyamatos grafikus rögzítése is szükséges.

Ketrecek és belső berendezések

Berendezés: Egy izolátor berendezései alaplistájának tartalmaznia kell a biztonsági tetővel ellátott ketrecek, vizespalackokat és ételgaratokat, védő műanyag kesztyűket a műanyag kesztyűkhöz, egy extra ajtó tömítést vagy sapkazáró gyűrűt, hosszú gumihegyű fogókat, hemosztátokat, ollókat, egy törülközőt, pólyaszivacsokat, egy kétliteres kannát a műszerek tartására, egy lefedett négyliteres élelmiszerkannát, kanalat, tenyésztő csöveket, papírzsákokat és nedvességnek ellenálló zsákokat a piszkos alomnak.

A ketreceket sima, korrózióknak ellenálló anyagból kell készíteni. Ellenállóknak kell lenniük a folyadékoknak és könnyen sterilizálhatóknek kell lenniük. Az elfogadható anyagok közé tartoznak a műanyagok, a rozsdamentes acél és az üveg. A galvanizált fém korrodálódik és nem ajánlott azért sem, mert a nyomelem szennyeződés befolyásolhatja a kísérleti eredményeket.

A ketrecek méretét általában a belépő kapu mérete korlátozza. Egy nőstény egérnek szükséges minimális terület a szeméttel együtt 970 cm². Egy állatnak számos esetben több területre van szüksége.

Az 1. táblázatban listázzuk az állatonkénti ajánlott alapterületet egerekre és patkányokra, a súlycsoportok szerint.

1. Táblázat

Ajánlott állatonkénti alapterület ketrecben tartott egerek és patkányok esetében

Kategória <u>száma</u>	<u>Súly(g)</u>	<u>Állatonkénti terület (cm²)</u>	<u>Ketrecenkénti maximális populáció</u>
<u>EGEREK</u>			
1	10-ig	40	40
2	10-15	50	30
3	15-25	75	20
4	25 fölött	95	16
<u>PATKÁNYOK</u>			
1	50-ig	95	50
2	50-100	110	50
3	100-150	125	40
4	150-200	150	40
5	200-300	185	30
6	300 fölött	260	25

Vegyes ajánlások

A kisebb szivárgások ellenőrzésére freonteszteket javasolnak, hogy a szigetelőrendszer integritását biztosítsuk.

Mindegyik egységet fel kell szerelni egy saját berendezéssel, amely időben nyilvántart minden folyamatot, beleértve az egység összeállítását és sterilizését. Ezeket a nyilvántartásokat legcélszerűbb fémből készült kórházi nyilvántartás-borítókban tartani, amelyeket az izolátor számával azonosítunk. Ezeknek tartalmazniuk kell feljegyzéseket a rutinszerű karbantartási munkákról, azaz például a kesztyűk kicseréléséről. A szaporodás-teljesítményről szóló feljegyzéseket is ugyanabban a borítóban kell tartani.

Mivel az izolátorok belsejében kevés a tér, korlátozott a hely, ezért papírból készült, összecusukható tartókat ajánlanak a táphoz és az alomhoz, valamint az állatoknak a steril átjáróval összekötött izolátorok közötti szállítására.

Az izolátorban nem használható éter, mert az elektrosztatikus szikra felrobbanthatja. Fluothane-t (brómklórtrifluoretán) ajánlanak helyette illékony, nem éghető érzéstelenítőszerként.

Tápok, alom és víz

Általános ajánlások

A kereskedelmi forgalomban beszerzett tápok teljes összetételét meg kell adni, listázva az összes alkotóelemet és koncentrációjukat, beleértve a konzerválószerkeket, antioxidánsokat és egyéb adalékokat. Az előállítás időpontját jól láthatóan fel kell tüntetni. A gyártónak garantálnia kell, hogy a táp megfelel az alábbi feltételeknek:

1. A természetes hormonaktivitás elfogadható határon belül van.
2. Nincsenek benne olyan adalékanyagok, amelyek gyógyszereket, hormonokat, antibiotikumokat vagy bármely olyan anyagot tartalmaznak, amelyek abnormális fiziológiai körülményeket teremtenek, vagy interferálnak az éppen folyó vizsgálattal.
3. Nincs bennük szalmonella, a statisztikailag kiválasztott minták elemzése alapján.
4. Nincs bennük rágcsáló és féregszennyeződés.
5. Nincs bennük nyers húsdarab vagy haldarab, amely patogéneket tartalmazhat.

A tápok dúsítása

A mikroorganizmus-mentes állatok táplálékának többet kell tartalmaznia bizonyos tápkomponensekből mint amennyi a normál szint, hogy kompenzáljuk a vitaminok (különösen bizonyos B vitaminok valamint az A és D vitaminok) elvesztését, valamint a fehérje tápértékének csökkenését a hősterilizálás miatt (a hozzáférhető lizin, metionin, arginin és triptofán mennyisége csökken le). Emellett tartalmaznia kell megkívánt tápanyagokat is, amelyek a szokványos állati tápokban megtalálhatók, mert a tápcsatornában élő mikroorganizmusok megszüntetizálják [Reddy, B.S., B.S. Wostmann és J.R. Pleasants: Nutritionally adequate diets for germ-free animals, 87-111; in: M.E. Coates (szerk.): The germ-free animal in research, Academic Press, London (1968)]. Ilyen táp például az L-485, egy olcsó táp, amelyet alaposan megvizsgáltak [Kellogg, T.F. és B.S. Wostmann: Rat and mouse stock diet L-485, Lab. Anim. Care (1969)], és nagyobb mennyiségben előállítható (lásd 2. táblázat). A specifikus aminosavakkal való kiegészítés az összfehérje-tartalom növelése helyett a fehérjeminőség csökkenésének kompenzálásának tekinthető. A táp fehérjetartalmának növelése nagyobb fogyasztást és vízkiválasztást eredményez, ami nedves körülményeket okoz, és ezáltal korlátozza az egy adott méretű izolátorban tartható állatok számát.

2. Táblázat

Az L-485, patkányok és egerek számára készített táp összetétele

<u>Adalékanyag</u>	<u>Mennyiség/kg</u>
<u>Táp</u>	
Őrölt sárga kukorica	590 g
Szójaliszt (nyersfehérje 50%)	300
Lucernaliszt (dehidrált; 7% fehérje)	35
Kukoricaolaj (egyszer tisztított)	30
NaCl	10
CaHPO ₄ x H ₂ O	10
CaCO ₃	5
Lizin (tápmínőség)	5
Metionin (tápmínőség)	5
B.H.T. (butilezett hidroxitoluol)	0,125
Nyomelemkeverék	0,25
<u>Vitaminkeverék</u>	
A	26000 NE
D ₃	1000 NE
E (tokoferol-acetát)	225 mg
K ₃ (menadion)	90
Riboflavin	30
Pantoténsav	285
Niacin	65
Kolin-klorid	2000
B ₁₂ (0,1%-os trituráció mannitban)	2
Tiamin-HCl	65
Piridoxin-HCl	20
Fólsav	10
Para-amino-benzoésav	50

2. táblázat folytatása

Nyomelemkeverék (kereskedelmi)

Mn (mangánoxid formában)	65 mg
Fe (vaskarbonát formában)	20
Cu (rézoxid formában)	2
Zn (cinkoxid formában)	15
I (kalcium-jodát formában)	1,5
Co (kobaltkarbonát formában)	0,6

Gőzsterilizálás

[Reddy, B.S., B.S. Wostmann és J.R. Pleasants: Nutritionally adequate diets for germ-free animals, 87-111; in: M.E. Coates (szerk.): The germ-free animal in research, Academic Press, London (1968)].

Az aktuális eljárás függ a hozzáférhető berendezéstől. Három lényeges faktor van:

1. Az elősterilizációs vákuum, ha lehetséges, akkor legalább 50 Hgmm legyen, mert ez elősegíti, hogy a gőz behatoljon a tápba, ami az atmoszférába szellőző hengerben van. 70 Hgmm vagy magasabb nyomás akkor ajánlott, ha a henger nem szellőzik az atmoszférába.

2. A teljes sterilitást biztosító legrövidebb sterilizációs fázist kell használni, a berendezés és a gyakorlat által diktált plusz biztonsági tartalékkal. A táp belső magjában mért hőmérsékletnek legalább 121 °C-t kell elérnie. Az aktuális sterilizációs fázisnak ezen a hőmérsékleten legalább 15 percig kell tartania. A magasabb sterilizációs hőmérsékletek esetében a sterilizációs idő viszonylag rövidebb.

3. A sterilizálás utáni vákuum gyorsítja a táp hőmérsékletének csökkenését. Ezzel elkerüljük a tápanyagok szükségtelen hőbomlását. A



berendezést azonban úgy kell tervezni, és olyan teljesítményűnek kell lennie, hogy elkerüljük a szivárgást a műveletnek ebben a szakaszában.

A tápok hősterilizése során az a cél, hogy elkerüljük egyrészt a nem tökéletes sterilizációt, másrészt a fölösleges, hosszú ideig tartó szükségtelen tápértékcsökkenést. Jóllehet bizonyos mértékű tápértékcsökkenés elkerülhetetlen, egész elfogadható eredményeket kaphatunk, a következő paraméterek változtatásával:

(a) Technikai eljárások, úgymint a hőmérséklet, idő, sterilizálás előtti és utáni vákuum, részecskeméret.

(b) A táp víztartalma. Ha fokozzuk a víztartalmat, ez elősegíti a B-vitaminok jobb visszanyerését a sterilizálás után [Zimmermann, D.R. és B.S. Wostmann: Vitamin stability in diets sterilized for germfree animals; J. Nutr. 79, 318 (1963)]. A szilárd tápoknál 25%-os víztartalom, vagy olyan magas víztartalom javasolt, ami még nem rontja a táp tárolási minőségét. A táp víztartalmának változását követően újra meg kell vizsgálni, hogy a táp milyen gyorsan éri el a sterilizálási hőmérsékletet.

Sugárzásos sterilizálás

[Reddy, B.S., B.S. Wostmann és J.R. Pleasants: Nutritionally adequate diets for germ-free animals, 87-111; in: M.E. Coates (szerk.): The germ-free animal in research, Academic Press, London (1968); Ley, F.J., J. Bleby, M.E. Coates és J.S. Paterson: Sterilization of laboratory animal diets using gamma radiation; Lab. Anim. 3 221 (1969)].

A technikák és a dozimetria függ a berendezéstől a sugárzás típusától. Jóllehet általában a sugárzásos sterilizációt úgy értékelik, hogy a tápérték kisebb romlását okozza, mégis jelenleg azt javasolják, hogy a tápokot gőzzel sterilizzák.



Sterilitásvizsgálat

A bármilyen sterilizációs eljárással elért sterilitás ellenőrzéséhez a *Bacillus stearothermophilus* spóráit tartalmazó csíkok használata ajánlott. A csíkokat a táp középpontjában kell elhelyezni. Emellett az izolátort és a benne levő állatokat periodikusan ellenőrizni kell mikrobiológiai tisztaság szempontjából. Ez az ellenőrzés ahhoz szükséges, hogy ellenőrizzük a véletlen szennyeződéseket, amik az izolátor repedéseiből vagy az izolátor illetve tartalmának nem kielégítő sterilizációjából származik. Ennek elérési módja megtalálható a szakirodalomban [Wostmann, B.S. szerk.: Gnotobiotec: Standards and Guidelines for the Breeding, Care and Management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. (1970)].

A tápérték sterilizálás során való romlásának becslése

A létfontosságú tápkomponensek elvesztésének jól használható ellenőrzésére a savval extrahálható tiamin meghatározását ajánlják, ami a táphoz hozzáadott tiamin kinyerésére jellemző [Wostmann, B.S. és P.L. Knight: The effect of methyl alcohol on the conversion of thiamine to thiochrome; *Experientia* 16, 500 (1960)]. A 25%-nál kisebb kinyerés a táp általános tápértékének jelentős romlását mutatja. A megfelelő berendezéssel és odafigyeléssel 50%-os vagy annál magasabb kinyerést kell elérni.

A szilárd táp tárolása

Mivel a mikroorganizmus-mentes kísérleteknek általában magasak a költségei, ezért különösen kell vigyázni arra, hogy soha ne használjunk olyan tápot, amelynek a tápértéke jelentősen leromlott. Az az ajánlás, hogy (a) a nem-sterilizált tápot mindig hűtve tároljuk, és soha ne tároljuk egy hónapnál hosszabb ideig, és (b) a

sterilezett tápnak az izolátorban való tárolása egy hét vagy kevesebb lehet, és soha nem haladhatja meg a 10 napot.

Alom

Az almot hetente legalább egyszer cserélni kell. Az ajánlás szerint az alom anyagának könnyen sterilizhetőnek kell lennie, és nem szabad az állat által könnyen fogyaszthatónak lenni. Nem szabad, hogy a sterilizési eljárás következtében toxikus komponenseket tartalmazzon. Pormentes fehér fűrészport és forgácsot javasolnak. Hársfa- és nyárfaforgács valamint darált kukoricacső is elfogadható. Diatómaföld termékek, cédrus, gyantás fák, és keményfák nem ajánlottak. Az etilénoxidos sterilizést addig nem szabad használni, ameddig a káros anyagok képződésének lehetőségét nem tisztáztuk.

Víz

Az ivóvizet sterilizálni kell. Autoklávozhatjuk négyszögletes csomagolású palackokban, Mason korsókban, vagy az egységhez kapcsolt tankokban. Minden egyes tartóban hagyni kell egy kis levegőt.

A gnotobióták császármetszéssel való előállításának elvei

Minden császármetszéses operáció sikere részben attól függ, hogy hagyjuk-e a a terhességet teljesen kifejlődni. Ez különösen igaz azokra az állatokra, amelyeknek rövid a gesztációs periódusa, ahol a magzat végső súlyának 20%-át a szülés előtti utolsó 24 órában kaphatja meg. Az időzített pároztatások elég sikeresek, de azoknál az állatoknál, amelyek nagy almot vetnek (patkányok és egerek), segíthet, ha megvárjuk, amíg az anya megszüli az első utódát, és csak utána kezdjük meg az operációt. A tengerimalacoknál a legmegfelelőbb módszer az, ha a

műtéthez azon az alapon választjuk ki az anyákat, ha mérjük az ágyékcsonatok szétállását [Philips, B.P., P.A. Wolfe és H.A. Gordon: Studies on rearing the guinea pig germfree; Ann. N.Y. Acad. Sci. 78, 183 (1959)].

A császármetszéssel született utódot még azelőtt kell mikroorganizmusmentes környezetbe juttatni, mielőtt először levegőt vesz. El lehet venni közvetlenül az anyától hiszterotómiával, egy felvágott steril membránon keresztül bejuttatva egy steril izolátorba, vagy hiszterektómiával, egy germicid csapdán keresztül, egy steril izolátorba juttatva. A szokásos sebészeti beavatkozás a nőtényen a császármetszés előtt a hasi szőrzet eltávolítása, valamint az operáció területének tisztítása és fertőtlenítése. Az érzéstelenítést előnyösen a nyakcsigolya diszlokációjával végezzük patkányokban és egerekben, jóllehet hasi középvonali helyi érzéstelenítés vagy általános érzéstelenítés is használható, anélkül, hogy a magzat depressziója és halandósága jelentős szintet érne el. A tengerimalacoknál a műtétet általában nyugtatózás és helyi érzéstelenítés után végezzük.

A hiszterotómiával világra jött újszülött bejuttatása egy határoló membránon keresztül speciális izolátor berendezést igényel. A Reyniers féle rozsdamentes acél sebészeti egységnek [Reyniers, J.A.: Germfree life methodology (gnotobiotics) and experimental nutrition; Proc. 3rd Internat. Congr. Biochem, Brüsszel; 458-466 (1965)] van egy beépített horizontális fém osztólapja, amely elválasztja egymástól az egység alsó és felső részét. Az osztólap tartalmaz egy köralakú nyílást, amit egy mylar műanyag film borít, hogy fenntartsa a felső rész integritását. A műtéthez előkészített nőtényt az alsó részbe tesszük, és a műtétet ebben a steril részben hajtjuk végre. A műanyagon és a bőrön szikével vagy elektrokauterizációval egy vágást ejtünk. A bőr bemetszéséhez az önsterilizáló elektrokauterizáló penge az előnyös. A bőr és a mylar széleit összekapcsoljuk és tükrözzük. Steril textíliát helyezünk a hasra, hogy lefedjük a bőrön tett vágást, majd meleg sterilizőszert (benzalkónium-klorid 1:1,000) viszünk

az exponált izomburokra, mielőtt megnyitjuk a hasüreget. Nagyon óvatosan kell eljárni, hogy ne vágjunk bele a belekbe. Egy pár csipesz vagy hemosztát bevitele a hasfal és a zsigerek közé hasznos lehet. Ezután megnyitjuk a méhet, és eltávolítjuk az újszülöttet. A magzati membránokat eltávolítjuk, és a köldökzsinórt elszorítjuk majd elvágjuk. Az újszülöttet óvatosan megszáritjuk és masszírozzuk, hogy serkentsük a légzést. Ezután egy felnevelő egységbe visszük át, hogy egy nevelőanya táplálja, vagy kézzel tápláljuk. Egy újabb mylar fóliát erősíthetünk a sebészeti kapu fölé, és az eljárást 5-6 anyával megismételhetjük, anélkül, hogy komolyan kockáztatnánk a fertőzést. A császármetszést elvégezhetjük egy műanyag izolátor felhasználásával is, vagy egy kesztyűzsákkal is, mint sebészeti egységgel. Az izolátor padlójának a külső felszínét előre sterilizzük és az állat hasával hozzuk érintkezésbe, ezzel ugyanazt a célt érjük el, mint az előzőekben ismertetett mylar fóliával. Az operációt követően a műanyag záráson tett hasítást steril szalaggal le lehet zárni, és a sebészeti beavatkozást megismételhetjük újabb terhes nőstényekkel.

Az utódok hiszterotómiával való világra hozatala sokkal általánosabb, ha műanyag izolátorokat használunk [Foster, H.: A procedure for obtaining nucleus stock for a pathogen-free animal colony; Lab. Anim. Care 9, 135 (1959)]. A méhet aszeptikusan feltárjuk, és közvetlenül a méhnyak mellé csipeszeljük. A kivágott méhet a mikroorganizmus-mentes egységbe visszük át, egy folyadékos germicid csapdán keresztül. Ha már az izolátorban vannak, akkor az utódokat a lehető leggyorsabban világra hozzuk, hogy megakadályozzuk a magzatvíz belégzését. Általában megszáritjuk őket és jól lélegzenek, mielőtt a köldökzsinórt elcsipeszeljük és elzárjuk. Az újszülötteket azután a nevelő anyához visszük vagy kézzel tápláljuk.

A hiszterotómia sikeresen alkalmazható egerek, patkányok és sertések esetében. A tengerimalacoknál azonban a hiszterotómia az előnyös, mert magas a

halálozási arány, ha két perc vagy annál hosszabb idő telik el az anyai vérellátásról való leválasztás és az izolátorba való bejuttatás között.

Tenyésztési rendszerek a gnotobióta tenyészetekben

Beltenyésztett törzsek

A szokványos tenyésztő telepeken használt fivér x nővér párzási rendszert használjuk a gnotobióta tenyészetekben is.

Nem-beltenyésztett törzsek

A valódi random párzás során az utódok és az első unokatestvérek közötti párzás történik. Jóllehet az ilyen párosodásokat általában elkerülik a nem-beltenyésztett tenyészetekben, a kapott párosodási rendszer nem csökkenti a beltenyésztés lehetséges legnagyobb mértékű sebességét. Bármely minimális beltenyésztési rendszer használható [Falconer, D.C.: Genetic aspects of breeding methods; The UFAQ handbook on the care and management of laboratory animals, 3. kiadás, E and S Livingstone, Ltd., London, 72-96 (1967); National Research Council, Institute for Laboratory Animal Resources: A guide to genetic standards for laboratory animals, National Academy of Sciences, Washington, D.C. (1969)].

Összehasonlítható szokványos és gnotobióta tenyészetek

Ha arra van szükség, hogy összehasonlítás céljára mind szokványos mind gnotobióta telepeket fenntartsunk, akkor a hasonló genetikai hátteret úgy tarthatjuk fenn, hogy a szokványos tenyészet effektív tenyésztő populációjából császármetszéssel világra hozott utódokat viszünk be a gnotobióta tenyészetbe. Ez azoknak a termelőknek a módszere, akik a fő hangsúlyt a nem-gnotobióta patkányok és egerek előállítására teszik, de megvan az hátrányuk, hogy megakadályozzák egy mikrobiológiai pedigre kialakítását, ami leegyszerűsítene a mikrobiológiai ellenőrzést.

Ideális esetben ezt úgy lehet megcsinálni, hogy specifikus párosodásokból származó utódokat használunk törzstenyészetként a szokványos tenyészetéhez, és az ezekből a párosodásokból származó következő generációt használjuk törzstenyészetként a gnotobióta tenyészetéhez. Ha ezt az eljárást követjük minden második vagy harmadik generáció esetében, akkor a két tenyészet genetikai struktúrája nagyon hasonló marad, feltéve persze, hogy ugyanazt a párosodási rendszert használjuk mindegyik tenyészetben.

Egy másik módszer szerint a gnotobióta tenyészet effektív tenyésztő populációjából származó utódokat használhatjuk a szokványos tenyészet létrehozására vagy felújítására. A genetikai következmények azonosak, feltéve hogy ugyanazokat az eljárásokat használjuk.

Feljegyzések vezetése

[Wolff, G.L.: Practical mating systems and record-keeping in a breeding colony; UFAW handbook on the care and management of laboratory animals, 3. kiadás, E and S Livingstone Ltd., London, 97-113 (1967)].

Megfelelő feljegyzéseket kell vezetni az állatokról és az izolátor karbantartásáról. Az állatokról készült feljegyzéseknek tartalmazniuk kell az operáció hatékonyságát, és az állatok biológiai teljesítőképességét. Az izolátorról készült feljegyzéseknek időrendi sorrendben tartalmazniuk kell az izolátorral kapcsolatos eseményeket, hogy ezzel elősegítsük a izoláción esett törés lokalizálását, ha fertőzés lép fel.

4.3. Az antigén-mentes állat

A jelen találmány szerinti előnyös megvalósítási mód szerint az az előnyös, ha a mikroorganizmus-mentes állatot kémiaiag meghatározott (CD), alacsony

molekulasúlyú, vízben oldódó, ultraszűrt táppal etetjük. Az a vélemény alakult ki, hogy az ilyen táp lehetővé teszi a táp és antigén felvétel teljes ellenőrzését az állatnál. Az ilyen tápot olyan adalékanyagokból állítják össze, amelyek kémiaiilag meghatározhatók, azaz például aminosavakból, egyszerű cukrokból, lipidekből, vitaminokból és ásványi anyagokból. A jelen találmány szempontjából egy kémiaiilag meghatározott táp aminosavakat, egyszerű cukrokat, lipideket, vitaminokat és ásványi anyagokat tartalmaz, és nem tartalmaz semmi olyan komponenst, amelynek a molekulasúlya 10,000 daltonnál nagyobb. Tehát egy CD táp minden komponense alacsony molekulasúlyú, és az állatokban természetes körülmények között keringő tápanyag, ennek következtében az a vélemény alakult ki, hogy egy ilyen komponens nem serkent semmilyen immunválaszt. A legújabb szakirodalomban a CD tápon nevelt mikroorganizmus-mentes állatot mint "antigén-mentes" állatot említik.

Emellett az is előnyös, ha szűrőpapírt használunk alomként, másképpen a mikroorganizmus-mentes állat megeheti az almot, ami immunválaszt eredményez. Az a vélemény alakult ki, hogy a szűrőpapír alom megevése nem eredményez immunválaszt.

Egy adott fajnál egy adott CD tápban ezeket a komponenseket olyan arányban és mennyiségben használjuk, hogy az kielégítse az adott faj ismert tápigényeit. A mikroorganizmus-mentes egerek számára előnyös CD táp összetétele és készítése az alábbi:

Az L489E14SE kémiailag meghatározott táp összetétele és készítése

<u>Adalékanyag</u>	<u>Mennyiség (g/100 g adalékanyag)</u>
--------------------	--

192 ml Milli-Q vízhez az alábbi anyagokat adjuk 70 °C-on:

Leucin	1,9
Fenilalanin	0,74
Izoleucin	1,08
Metionin	1,06
Triptofán	0,37
Valin	1,23
Aszparagin	0,91
Arginin HCl	0,81
Treonin	0,74
Lizin HCl	1,77
Hisztidin HCl	0,74

Ezt az oldatot 45 °C-ra hűtjük, majd az alábbi anyagokat adjuk hozzá:

Glicin	0,59
Prolin	1,48
Szerin	1,33
Alanin	0,59
Nátrium-glutamát	3,40
L-tirozin-etilészter HCl	0,62
Vasglükonát	0,05
35D sók ¹	0,105
Nátrium-szelenit ²	0,074

Az oldatot 5 °C-ra hűtjük, és az alábbi anyagokat adjuk hozzá:

Kalcium glicerofoszfát	5,22
Magnézium glicerofoszfát	1,43
Kalciumklorid 2H ₂ O	0,185
Nátriumklorid - Káliumjodid (KI) keverék, amely 680 mg KI-t tartalmaz	0,086
111E5 B-vitamin keverék ³	0,09
B12 vitamin ⁴	1,20 mg
Kolinklorid	0,31
Káliumacetát	1,85

108 ml Milli-Q vízhez vízmentes

D-dextrózt adunk	71,78
------------------	-------

Az oldatokat 5 °C-ra hűtjük, majd ultraszűréshez egyesítjük.

¹ A 3. táblázatban megadott 35D sókeverék

² A 35D-ben levő nátrium-szelenáton kívül hozzáadva

³ A 4. táblázatban megadott 111E5 B-vitamin keverék

⁴ A 111E5 B-vitamin keverékben levő B12-n kívül hozzáadva (lásd az alábbi példát)

Ezekből a készítményekből az egerek vagy patkányok tetszés szerint fogyasztanak.

A LADEK 69E6 lipidkiegészítő összetétele

Adalékanyag

A napi felnőtt dózis mennyisége (0,385 ml)

Tisztított szója trigliceridek ¹	0,33 g
Retinil-palmitát	6,45 mg (11,7 NE)
Kolekalciferol	0,0288mg(1,15 NE)
2ambo-alfa-tokoferol	3,3 mg
2ambo-alfa-tokoferol-acetát	6,6 mg
Phyllokinon	73 mg

* A szoptatós egerek a felnőtt dózis kétszeresét kapják.

¹ Összetétele:	12% palmitát
	1,5% sztearát
	24% oleát
	55% linoleát
	8% linolenát

A CD tápok részletes leírása megtalálható a szakirodalomban [Pleasants, J.R. és mtsai.: J. Nutr. 116, 1949-1964 (1986); Pleasants, J. és mtsai.: Germfree Research: Microflora Control and Its Application to the Biomedical Sciences, B.S. Wostmann, szerk.: 87. old. Liss, New York (1985); Wostmann, B.S. és mtsai.: J. Nutr., 112, 552 (1982); Pleasants, J.R. és mtsai.: J. Nutr. 100, 498 (1970)]. A felsorolt publikációkat referenciának tekintjük.

4.4 Monoklonális ellenanyag előállítása

A mikroorganizmus-mentes állatot azután monoklonális ellenanyagok előállítására használjuk. A mikroorganizmus-mentes rendszert használhatjuk bármely antigén elleni monoklonális ellenanyag előállítására, amit az állat a nem-mikroorganizmus-mentes állapotban elő tud állítani. Az antigének egy jellemző listája a 3,935,074 számú USA szabadalmi bejelentésben található. Azonban az az általános vélemény, hogy a mikroorganizmus-mentes állat az antigénnel szemben sokkal erősebb immunválaszt ad. Így tehát fokozhatjuk a valószínűségét annak, hogy olyan B-limfocitát különítünk el, amely olyan ellenanyagot termel, amely képes az antigén egy specifikus epitopjához kötődni. Emellett az a vélemény alakult ki, hogy a mikroorganizmus-mentes rendszer különösen alkalmas nagyon specifikus ellenanyagok generálására a számos epitoppal rendelkező antigénekkal szemben.

A mikroorganizmus-mentes állat standard technikákkal immunizálható. Azonban az az előnyös, ha a mikroorganizmus-mentes állatot legalább háromszor immunizáljuk, az egyes immunizálások között legalább három hét telik el, és ezt követi egy prefúziós gyorsító. Az a vélemény alakult ki, hogy ez a fokozott mértékű immunizáció szükséges lehet, mivel megfigyelték, hogy két immunizálás után, ami a szokás, még főleg IgM-et szekretáló B-limfociták vannak, és nem az előnyben részesített IgG-t szekretáló B-limfociták.

4.5 Szomatikus sejtek

A mikroorganizmus-mentes állatnak az ellenanyag előállítására várhatóan képes szomatikus sejtjei, különösen a B-limfociták alkalmasak egy B-sejt mielóma sejtvonallal való fúzióra. Főleg azok az ellenanyag-termelő sejtek fuzionálnak, amelyek a plazmablaszt állapotban vannak. A szomatikus sejtek származhatnak a beindított mikroorganizmus-mentes állatok nyirokmirigyeiből, lépjéből és perifériális véréből, és a nyiroksejtek megválasztása nagymértékben az adott fúziós rendszerben való felhasználhatóságuktól függ. Azonban főleg a lépből származó szomatikus sejteket részesítjük előnyben. Ha egyszer beindítottuk vagy hiperimmunizáltuk, akkor a mikroorganizmus-mentes állatokat ellenanyag-termelő limfociták forrásaként használhatjuk. Az egér limfociták nagyobb százalékban adnak stabil fúziót az alábbiakban ismertetett egér mielóma sejtvonalakkal. Azonban egyéb mikroorganizmus-mentes állatokból származó ellenanyag-termelő sejtek alkalmazása is lehetséges. Egy adott mikroorganizmus-mentes állat megválasztása függ a választott antigéntől, mivel az lényeges, hogy a mikroorganizmus-mentes állatnak a B-limfocita repertoárjában legyen egy olyan B-limfocita, amely termel ellenanyagot az ilyen antigén ellen.

4.6 Sejtek immortalizálása

Specializált mielóma sejtvonalakat fejlesztettek ki tumorokból, a hibridóma-termelő fúziós eljárásokban való alkalmazás céljára [G. Kohler és C. Milstein: Eur. J. Immunol. 6, 511-519 (1976); M. Schulmann és mtsai.: Nature 276, 269-270 (1978)]. A sejtvonalakat legalább három ok miatt fejlesztették ki. Az első ok az, hogy megkönnyítsék a fuzionált mielómasejtek szelekcióját. Ezt általában úgy érik el, hogy enzimdeficienciákkal rendelkező mielómákat használnak, amelyek képtelenné teszik ezeket a sejteket arra, hogy bizonyos olyan szelektív táptalajon szaporodjanak, amely támogatja a hibridómák szaporodását. A második ok a limfocitatermelő tumorsejtek öröklött tulajdonsága, hogy képesek a saját ellenanyagaikat megtermelni. A monoklonális technikák célja az, hogy immortalizált fuzionált hibrid sejtvonalakat kapjunk, amelyek a kívánt egyetlen specifikus ellenanyagot termelik, genetikailag a hibridóma szomatikus sejt komponense által vezérelve. Ahhoz, hogy elimináljuk a hibridómákban a tumorsejt ellenanyagok termelését, azokat a mielóma sejtvonalakat használjuk, amelyek nem képesek könnyű vagy nehéz immunglobulin láncokat termelni, vagy azokat, amelyeknek az ellenanyag szekretáló mechanizmusa hibás. A harmadik ok ezeknek a sejteknek a választására az, hogy képesek a hatékony fúzióra.

Számos mielóma sejtvonal használható a fuzionált sejthibridek előállítására, beleértve az NS-1, X63-Ag8, NIS-Ag4/1, MPC11-45.6TG1.7, X63-Ag8.653, Sp2/O-Ag14, FO és S194/5XXO.Bu.1 hibrideket, amelyek mind egérből származnak, és a 210-RCY3.Ag1.2.3-at, amely patkányból származik [G.J. Hammerling, U. Hammerling és J.F. Kearny, szerk.: Monoclonal antibodies and hybridomas, J.L. Turk, szerk.: Research Monographs in Immunology, 3, Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York (1981)].



4.7 Fúzió

Az ellenanyagtermelő lép vagy nyirokcsomó sejtek és az immortalizáló sejtek közötti hibridek előállítási módszerei általában abból állnak, hogy a szomatikus sejteket egy, a sejtmembránok fúzióját elősegítő ágens vagy ágensek (kémiai, virális ágens, vagy elektromos erőter) jelenlétében keverjük össze az immortalizáló sejtekkel, 20:1 - 1:1 arányban. Gyakran előnyös, ha a fúziós eljárásban alkalmazott szomatikus és immortalizáló sejtek ugyanabból az állatfajból származnak. A fúziós módszereket a szakirodalomban leírták [G. Kohler és C. Milstein: Nature 256, 495-497 (1975); Eur. J. Immunol. 6, 511-519 (1976); Gefer és mtsai.: Somatic Cell Genet. 3, 231-236 (1977); Kozbor és mtsai.: Immunology Today, 4, 72 (1983)]. Az ezen kutatók által használt fúzió-elősegítő anyag a Sendai vírus és a polietilén-glikol (PEG) volt.

Használhatjuk az újonnan kifejlesztett EBV-transzformációs technikát is [Cole és mtsai.: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96 (1985)].

4.8 Klónok izolálása és az ellenanyagok kimutatása

A fúziós eljárások gyakran nagyon alacsony gyakorisággal eredményeznek életképes hibrideket (körülbelül 1×10^{-6} - 1×10^{-8}). Az életképes hibridek előállításának alacsony gyakorisága következtében lényeges, hogy legyen valamilyen módszerünk, amellyel a sejthibrideket ki lehet választani a megmaradt fuzionálatlan sejtek közül, főleg a fuzionálatlan mielóma sejtek közül. Arra is szükség van, hogy a többi keletkező fúziós sejthibrid közül kiválasszuk a kívánt ellenanyag-termelő hibridómákat.

Általában a fuzionált sejteket szelektív táptalajon szaporítják, például HAT táptalajon, amely hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmaz. A HAT táptalaj

lehetővé teszi a hibrid sejtek szaporodását, és megakadályozza a nem fúzionált mielóma sejtek szaporodását, amelyek egyébként folyamatosan szaporodnának tovább. Az aminopterin blokkolja a *de novo* purin és pirimidin szintézist, azáltal, hogy blokkolja a tetrahidrofolát termelődését. A timidin hozzáadása megkerüli a pirimidin szintézisben levő blokkot, míg a hipoxantint azért tesszük a táptalajba, hogy a gátolt sejtek képesek legyenek a purin szintézisére, a nukleotid-mentő bioszintézis út révén. A használt mielóma sejtek olyan mutánsok, amelyekből hiányzik a hipoxantin-foszforibozil-transzferáz (HPRT), és így nem tudják alkalmazni a mentő bioszintézis utat. A túlélő hibridekben a B limfocita szolgáltatja a genetikai információt ennek az enzimnek a termeléséhez. Mivel a B limfocitáknak tenyészetben korlátozott az élettartamuk (körülbelül két hét), csak azok a sejtek képesek HAT táptalajban szaporodni, amelyek a mielóma és a lépsejtek között keletkezett hibridek.

Ahhoz, hogy megkönnyítsük a hibridek által termelt ellenanyag szűrővizsgálatát, és hogy megakadályozzuk azt, hogy egyes hibridek túlnőjék a többi, a fúzionált mielóma és B-limfocita sejtek keverékét HAT táptalajban hígítjuk, majd mikrotiter lemez több lukában szaporítjuk. Két-három héten belül, amikor a hibrid klónok mikroszkóposan láthatóvá válnak, az egyes, hibrid klónokat tartalmazó lukáknak a felülúszóját megvizsgáljuk, van-e benne ellenanyagtermelés.

A vizsgálatnak érzékenynek, egyszerűnek és gyorsnak kell lennie. A vizsgáló módszerek közé tartozik a radioimmunesszé, enzim-immunesszé, citotoxicitási vizsgálat és a tarfolt vizsgálat.

4.9. Sejtek szaporítása és ellenanyag-termelése

Ha a kívánt fúzionált sejthibrideket már kiválasztottuk és klónoztuk individuális ellenanyag-termelő sejtvonalakba, akkor mindegyik sejtvonalat a két standard módszer egyikével szaporíthatjuk. A hibridóma egy mintáját injekciózhatjuk egy olyan

típusú hisztokompatibilis állatba, amelyet az eredeti fúzióban szereplő szomatikus és a mielóma sejtek forrásaként használtunk. Az injekciózott állatban tumor fejlődik ki, amely a fuzionált sejthibrid által termelt specifikus monoklonális ellenanyagot termeli. Az állat testfolyadékai, úgymint a szérum vagy aszcitesz folyadék megcsapolhatók, így kaphatunk monoklonális ellenanyagokat nagy koncentrációban. Egy másik módszer szerint az egyes sejtvonalakat *in vitro* lehet szaporítani, laboratóriumi tenyésztő edényekben. A tenyésztő táptalaj, amely nagy koncentrációban tartalmazza az egyetlen, specifikus monoklonális ellenanyagot, dekantálással, szűréssel vagy centrifugálással kinyerhető.

4.10 A monoklonális ellenanyag használata

A jelen találmány szerinti módszerrel előállított monoklonális ellenanyagokat bármely olyan technikában alkalmazhatjuk, amely ismert, vagy a jövőben fogják még kifejleszteni, és monoklonális ellenanyagot alkalmaz.

A monoklonális ellenanyagok fő alkalmazási területe az immunesszé, ami az antigén-ellenanyag kölcsönhatásának a mérése. Ezek a vizsgálatok általában lehetnek heterogének vagy homogének. Egy homogén immunesszében az immunológiai reakcióelegy tartalmazza a specifikus ellenanyagot, egy jelzett analitikai reagenst, és a számunkra érdekes mintát. A jelzésből származó jelet módosítjuk, közvetve vagy közvetlenül, az ellenanyagnak a jelzett analitikai reagenshez való kapcsolódása révén. Mind az immunológiai reakció, mind a reakció mértékének kimutatása homogén oldatban játszódik le. A használható immunkémiai jelzések közé tartoznak a szabad gyökök, fluoreszcens festékek, enzimek, bakteriofágok, koenzimek és így tovább. A homogén immunesszé fő előnye az, hogy a specifikus ellenanyagot nem kell elválasztani a jelzett analitikai reagenstől.

Egy heterogén immunesszében a reagensek általában a mintadarab, a specifikus ellenanyag és a kimutatható jel keltésének eszközei. A mintadarabot általában egy hordozóra visszük, azaz például egy lemezre vagy mikroszkóp tárgylemezre, és érintkezésbe hozzuk a folyadékfázisban levő ellenanyaggal. A hordozót azután elválasztjuk a folyadék fázistól, és vagy a hordozó fázist, vagy a folyadék fázist vizsgáljuk kimutatható jel szempontjából, az ilyen jel keltésére alkalmas eszközöket használva. A jel a mintában jelenlevő analitikai reagenssel arányos. A kimutatható jel keltésére alkalmas eszközök közé tartozik a radioaktív jelzés alkalmazása, fluoreszcens anyagok, enzimek, és így tovább alkalmazása. A heterogén immunesszére példa a radioimmunesszé, az immunfluoreszcencia módszerek, az enzimhez kapcsolt immunesszék, és a hasonlóak.

A fenti immunesszé technikák részletes megbeszéléséhez lásd "Enzyme-Immunassay", Edward T. Maggio, CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla. (1980). Ezenkívül lásd a 3,690,834; 3,791,932; 3,817,837; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,966,345 és 4,098,876 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentéseket, amely lista korántsem tartalmazza az összes referenciát.

A monoklonális ellenanyagok egyéb felhasználási területe az *in vivo* képalkotás és a gyógyászat. A monoklonális ellenanyagokat radioaktív vegyületekkel lehet jelezni, azaz például radioaktív jóddal, és a betegnek intravénásan lehet beadni. Az ellenanyagot mágneses próbával is lehet jelezni. Azután NMR alkalmazásával lehet az ellenanyagot kimutatni. Miután az ellenanyagokat lokalizáltuk az antigénen, az antigént emissziós tomográfiával és radionukleáris letapogatási technikákkal lehet kimutatni, és ezzel lokalizálni az antigént.

Az illusztrálás kedvéért a tisztított monoklonális ellenanyagot megfelelő dózisban egy megfelelő hordozóban szuszpendáljuk, azaz például sóoldatban, amely

vagy tartalmaz, vagy nem tartalmaz humán albumint, majd intravénásan adjuk be, azaz például folyamatos intravénás infúzióval több óra alatt [Miller és mtsai.: Hybridomas in Cancer Diagnosis and Therapy (1982); amely publikációt a továbbiakban referenciának tekintünk].

A jelen találmány szerinti monoklonális ellenanyagok használhatók a gyógyászatban is. A megfelelő biológiai tulajdonságokkal rendelkező ellenanyagok jól használhatók közvetlen gyógyászati hatóanyagként. Egy másik módszer szerint az ellenanyagokat hozzáköthetjük egy toxinhoz, hogy immunotoxint hozzunk létre, vagy hozzáköthetjük egy radioaktív anyaghoz vagy gyógyszerhez, hogy egy radioaktív gyógyszert vagy gyógyszert hozzunk létre. Az immunotoxinok és radioaktív gyógyszerek ellenanyagból való előállításának eljárásai jól ismertek [Cancer Treatment Reports 68, 317-328 (1984)].

Az is elterjedt vélemény, hogy az egy mikroorganizmus-mentes állatból származó poliklonális ellenanyagok is használhatók immunesszékben, és a szokványos állatokból származó poliklonális ellenanyagokkal összehasonlítva jobb eredményt adnak. A mikroorganizmus-mentes állatból származó poliklonális ellenanyagokat egy mikroorganizmus-mentes állat felhasználásával állíthatjuk elő az előzőekben leírt módon, immunizációs technikákat alkalmazva, az előzőekben leírt módon, majd a poliklonális ellenanyagokat szokványos technikákkal kinyerve az állatból (azaz például elválasztva a szérumot az állatból).

Fibrin-specifikus monoklonális ellenanyag

5.1 Háttér

A hemosztatikus mechanizmus egy komplex fiziológias válasz, ami a roncsolt vérerek javításának mechanizmusában vesz részt. A hemosztázist a roncsolt érfalak, a vérlemezkék és a véralvadási rendszer közötti ko-operatív kölcsönhatások révén

érjük el. A véralvadási rendszernek az a szerepe, hogy extenzív fibrinhálót biztosítson a vérlemezke dugó stabilizálására és rögzítésére, ami a roncsolt ér szubendoteliális szerkezetén állt össze. A keringő fibrinogénből az oldhatatlan fibrin mátrix kialakulása különböző reakciók komplex szekvenciájának az eredménye, ami a trombinnak a megkívánt pontban való robbanásszerű képződésében kulminál. A véralvadás egy amplifikációs folyamat, ami enzimes láncreakciókat tartalmaz, amelyekben proenzimek (véralvadási faktorok) aktiválódnak egymás után aktív enzimekké. Számos olyan fiziológias mechanizmus létezik, amely szabályozza a vérrögzépződésben szerepet játszó fibrin polimerizációs folyamatot. Ezek közé tartozik a trombin inhibitor antitrombin III (ATIII), a protein C, a prosztaciklin és a fibrinolitikus rendszer különböző komponensei, azaz például a szöveti plazminogén aktivátor (t-PA), és annak a gyorsan ható inhibitora (PAI).

Az Astrup által javasolt homeosztázis hipotézis [Astrup, T.: Blood 11, 781-806 (1956)] azt állítja, hogy egyensúly van a fibrinképződés (véralvadás) és a fibrin feloldódása (fibrinolízis) között. A normális vagy egészséges állapotban ezek a funkciók kiegyensúlyozódnak. Ha azonban a hemosztatikus folyamat kiegyensúlyozatlan, akkor a véralvadás és a fibrinolízis patológiásan fejeződik ki trombózis és hemorrágia formájában. A patológiás trombózis vagy trombotikus betegség klinikai megjelenés formái rendkívül különbözőek, ide tartozik a disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC), a mélyvénás trombózis (DVT), az artériás és a vénás trombózis. A tromboembolizmus és a többi érbetegség (azaz például az ateroszklerózis) trombotikus komplikációi a fő artériák elzáródását eredményezhetik, ami szervi ischémiát és az azt kísérő életveszélyes állapotokat idéz elő, mint amilyen például a cerebrovaszkuláris sérülés (sztrók), a szívinfarktus, stb.

A fibrinolitikus folyamat tartalmazza egy inaktív zimogén, plazminogén konverzióját a proteolitikus enzimmé, plazminná, a plazminogén aktivátorok néven ismert ágensek működése révén. A fiziológiás fibrinolízis molekuláris mechanizmusát még nem értjük teljesen, de azt tudjuk, hogy a fibrinképződés során a plazminogén a fibrinhez kötődik, ahol a plazminogén aktivátorok, azaz például a t-PA aktiválhatják. Így módon a plazminképződés a vérrögben játszódik le, ahol meg van védve a plazmin fő fiziológiás inhibitorától, az alfa₂-antiplazmintól.

A plazminnal való érintkezés hatására a fibrinogén és a fibrin lebomlási termékeire bomlik le. A fibrinogén X és Y fragmenseire bomlik le, majd a plazminnal való további érintkezés hatására D és E fragmensek is keletkeznek. A fibrin a keresztkötéseket nem tartalmazó fibrinből X,Y,D és E fragmensekre bomlik le, a keresztkötéseket tartalmazó fibrinből keresztkötéses D-dimer, D-D/E komplex, Y dimer, Y-D-dimer és X oligomer keletkezik.

A trombotikus rendellenességek markereinek vizsgálatát egészen a legutóbbi időkig poliklonális ellenanyagokkal végezték mind a radioimmúnesszékekben mind a latex agglutinációs típusú vizsgálatokban. Ezekről a vizsgálatokról kimutatták, hogy rendkívül megbízhatatlanok [Gaffney, P.J.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 408, 407-423 (1983)]. A monoklonális ellenanyagokat alkalmazó, sokkal specifikusabb és érzékenyebb immúnesszék (azaz például ELISA-k) általános gyakorlattá válnak a klinikai laboratóriumok gyakorlatában. Ezeknek a diagnosztikai vizsgálatoknak a korlátozó tényezője a használt monoklonális ellenanyag specifitása és affinitása. A felborult hemosztázis bármely potenciális indikátora elleni nagyon specifikus ellenanyagok előállítását mind az indikátorok alacsony szintje gátolja, mind az adott markernek a prekursorával való antigén jellegű rokonsága, amely prekursor sokkal magasabb szinten van jelen a plazmában. Ilyen példa például a komplexképződés az enzimek és inhibitoraik között, azaz például a trombin-antitrombin III, a plazmin-alfa₂-



antiplazmin, a t-PA-PAI-1. Az ilyen komplexképződés által létrehozott új antigén helyek száma rendkívül alacsony, és ez az immunológiai próbák (azaz például a monoklonális ellenanyag) alkalmazását megnehezíti.

Hasonlóképpen, egy monoklonális ellenanyagnak a fibrinnel való kapcsolódásával kapcsolatos fő probléma a szerkezeti és konformációs hasonlóság a fibrin és annak fiziológiai prekursora, a fibrinogén között. Úgy becsülik, hogy a kovalens szerkezet konzerválódása, amikor a fibrinogén fibrinné konvertálódik, nagyobb mint 98% [Plow, E.F. és mtsai.: *Semin. Thromb. Haemostas.* 8, 36 (1982)], és ennek következtében a fibrin molekulán levő epitopoknak valójában csak egy kis százaléka neoantigén (és egyedileg jellemző a fibrinre). Számos megközelítés, amit a fibrin ellenanyagok előállítására adaptáltak, arra koncentrált, hogy az állatokat odott fibrin fragmensekkel és szintetikus peptidekkel immunizálják, amik utánozzák a fibrinen kilakult neoantigén helyeket [Hui, K.Y. és mtsai.: *Science* 22, 1129-32 (1983); Scheefers-Borchel, V. és mtsai.: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 82, 7091-95 (1985); Elms, M.J. és mtsai.: *Thromb. Haemostas.* 50, 591-94 (1983); Kurdryk, B. és mtsai.: *Mol. Immunol.* 21, 89-94 (1984)]. Azonban az a vélemény alakult ki, hogy ezeknek az ellenanyagoknak a kötőhelyei konzerválódnak a fibrin lebomlási folyamata során, és ennél fogva ezek az ellenanyagok képesek ezekhez a fibrin lebomlási termékekhez is kötődni.

A jelen találmány lehetővé teszi, hogy valaki teljesen eltérő megközelítést alkalmazzon, és a teljes fibrin antigént használja, összefüggésben az antigén-mentes (AF) állat fokozott immunológiai érzékenységevel, egy fibrinspecifikus monoklonális ellenanyag előállítására. A jelen találmány céljai szempontjából egy fibrinspecifikus monoklonális ellenanyag a fibrinhez kötődik és nem a fibrinogénhez, a fibrinogén degradációs termékekhez vagy fibrin degradációs termékekhez.

5.2 Anyagok és módszerek

5.2.1 Állatok

Mikroorganizmus-mentes BALB/cAnN egereket a Wisconsini Egyetemen fenntartott mikroorganizmus-mentes (GF) tenyészetből szereztük be. Az állatokat GF körülmények között szállítottuk a mi létesítményünkbe. Az antigén-mentes (AF) tenyészetet úgy indítottuk, hogy természetes adalékanyagokat tartalmazó L-485 tápon tartott terhes GF egereket [Pleasants, J.P. és mtsai.: J. Nutr. 116, 1949-1964 (1986) egy AF izolátorba vittük át, ahol az egereket azonnal kémiaiilag meghatározott (CD) AF táplálékra állítottuk át. Ezeknek az utódait, amelyek soha nem kerültek közvetlen érintkezésbe természetes adalékanyagokat (NI) tartalmazó táplálékkal elválasztottuk az anyatejtől, és CD táplálékra állítottuk át. Ezeket tekintjük az első AF generációnak. Az AF egereket addig pároztattuk párokban, ameddig a nőstény nem lett szemmel láthatóan terhes; a hímeket azután altávolítottuk, hogy biztosítsuk, hogy a nőstény megkapja a teljes napi lipidszükségletét. Az utódokat 24 napos korukban választottuk el.

5.2.2 Állattartás

Az AF tenyészpárokat párosával egy standard, 28x17,8x12,7 cm-es polikarbonát egérketrec egyik felében tartjuk. A ketrec alját kivágtuk, és egy hamis, rozsdamentes acélszita aljjal helyettesítjük. Egy hosszanti rozsdamentes acél elválasztót erősítünk a műanyag ketrec végeihez, eléggé kinyúlva a ketrec alatt és fölött, hogy a helyén tartson egy rozsdamentes drót fedelet. Ezt a bemélyedéses fedelet, amely általában illeszkedik a ketrecbe, megfordítjuk, hogy több hely maradjon a hamis fenék fölött. Megfelelő méretű rozsdamentes acél gallárokat hegesztünk a fedő tetejéhez, amelyek tartják a 60 ml-es tápüvegeket. A végeken négy rozsdamentes acél csészét hegesztünk a hosszanti osztó oldalaihoz, a hamis

fenék és a tető között félúton. A ketrecek leírása megjelent a szakirodalomban [Pleasant, J.R.: The germfree system for aging and immunity, CRC Handbook of Immunology in Aging, szerk.: Kay, M.M. B.S. Makinodan, T., 257-297, CRC Press, Boca Raton, Fl. (1981)]. A táppalackok barna üvegből készülnek. Mind a táp- mind a vizespalackoknak műanyag fedelük van, a közepükbe fúrt lukakkal. A palackokat megtöltjük, majd a gallérjukba fordítjuk. A lipid kiegészítést naponta mérjük a rozsdamentes acél csészékbe. Egy műanyag edényt teszünk minden egyes csésze alá, hogy felfogjuk a hulladékot.

A mind alomként mind táplálékként szolgáló szűrőpapír 41. számú Whatman hamumentes szűrőpapír, amit hulladékként vásárolunk (Sargent Welch). Az alomhoz a csíkokra vágjuk. A papír felvágatlan lapjait arra használjuk, hogy feltakarítsunk velük az izolátor belsejében. A papírt 25 percig autoklávozzuk 121 °C-on, vagy besugározzuk (4,5 Mrad), műanyag zsákokban. Mindegyik egér elég papírt kap ahhoz, hogy befedje a ketrec egyik végét. Ha ndeves, sárga vagy piszkos lesz, kicseréljük.

A ketreceket egy 1,37x0,6x0,6 méteres flexibilis Trexler típusú izolátorban tartjuk [Trexler, P.C.: Lab. Anim. Care, 13, 572-581 (1963)], standard gnotobiotikus technológia alkalmazásával [Wostmann, B.S. szerk.: Gnotobiotics: Standards and Guidelines for the Breeding, Care and Management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. (1970)]. Az izolátorokat 21 °C hőmérsékletű szobákban tartjuk, 12 órás fényciklussal.

Egy 2,5 cm átmérőjű, 7,55 cm hosszú Tygon csövet erősítünk az izolátor tetejéhez, és vinil lezárókkal zárjuk le mind a tetején, mind az alján. Itt lehet sterilen szűrve bevinni a tápot, vizet és olajat.

5.2.3 Táplálék

Az 1. táblázaton látható mind a táplálék összetétele mind az adalékanyagok ultraszűrt Milli-Q vízben (Millipore, MA) való feloldási sorrendje. Az aminosavak és a szacharóz Sigma szövettenyésztési minőségű. A vitaminok is a Sigma-tól származnak, a tiszta retinil-palmitát kivételével, amellyel a Hoffman-LaRoche, Inc. lát el bennünket (Nutley, NJ). A többi reagens minőségét a Fisher igazolja, vagy egy hasonló cég. A komplett vízben oldódó táplálékot egy Amicon Diaflo TC3 ultraszűrőn szűrjük át, három, 150 mm átmérőjű Pm10 membránt (Amicon) alkalmazva.

Az ultraszűrő membránok vágási értéke 10,000 dalton. Az összeállított ultraszűrő berendezést használat előtt sterilizzük, 0,15%-os nátrium-hipoklorit oldatot bocsátva át rajta, majd alaposan átmosva a berendezést. Az ultraszűrt táplálékot az AF izolátorba egy 0,3 μ m-es Nylon (MSI) szűrőn át juttatjuk be, amely szűrő egy autoklávozott nyomásálló szűrőtartóban van, és a leeresztő csövét egy No.6 Neoprén stopperbe illesztjük be. Ebből a célból a felső vinil stoppert eltávolítjuk a Tygon csőről, az izolátor tetejéhez erősítve, majd a cső belsejét 2%-os perecetsav oldattal permetezzük be sterilizálás céljából, amely 0,1% alkil-aril szulfonátot tartalmaz. A szűrőtartó stoppert a felső stopper helyére illesztjük. 20 perc elteltével az alsó stoppert eltávolítjuk (az izolátoron belül), majd a táplálékot vagy a vizet az izolátorba szűrjük, 138 kPa nyomáson.

A lipid kiegészítő összetételét a 2. táblázatban adjuk meg. A szója trigliceridek azokból a metilészterekből készülnek, amelyeket vákuumdesztillációval állítunk elő, olyan hőmérséklet-tartományban, amely palmitát-linoleát észtereket eredményez. Ezeket az észtereket azután glicerinnel átészterezzük, a kevert trigliceridek előállítása céljából (Nu-Check Prep, Elysian, MN). A zsírban oldódó vitaminokat az izolátorba való szűrés előtt adjuk a triglicerid keverékhez, mikor is a hőmérsékletét

50 °C-ra emeljük, majd az izolátorba szűrjük, ugyanazzal az eljárással, amit a táplálék vízdoldható részénél használtunk.

A lipidfelvétel a mérések szerint 0,375 ml/nap. A lipid kiegészítő mennyiségének növelése nagymértékben csökkenti az újszülött egerek pusztulási arányát. Az átlagos alomméret is a szokványos körülmények között tartott állatok szintjére nőtt. A szoptatós nőtények a normál lipid kiegészítés kétszeresét kapják.

1. Táblázat

Az L489E14SE kémiaiilag meghatározott táp összetétele és készítése

<u>Adalékanyag</u>	<u>Mennyiség (g/100 g adalékanyag)</u>
192 ml Milli-Q vízhez az alábbi anyagokat adjuk, 70 °C-on:	
Leucin	1,9
Fenilalanin	0,74
Izoleucin	1,08
Metionin	1,06
Triptofán	0,37
Valin	1,23
Aszparagin	0,91
Arginin HCl	0,81
Treonin	0,74
Lizin HCl	1,77
Hisztidin HCl	0,74

Ezt az oldatot 45 °C-ra hűtjük, majd az alábbi anyagokat adjuk hozzá:

Glicin	0,59
Prolin	1,48
Szerin	1,33
Alanin	0,59
Nátrium-glutamát	3,40
L-tirozin-etilészter HCl	0,62
Vasglükonát	0,05

35D sók ¹	0,105
Nátrium-szelenit ²	0,074

Az oldatot 5 °C-ra hűtjük, és az alábbi anyagokat adjuk hozzá:

Kalcium glicerofoszfát	5,22
Magnézium glicerofoszfát	1,43
Kalciumklorid 2H ₂ O	0,185
Nátriumklorid - Káliumjodid (KI) keverék, amely 680 mg KI-t tartalmaz	0,086
111E5 B-vitamin keverék ³	0,09
B12 vitamin ⁴	1,20 mg
Kolinklorid	0,31
Káliumacetát	1,85

108 ml Milli-Q vízhez vízmentes

D-dextrózt adunk	71,78
------------------	-------

Az oldatokat 5 °C-ra hűtjük, majd ultraszűréshez egyesítjük.

¹ A 3. táblázatban megadott 35D sókeverék

² A 35D-ben levő nátrium-szelenáton kívül hozzáadva

³ A 4. táblázatban megadott 111E5 B-vitamin keverék

⁴ A 111E5 B-vitamin keverékben levő B12-n kívül hozzáadva

2. Táblázat

A LADEK 69E6 lipid kiegészítő összetétele

<u>Adalékanyag</u>	<u>Mennyiség per napi dózis*(0,375 ml)</u>
Tisztított szója triglicerid ¹	0,33 g
Retinil-palmitát	6,45 mg (11,7 NE)
Kolekalciferol	0,0288mg(1,15 NE)
2ambo-alfa-tokoferol	3,3 mg

Zambo-alfa-tokoferol-acetát	6,6 mg
Phyllokinon	72 mg

* A szoptatós egerek a felnőtt dózis kétszeresét kapják.

1 Összetétele:	12% palmitát
	1,5% sztearát
	24% oleát
	55% linoleát
	8% linolenát

3. Táblázat

A 3D sókeverék összetétele

<u>Só</u>	<u>Mennyiség (per 300 ml táp) (mg)</u>
Mn(acetát) ₂ x 4H ₂ O	55,4
ZnSO ₄ x H ₂ O	40,6
Cu(acetát) ₂ x H ₂ O	3,7
Cr(acetát) ₃ x H ₂ O	2,5
NaF	2,1
SnSO ₄ x 2H ₂ O	0,37
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	0,37
NiCl ₂ x 3H ₂ O	0,37
Co(acetát) ₂ x 4H ₂ O	0,11
Na ₃ VO ₄	0,22
Na ₂ SeO ₃	0,096

4. Táblázat

A 111E5 B vitamin keverék összetétele

<u>Adalékanyag</u>	<u>Mennyiség (mg)/300 ml táp</u>
Tiamin HCl	1,23
Piridoxin HCl	1,54
Biotin	0,25
Fólsav	0,37
B12 vitamin	0,37
Riboflavin	1,85
Niacinamid	9,2
i-inozit	61,9
Kalcium-pantotenát	12,3

A víz Milli-Q ultraszűrt minőség, és ugyanúgy szűrjük az izolátorba mint a táplálékot.

5.2.4 Mikrobiológiai ellenőrzés

Az antigén mentes rendszernek leellenőrizzük a mikrobiológiai fertőződését, a Wostmann által szerkesztett kiadványban található előírások szerint [Wostmann, B.S., szerk.: Gnotobiotics Standards and guidelines for the breeding care and management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. (1970)]. Röviden, az izolátor belsejében levő táplálékkal és vízzel nedvesített tamponokat használunk székletketet nyelésére, frissen az egérből, valamint az egyes ketrec alatt felhalmozódott hulladékból. Keneteket veszünk az izolátor falairól is, főleg a belépő kapu körül. Mindig két párhuzamosban vesszük a keneteket. Egy sorozatot közvetlenül mikroszkóppal



vizsgálunk meg, Gram festés után, hogy tartalmaz-e baktériumokat és gombákat. A tamponok második sorozatát a mikroorganizmusok kimutatására használjuk. Három hét eltelte után mondjuk ki egy tenyészeetről, hogy negatív.

A mikrobiológiai vizsgálatokat körülbelül minden második héten hajtjuk végre, vagy néhány nappal azután, hogy az izolátorba új anyagot juttattunk be.

5.3. Monoklonális ellenanyagok előállítása antigén-mentes egerek alkalmazásával

Az előzőekben ismertetett antigén-mentes egereket használjuk limfocita donosokként monoklonális ellenanyagok előállítása során. Minden antigén oldatát steril körülmények között készítjük el, laminárboxban.

Az alábbi protokollt az AF egerek immunizálására adaptáltuk. Az antigént (25-50 µg) 100 µl steril sóoldatban oldjuk, majd azonos térfogatú Freund féle komplett adjuvánssal (FCA) emulgeáljuk. 1000 egység interferont adunk az antigén oldatához, mielőtt elkészítjük az emulziót. Steril fecskendőket és tűket használunk minden immunizáláshoz. A fecskendőket a belépő kapun keresztül juttatjuk be, ahol 2%-os perezetsav oldattal permetezve sterilizzük. Erősítő injekciókat adunk, ugyanazt az antigén mennyiséget használva, az FCA-t Freund féle inkomplett adjuvánssal helyettesítve. Összesen három erősítő immunizálást végzünk, háromhetes intervallumokban. A végső erősítést (adjuváns nélkül) 4-7 nappal a fúzió előtt adjuk be. Minden immunizálást intraperitonálisan végzünk. Az egereket a fúzió napján távolítjuk el az izolátorból, majd közvetlenül utána CO₂ belélegeztetéssel elaltatjuk őket. A lépeket eltávolítjuk, majd a szplenocitákat fuzionáltatjuk az NS1 egér mielóma sejtekkel, standard hibridóma technológiát alkalmazva.

5.4. Az antigén-mentes állatrendszer alkalmazása fibrin-specifikus monoklonális ellenanyag előállítására

Az antigén-mentes rendszert használjuk fibrin-specifikus monoklonális ellenanyag előállítására. Az ellenanyag nagyon specifikus, és nem ismeri fel a fibrinogént, a fibrin bomlástermékeket, vagy a fibrinogén bomlástermékeket. A hibridóma sejtvonalat humán fibrinnel immunizált, antigén-mentes BALB/c egerekből származó szplenociták és NS1 mielóma sejtek fúziójával állítjuk elő.

5.4.1 Az immunizálás menete

Három nyolchetes, antigén-mentes nőstény egeret immunizálunk 33 µg humán fibrinkészítménnyel. A készítmény fibrin faggyással aprított minta, amit a következőképpen állítunk elő:

A humán fibrinogént fibrinné alakítjuk trombin és XIIIa faktor alkalmazásával. A fibrinrögöt azután cseppfolyós nitrogénben lefagyasztjuk, majd mechanikai tördeléssel nagyon finom port állítunk elő belőle. A fagyasztással tördelt fibrinből sóoldatban szuszpenziót készítünk, így kapunk a keresztkötéses XL-Fn fibrinből egy tiszta oldatot, amelynek végkoncentrációja 1 mg/ml. Ebből a fibrin antigénből 33 µl-t adunk be az állatoknak az immunizáláshoz. Az antigén oldat térfogatát 100 µl-re állítjuk steril sóoldattal, majd az előző részben ismertetett módon FCA-val emulgeáljuk. Két erősítő immunizálást végzünk, háromhetes időközönként, ugyanazt a mennyiségű antigént használva Freund féle inkomplett adjuvánsban. A végső erősítő injekciót négy héttel a fúzió előtt adjuk be. Ugyanazt a mennyiségű antigént használjuk, és az adjuvánst sóoldattal helyettesítjük.

5.4.2 Az ellenanyag kimutatása és meghatározása

A monoklonális ellenanyag mennyiségi és minőségi meghatározását egy enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálattal (ELISA) végezzük. Az ELISA-kat egy 96-lukas PVC lemezre (Costar) immobilizált humán fibrinnel végezzük. A fibrinnel borított vizsgáló lemezeket úgy állítjuk elő, hogy 100 µl fibrinogén oldatot (Kabi L minőség) (50 µg/ml borát/sóoldat puffer) inkubálunk éjszakán át 4 °C-on. A megkötetlen fibrinogént PBS-sel mosva távolítjuk el, amely 0,05% Tween 80-at tartalmaz (PBS-Tween). Az egyes lemezekre kötött fibrinogént fibrinné alakítjuk, oly módon, hogy 37 °C-on 1 óra hosszat 100 µl trombin oldattal inkubáljuk (10 NIH egység/ml), amely 2 mmol/l CaCl₂-t tartalmaz. Az ellenanyagra a standard kalibrációs görbét úgy készítjük el, hogy olyanm ellenanyag készítményt használunk, amely SDS-PAGE alapján homogén.

Ahhoz, hogy megakadályozzuk az aspecifikus kötődést, a fibrinnel borított lemezeket 1%-os BSA oldatban inkubáljuk (PBS-ben készült, pH=7,4). Ezután 100 µl, ellenanyagot tartalmazó oldatokat adunk hozzá, majd 90 percig 37 °C-on inkubáljuk. Az eljárásban szereplő egyes lépések után a lukakat alaposan mossuk PBS-Tween-nel. A megkötött ellenanyagot úgy mutatjuk ki, hogy alkalikus foszfatázhoz konjugált nyúl anti-egér ellenanyag oldatának (Sigma) 1000-szeres hígítását (PBS, 1% BSA, pH=8,0) adjuk hozzá.

5.4.3. Hibridómák előállítása, fúzió

Az egereket CO₂ belégzéssel elaltatjuk, majd azonnal kivesszük a lépüket. Az immunizált egerekből származó lépsejteket polietilénglikol 4000 (3000-7000) fúziós ágenssel fuzionáltatjuk. A sejteket HAT szelekciós táptalajban inkubáljuk 1 hétig, T lombikokban. Ezután a sejteket 5x96 lukas lemezekre szélesztjük, amelyből 93 lukban figyelhető meg növekedés. Ezek közül 19 luk volt pozitív a fibrin antigénre.

Ezek közül a klónok közül egy, az F492D8 (később az MH1 elnevezést kapta) olyan ellenanyagot termel, amely felismeri a fibrin antigént, de nem a keresztreakciót a fibrinogénnel. Ezt a bizonyos klónt, az MH1-et határhígítással háromszor újra klónoztuk, a harmadik klónozási fázist 1 sejt per luk koncentrációban hajtva végre. Amikor a sejtvonal stabilizálódott, szérummentes táptalajra vittük ki, ahol körülbelül 7,5 mg/l szinten termeli az ellenanyagot.

5.4.4. Az ellenanyag tisztítása

A tisztítás előtt (négyliteres sarzsok) a tenyészet felülúszóját lecentrifugáljuk a sejttörmelék eltávolítása céljából, majd átszűrjük egy 0,8 μm -es Nylon membránon, hogy minden megmaradt részecskét eltávolítsunk belőle. A hibridóma felülúszót 4 ° C-on 500 ml térfogatra töményítjük, spirális ultraszűrő berendezést használva YM típusú membránnal (Amicon), amelynek a vágási értéke 30,000 dalton. A puffercserét 20 mmol/l 2(N-morfolin) etánszulfonsavra (MES, pH=6) (A puffer) diaszűrővel végezzük, a gyártó előírásai szerint. Miután tovább töményítettük 100 ml végtérfogatra, az ellenanyagoldatot egy 0,451 mikronos nylon membránon szűrjük át, majd tovább tisztítjuk. A töményített ellenanyagoldatot folyadék-kromatográfiával tisztítjuk Waters HPLC kromatográffal, egy 7,75 mm x 10 cm-es ABx oszlopon (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). Az oszlopot az A pufferrel hozzuk egyensúlyba, majd a mintát (100 ml) 1,0 ml/perc áramlási sebességgel visszük fel az oszlopra. Az oszlopot alaposan mossuk az A pufferrel, majd az ellenanyagot leoldjuk az oszlopról egy A puffer - 100% B puffer (1 mol/l nátrium-acetát, pH=7) gradienssel, 1 ml/perc áramlási sebességgel. 2 ml-es frakciókat szedünk, majd a MAb-ot tartalmazó frakciókat (ELISA-val meghatározva) egyesítjük és foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS: 20 mmol/l nátrium-foszfát, 150 mmol/l nátrium-klorid, pH=7,4) szemben dializáljuk, majd -20 °C-on tároljuk >1 mg/ml koncentrációban. Az ABx oszlopot úgy regeneráljuk,

hogy 5 percig mossuk 100%-os B pufferrel, majd újból egyensúlyba hozzuk 15 oszloptérfogat A pufferrel.

5.5 A fibrinspecifitás meghatározása

A fibrinspecifitást először úgy határozzuk meg, hogy a hibridóma felülúszókat külön vizsgáljuk fibrinrel és fibrinogénnel borított mikrotiter lemezekben. Csak azokat az ellenanyagtermelő sejtvonalakat fogadjuk el, amelyek nem adnak keresztreakciót a fibrinogénnel.

A fibrinspecifitás további megerősítésére egy kompetíciós vizsgálatot végzünk oldatban levő fibrinogénnel, ezzel megerősítve, hogy az ellenanyag nem ismeri fel az oldatban levő fibrinogént.

A fibrinspecifitás megerősítésére használt kompetíciós vizsgálatot az előzőekben az ELISA vizsgálatra leírt módon hajtjuk végre, az ellenanyagot előinkubálva oldatban levő fibrinogénnel. Röviden, a hibridóma felülúszót 37 °C-on inkubáljuk 30 percig fiziológiás koncentrációjú (4 mg/ml) fibrinogén oldattal, amely BSA-t tartalmaz (10 mg/ml), hogy megelőzzük az ellenanyag aspecifikus kötődését a fibrinogénhez. A fibrinogén/ellenanyag oldatot azután egy mikrotiter lemez lukáiba visszük át, amelyeket fibrinrel borítottunk. GlyProArgPro (GPRP) peptidet adunk a fibrinogén inhibitorhoz, hogy megakadályozzuk a fibrinogén lehetséges polimerizációját a visszamaradt trombinnal a fibrines lukákban. A vizsgálatot azután szokványos ELISA formájában végezzük el, egy immobilizált antigénhez kötött ellenanyagra. Az összes olyan kísérletben, amelyben az MH1 ellenanyag fibrinspecifitását vizsgáljuk, egy második, 45J jelű ellenanyagot használunk kontrollként. A 45J keresztreakciót ad a fibrinrel és a fibrinogénnel.

5.5.1. A fibrinogénnel való keresztreakció meghatározása

5.5.1.1. Immobilizált fibrin és fibrinogén

Az MH1 sejtvonal egy rágcsáló monoklonális ellenanyagot termel, amely keresztreakciót ad a fibrinrel, ha az egy PVC mikrotiter lemez felszínére van rögzítve (5. táblázat). Ugyanabban a vizsgálatban az ellenanyag nem ismeri fel a lemezre immobilizált fibrinogént. Amint az 5. táblázatban levő adatok mutatják, az immunreaktivitás drasztikus növekedést mutat, ha a fibrinogént a trombin fibrinné alakítja, világosan mutatva, hogy a fibrin molekulán vagy exponálódott vagy létrejött egy neoepitop. A kontroll ellenanyag azonban világosan egy olyan epitopot ismer fel, amely megőrződik akkor is, amikor a fibrinogén fibrinné konvertálódik.

5.5.1.2. Kompetíciós vizsgálat fibrinrel és fibrinogénnel

Az MH1 ellenanyag fibrinspecifitását tovább igazoljuk egy kompetíciós vizsgálatban, amelyben a hibridóma felülúszót előinkubáljuk egy fibrinogén oldattal (végkoncentráció 4 mg/ml), mielőtt elvégezzük az ELISA-t a fibrinrel borított lukakon. Mivel ilyen magas fibrinogénszintet használtunk ebben a kompetíciós vizsgálatban (az ellenanyag koncentráció 500-szorosa), 10 mg/ml végkoncentrációjú BSA-t adunk az oldathoz. A GPRP peptidet hozzáadjuk, hogy megakadályozzuk a fibrin polimerizációját a fibrinrel borított lukakon marady trombin hatására. Ennek a vizsgálatnak az eredményei azt mutatják, hogy az MH1 ellenanyag nem ismeri fel az oldatban levő fibrinogént (6. táblázat).

Feltételezve, hogy 400 ng fibrin kötődik a mikrotiter lemez minden egyes lukához, ez azt jelenti, hogy az ebben a bizonyos kompetíciós vizsgálatban használt fibrinogénszint 1000-szeres fölösleget jelent a megkötött fibrin antigénnel szemben. Emellett az ellenanyagszint 400-szoros fölöslegét jelenti a szöveti felülúszóban.

5. Táblázat

Az MH1 ellenanyag keresztreaktivitása fibrinogénnel és fibrin antigénnel

<u>MAb</u>	<u>A_{405nm}/30 perc</u>	
	<u>Fibrin</u>	<u>Fibrinogén</u>
MH1	0,90	0,025
45J	1,65	1,50

6. Táblázat

Az MH1 ellenanyag keresztreaktivitása fibrinnel és fibrinogén jelenlétében

<u>MAb</u>	<u>A_{405nm}/30 perc</u>	
	<u>+fibrinogén</u>	<u>-fibrinogén</u>
MH1	1,24	1,27
45J	0,438	1,74

5.5.2. A keresztreaktivitás meghatározása a fibrin(ogén) bomlástermékekkel

A fibrinogén bomlástermékeket (FDP-k) úgy állítjuk elő, hogy a fibrinogént plazminnal inkubáljuk 37 °C-on, 10 perctől 3 óráig terjedő időtartamban. A kívánt időpontban a fibrinogenolízist megállítjuk, Trasylol (100 Kallikrein inhibitor egység/ml) és 20 mmol/l epszilon aminokapronsav (EACA) hozzáadásával.

A keresztkötést tartalmazó fibrin bomlástermékeket (XLFPD-k) úgy állítjuk elő, hogy trombint (4 NIH egység/ml) adunk egy fibrinogén oldathoz (5 mg/ml) TRIS-szel pufferelt sóoldatban (TBS, pH=7,4, 50 mmol/l TRIS HCl, 150 mmol/l NaCl), amely 10 mmol/l CaCl₂-t, plazminogént (0,25 mg/ml) és urokinázt (50 NE/ml). A keveréket 37 °C-on inkubáljuk, majd a plazminos emésztést különböző időpontokban állítjuk le, amint az az előzőekben az FDP-kre ismertettük.

Ahhoz, hogy meghatározzuk az ellenanyag keresztreaktivitását a fibrin bomlástermékekkel és a fibrinogén bomlástermékekkel, a megfelelő bomlástermékeket mikrotiter lemezekre rögzítjük, majd ELISA-t végzünk a szokványos módszerekkel. Amint azt a 7. táblázatban látható eredmények igazolják, az MH1 ellenanyag nem lép keresztreakcióba semmilyen plazmin által létrehozott fibrinogén bomlástermékkel. Amint az a 8. táblázatból látható, az ellenanyag nem lép reakcióba az XL-fibrin bomlástermékekkel. Ezt akkor is megfigyelhetjük, amikor az ellenanyag keresztreaktivitását Western blott elemzéssel vizsgáljuk.

Az a következtetés vonható le, hogy az ellenanyag felismer az érintetlen fibrin molekulán egy olyan epitopot, amely nincs jelen, vagy nem exponálódik a prekursor molekula, a fibrinogén felszínén. Az epitop láthatóan elbomlik a keresztkötéses fibrin plazminos emésztése hatására, amint azt a 8. táblázatban levő adatok mutatják.

Ezek szerint az MH1 ellenanyag egy fibrinspecifikus monoklonális ellenanyag, amelyet a következők szerint lehet meghatározni:

A jelen találmány szerint egy fibrinspecifikus monoklonális ellenanyag egy olyan monoklonális ellenanyag, amely:

1. a fibrinnel és fibrinogénnel való keresztreaktivitás mérésére szolgáló kompetíciós vizsgálatban, amint azt az előzőkben ismertettük, a monoklonális ellenanyagnak körülbelül 75%-nál kisebb, előnyösen körülbelül 10%-nál kisebb a keresztreaktivitása a fibrinogénnel, ha a fibrinogént 1000-szeres fölöslegben használjuk a fibrinnel összehasonlítva,
2. a keresztkötéses fibrinnel és fibrin bomlástermékekkel való keresztreaktivitás mérésére szolgáló vizsgálatban a monoklonális ellenanyagnak a körülbelül három órán át plazminnal emésztett fibrinnel való reaktivitása kisebb mint körülbelül 50%, előnyösen kisebb mint körülbelül 40%, a nulla időpontban a monoklonális ellenanyag és a fibrin reaktivására számítva, és

3. a keresztkötéses fibrinnel és fibrin bomlástermékekkel való keresztreaktivitás mérésére szolgáló vizsgálatban a monoklonális ellenanyagnak a körülbelül négy órán át plazminnal emésztett fibrinnel való reaktivitása nem nagyobb, mint a nulla időpontban a monoklonális ellenanyag és a fibrin reaktivitása.

Az MH1 ellenanyag további jellemzésére a fibrinhez való affinitását kell meghatározni. Az affinitást Scatchard elemzéssel határozzuk meg [Frankel és mtsai.: Molecular Immunology, 16, 101-106 (1979)], ¹²⁵I-vel jelzett ellenanyagot alkalmazva. A K_D disszociációs konstansra kapott érték $6,7 \times 10^{-10}$ mol/l. Ez az affinitás körülbelül 5000-szer erősebb mint a t-PA affinitása a fibrinhez.

Azt is meghatároztuk Western immunblott elemzéssel, hogy az MH1 ellenanyag nem ad keresztreakciót a fibrinogén $A\alpha$, $B\beta$ vagy gamma láncával. Emellett azt is kimutattuk ugyanazzal az elemzési módszerrel, hogy az MH1 ellenanyag nem ad keresztreakciót a trombinnal kezelt fibrinogén $A\alpha$ vagy $B\beta$ láncával. (A fibrinogén trombinos kezelése a fibrinopeptid A és a fibrinopeptid B felszabadulását eredményezi az $A\alpha$ illetve a $B\beta$ láncról, ezáltal jön létre a fibrin α és β lánc.)

7. Táblázat

Az MH1 ellenanyag keresztreaktivitása fibrinogén bomlástermékekkel

<u>Plazmin emésztési idő</u>	<u>$A_{405nm}/30$ perc</u>	
	<u>MH1</u>	<u>45J</u>
0	0,15	1,037
10	0,10	nm
20	0,11	1,02
40	0,11	0,410
60	0,10	0,330
240	0,09	0,300

8. Táblázat

Az MH1 ellenanyag keresztreaktivitása fibrin bomlástermékekkel

<u>Plazmin emésztési idő (óra)</u>	<u>A_{405nm}/30 perc</u>	
	<u>MH1</u>	<u>45J</u>
0	0,890	1,40
3	0,354	1,0
5	0,310	0,77

Emellett, ahogy a 7. táblázatban szereplő eredmények mutatják, a kontroll ellenanyag, a 45J ellenanyag, kötődik a fibrinogénhez és nem ad keresztreakciót a fibrinogén bomlástermékekkel. Ennek megfelelően egy ilyen monoklonális ellenanyag egy fibrinogén-specifikus monoklonális ellenanyag, és a jelen találmány egy másik tárgyat képezi. A fibrinogén-specifikus monoklonális ellenanyag bármely olyan immunológiai vizsgálatban használható, amellyel *in vitro* meg lehet határozni a plazma fibrinogén szintjét. A 45J ellenanyagot jellemzi továbbá, hogy megállapítottuk, miszerint a 45J epitop a fibrinogén α láncán található, körülbelül a 206-424-es aminosavak között, legvalószínűbb, hogy a 207-231-es aminosavak között. A jelen találmány szempontjából egy fibrinogén-specifikus monoklonális ellenanyag egy olyan ellenanyag, amelynek a fibrinogén és a fibrinogén bomlástermékei közötti keresztreaktivitás mérésére szolgáló vizsgálatban (lásd az előzőekben) a plazminnal körülbelül 40 percig emésztett fibrinogénnel való reakciója kisebb mint 50%-a a monoklonális ellenanyagnak a fibrinogénnel adott reakciójának.

A 45J hibridómát szokványos technikákkal állítottuk elő, szokványos Balb/c egeret használva, aholis az egeret fibrinnel immunizáltuk. Azonban fibrinogén is használható antigénként.

5.5.3. A keresztreaktivitás meghatározása a keresztkötést nem tartalmazó fibrin és a keresztkötést nem tartalmazó fibrinrögök között

ELISA-val kimutattuk, hogy az MH1 ellenanyag nemcsak a keresztkötést tartalmazó fibrinnel (XLFn) lép keresztreakcióba, hanem a keresztkötést nem tartalmazó fibrinnel is (NONXLFn). Az ELISA-t az alábbiak szerint hajtjuk végre:

1. Egy 96 lukas mikrotiter lemezt 100 μ l 50 μ g/ml koncentrációjú (pH=8,5 borát puffer sós pufferben) fibrinogén oldattal borítunk, 4 °C-on, éjszakán át.
2. Keresztkötéses fibrin képződik a fibrinogénnel borított lukakban, 1 óra hosszat 37 °C-on inkubálva egy trombinoldattal (10 NIH egység/ml) TRIS-szel pufferelt sóoldatban (TBS, pH=7,4, 50 mmol/l TRIS-HCl, 150 mmol/l NaCl), amely 2 mmol/l CaCl_2 -t és 10 mmol/l ciszteint tartalmaz.
3. A keresztkötést nem tartalmazó fibrint a fibrinogénnel borított lukakban állítjuk elő (1 óra 37 °C-on 10 NIH egység/ml trombinoldattal) foszfát pufferben (pH=6,1), amely EDTA-t tartalmaz 0,0125 mol/l végkoncentrációban.
4. A megkötött ellenanyagot anti-egér alkalikus foszfatáz konjugátummal való inkubálással határozzuk meg. A megkötött konjugátumot úgy határozzuk meg, hogy hozzáadjuk egy alkalikus foszfatáz szubsztrátot, majd a kapott kolorimetriás reakciót 405 nm-en követjük, automata lemezleolvasóval.

A vizsgálat eredményei a 9. táblázatban láthatók, és az a következtetés vonható le belőle, hogy az ellenanyagnak a keresztkötéses fibrinnel való keresztreaktivitása nagyobb, mint a keresztkötést nem tartalmazó fibrinnel. Erre a legegyszerűbb magyarázat az, hogy a keresztkötéses polimer struktúrában a kovalens keresztkötés zárja vagy befagyasztja az ellenanyag által felismert konformációt. A konformáció keresztkötést nem tartalmazó formájában, jóllehet létrejön, mégis, nincs stabilizálva a polimerben kialakuló kovalens kötéssel.

Azt is kimutatták, hogy az ellenanyag keresztreakciót ad mind a keresztköteses mind a keresztkötest nem tartalmazó, *in vitro* létrejött rögökkel. A keresztköteses fibrin úgy állítjuk elő, hogy a fibrinogén oldatot [TRIS (50 mmol/l, pH=7,4) sóoldat, amely 2 mmol/l CaCl_2 -t és 10 mmol/l ciszteint tartalmaz, valamint trombint (10 NIH egység/ml) 3 óra hosszat inkubáljuk 37 °C-on. A keresztköteses fibrin úgy állítjuk elő, a fibrinogén oldatot (3 mg/ml) foszfát pufferben (pH=6,1) inkubáljuk, amely EDTA-t tartalmaz 0,0125 mol/l végkoncentrációban valamint trombint (10 NIH egység/ml), 3 óra hosszat inkubáljuk 37 °C-on. A rögök kialakulása után mossuk és 37 °C-on inkubáljuk 400 μl 1%-os BSA oldattal, amely ^{125}I -vel jelzett MH1 oldatot tartalmaz. Az oldatból kis alikvot részeket veszünk ki különböző időpontokban, majd a felvett ellenanyag mennyiségét úgy határozzuk meg, hogy a plazmát egy gamma számlálóban megmérjük.

A 10. táblázatban az ellenanyag felvétele látható, mind a keresztköteses, mind a keresztkötest nem tartalmazó rögökben.

9. Táblázat

Az MH1 ellenanyag keresztreaktivitása keresztköteses és keresztkötest nem tartalmazó fibrinnel

Ellenanyag koncentráció (ng/ml)	Keresztköteses fibrin (405 nm-en mért abszorbancia)	Keresztkötes nélküli fibrin
100.000	0,764	0,409
50.000	0,460	0,319
25.000	0,305	0,154
12.500	0,174	0,074
6.250	0,069	0,000

10. Táblázat

Az MH1 ellenanyag keresztreaktivitása keresztkötéses és keresztkötést nem tartalmazó fibrinrögökkel

<u>Fibrinrög</u>	<u>A jelzett ellenanyag %-os felvétele 8 óra elteltével</u>
Keresztkötéses	79%
Keresztkötést nem tartalmaz	76%

5.6. A hibridóma letétbe helyezése

Az MH1 és 45J ellenanyagokat az American Type Culture Collection-nél (ATCC) helyeztük letétbe 1988 június 9-és, HB 9739 és HB 9740 letéti számon. Az ATCC székhelye 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD. 20852. Az MH1 ellenanyag egy IgG₁ ellenanyag, kappa könnyű láncsal, és az a megfigyelés, hogy az MH1 ellenanyag nemcsak a fimán fibrinnel, hanem a nyúl fibrinnel is ad keresztreakciót.

A jelen találmány oltalmi köre nem korlátozódik a letétbe helyezett hibridómákra, ezek inkább egyedi példái azoknak a hibridómáknak, amelyek fibrin-specifikus monoklonális ellenanyagot és fibrinogén-specifikus ellenanyagot termelnek, a meghatározások szerint. Minden funkcionálisan ekvivalens sejtvonal a jelen találmány oltalmi körébe tartozik. A "funkcionálisan ekvivalens" szakkifejezés azt jelenti, hogy egy ellenanyag képes a fibrinnek ahhoz az epitopjához kötődni, amelyhez az MH1 ellenanyag kötődik, vagy a fibrinogénnek ahhoz az epitopjához, amelyhez a 45J ellenanyag kötődik. Emellett, a szakkifejezés vonatkozik fibrin-specifikus monoklonális ellenanyagokra is, a meghatározás szerint, amelyek nemcsak ahhoz az epitophoz kötődnek amelyhez az MH1 ellenanyag kötődik, illetve a 45J ellenanyag kötődik.

5.7. A fibrin-specifikus monoklonális ellenanyagok *in vivo* diagnosztikai és terápiás alkalmazása

5.7.1. Vérrög/vaszkuláris betegség lokalizálása

A jelen találmány szerinti fibrin-specifikus monoklonális ellenanyagok képesek megcélozni a fibrinrögöket, vagy a fibrin aggregátumait, *in vivo*. Ennélfogva használhatók arra, hogy emberekben lokalizáljuk velük a lehetséges szöveti vagy vaszkuláris károsodást és követhessük a vaszkuláris megbetegedéseket. Egy fibrin-specifikus monoklonális ellenanyag különösen előnyös erre a célra, mivel ez a monoklonális ellenanyag nem kötődik a fibrinogénhez, a fibrin bomlástermékekhez és a fibrinogén bomlástermékekhez, ezáltal csökkenti a háttérrel, ami lehetővé teszi, hogy pontosan lokalizáljuk a fibrinrögöt vagy a fibrin aggregátumot.

Erre a felhasználási területre előnyös a tisztított monoklonális ellenanyag. A tisztítást előnyösen HPLC módszerrel végezhetjük. A humán alkalmazásra készített monoklonális ellenanyagok tisztítását elvégezhetjük ammónium-szulfátos vagy nátrium-szulfátos kicsapással, amit dialízis követ sóoldattal szemben, majd szűrési sterilizálás. Egy másik módszer szerint az immunaффinitás kromatográfiás technikát használhatjuk a monoklonális ellenanyag tisztítására.

A tisztított monoklonális ellenanyagokat radioaktív vegyületekkel jelezhetjük, azaz például ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In atomokkal, majd intravénásan beadhatjuk a betegeknek. Az ellenanyagot jelezhetjük egy mágneses próbával is. NMR-t alkalmazhatunk egy vérrög kimutatására. Az ellenanyagoknak a vérrögnél vagy fibrin aggregációnál való lokalizálása után emissziós tomográfiás és radionukleáris letapogatási technikákkal lehet kimutatni őket, ezáltal megtalálható a vérrög vagy a fibrinbe kapszulázott tumor.

Illusztrálás céljára a tisztított monoklonális ellenanyagot a megfelelő hordozóban, azaz például sóoldatban szuszpendáljuk, amely vagy tartalmaz humán

albumint vagy nem, megfelelő dózisban, majd beadjuk a betegnek. A monoklonális ellenanyagokat előnyösen intravénásan adjuk be, azaz például több óra alatt, folyamatos intravénás infúzióval.

5.7.2. Vaszkuláris megbetegedések kezelése monoklonális ellenanyag konjugátumokkal

A jelen találmány szerinti monoklonális ellenanyagokat számos különböző gyógyászati ágenssel kombinálva alkalmazhatjuk, azaz például citotoxikus reagensekkel és trombolitikus reagensekkel, azaz például t-PA-val, urokinázzal, sztreptokinázzal, és más olyan fehérjével, amely fel tudja oldani a fibrint. Az ilyen felhasználás különösen előnyös, mivel a jelen találmány szerinti fibrinspecifikus monoklonális ellenanyag lehetővé teszi ezeknek a reagenseknek a nagyon hatékony alkalmazását, mivel semmi nem vész el a reagensből a fibrinogénhez, fibrin bomlástermékhez vagy fibrinogén bomlástermékhez való kötődés révén. A témáról több összefoglalót is publikáltak [Bale és mtsai.: Cancer Research 40, 2965-297 (1980); Ghose és Blair: J. Natl. Cancer Inst. 61(3), 657-676 (1978); Gregoriadis: Nature 265, 407-411 (1977); Gregoriadis: Pharmac Ther. 10, 103-108 (1980); Trouet és mtsai.: Recent Results Cancer Res. 75, 229-235 (1980)].

Ezeknek az ágenseknek a monoklonális ellenanyag molekulájához való kapcsolására használt módszerek közé tartozhatnak nem-kovalens és kovalens kötések is. Mivel valószínűbb, hogy a nem-kovalens kötések felbomlanak, mielőtt az ellenanyag-komplex eléri a célpontját, ezért a kovalens kötések részesítik előnyben. Például karbodiimid kötés jöhet létre egy gyógyászati ágens és az ellenanyag aminocsoportja között. Bifunkciós ágensek, azaz például dialdehidek vagy imidoészterek használhatók egy gyógyszer aminocsoportjának és az ellenanyag molekula aminocsoportjának az összekapcsolására. A Schiff-bázis reakció használható

a gyógyszereknek az ellenanyag molekulákhoz való kötésére. Ez a módszer tartalmazza egy glikol- vagy hidroxicsoporthoz tartozó citotoxikus ágens peroxidációját, ezáltal egy aldehidet képezve, ami azután reakcióba lép az ellenanyag molekulával. A kapcsolódás egy Schiff-bázison keresztül jön létre, amely az ellenanyag molekulán levő aminocsoportokkal jön létre. Emellett, reaktív szulfhidril csoportokat tartalmazó gyógyszereket is kapcsolnak az ellenanyag molekulákhoz.

6. Az oldható fibrin *in vitro* kimutatása és mérése

6.1. Háttér

Amint azt az előzőekben ismertettük (lásd 5.1. szekció), a hemosztatikus mechanizmus reakciók komplex sorozatából áll, amelynek a végén a fibrinogén végül trombinnal fibrinné alakul. Ezeknek a reakcióknak a végeredménye a vérrög képződése. A reakciósorozatot egyszerűen egy, az alábbiakban vázolt háromlépéses folyamattal lehet jellemezni:

1. lépés - Proteolízis:

Fibrinogén $\Rightarrow$ fibrin monomerek + A és B fibrinopeptid

2. lépés - Polimerizáció:

Fibrin monomerek $\Leftrightarrow$ oldható fibrin polimerek

3. lépés - Röggképződés:

Oldható fibrin polimerek $\Rightarrow$ Fibrinrög

A fibrinogén három pár eltérő polipeptid láncból áll: $A\alpha$, $B\beta$ és γ [L. Stryer, Biochemistry 3. kiadás, 249. oldal, W.H. Freeman and Company, New York (1988)]. Az induló lépésben, amikor a fibrinogén fibrinné alakul (lásd a fenti 1. lépést), a fibrinogént a trombin elhasítja, ezáltal a két fibrinogén $A\alpha$ -lánc N-terminálisáról felszabadul a fibrinopeptid A. A kapott monomer a DesAA fibrin monomer. Amint az szintén látható az 1. lépésben, ezzel egyidőben, de lassabban, a trombin lehasítja a

fibrinopeptid B-t is a két fibrinogén B β -lánc N-terminális végeiről. A fibrinopeptid felszabadulás eredményeképpen új N-terminálisok exponálódnak a fibrin α és β láncain. Amint azt az előzőekben ismertettük az 1. lépésben keletkező molekula a fibrinopeptid A, fibrinopeptid B és a fibrin monomerek, azaz a DesAA fibrin monomer és a DesAABB fibrin monomer, amit a fentiekben "fibrin monomer" néven említettünk [W. Nieuwenhuizen: Blood Coagulation and Fibrinolysis 4, 93-96 (1993)]. Amint az a 2. lépésből látszik, a fibrin monomerek azután nem-kovalens (keresztkötést nem tartalmazó) és kovalens (keresztkötéses) polimereket hoznak létre, így alakulnak ki az oldható fibrin polimerek. Amint az a 3. lépésből látható, az oldható fibrin polimerekből azután létrejön a fibrinrög.

Az oldható fibrint úgy határozzuk meg, mint bármely olyan, fibrinogénből vagy fibrinből származó molekulafajtát, amely képes fibrinpolimer képződését előidézni, vagy bármely fibrin(ogén) eredetű molekulafajta, amelynek molekulásúlya nagyobb mint a természetes fibrinogén molekulásúlya, és a vérben oldatban marad. A 2. lépésben keletkező, keresztkötést nem tartalmazó, illetve keresztkötéses DesAABB fibrinpolimer az oldható fibrinek két fajtája, valamint az oldható fibrinpolimereknek is két fajtája. Emellett, az oldható fibrin szakkifejezés más fajtákra is vonatkozik: például a DesAA fibrinpolimerekre, a fibrinpolimerek (akár DesAA akár DesAABB fibrinpolimerek) közötti kölcsönhatás révén létrejött komplexekre, valamint az X, Y, D és E fibrin bomlástermékekre (lásd az előző, 5.1.-es szekciót, ezeknek a bomlástermékeknek aleírására) és emellett például a DesAA és DEsAABB monomerek fibrinogénnel alkotott komplexére [W. Nieuwenhuizen: Blood Coagulation and Fibrinolysis 4, 93-94 (1993)].

Az oldható fibrinpolimerek az oldhatatlan fibrin, azaz a vérrög közvetlen prekursorai, és ennek következtében az oldható fibrinpolimerek plazmaszintjéről az a vélemény alakult ki, hogy megnő olyan emberekben, akiknek kialakulóban levő vagy

meglevő trombózisa van (intravaszkuláris vérrögződés). Ezeknek a polimereknek a kimutatása és mennyiségének mérése a vérben, különösen a DesAABB oldható fibrinpolimereké ennek következtében hasznos jelzése a kezdeti stádiumban levő vérrögződésnek [Bang és Chang, 119-121; [W. Nieuwenhuizen: Blood Coagulation and Fibrinolysis 4, 93-94 (1993); Marder és mtsai.: 5,206,140 számú Amerikai Egyesült Államok-beli találmány].

Az oldható fibrin bizonyos fajtáit korábban kimutatták vagy mérték és kimutatták, számos különböző módszer alkalmazásával, beleértve például a fibrinopeptid A mérését, az $A\alpha$ és γ epitopok elleni ellenanyagokkal való mérést, amely epitopok a fibrinogénnek fibrinné való átalakulása során exponálódnak [W. Nieuwenhuizen: Blood Coagulation and Fibrinolysis 4, 93-94 (1993)], valamint a D-dimerek mérését [Marder és mtsai.: 5,206,140 számú Amerikai Egyesült Államok-beli találmány]. Az oldható fibrin kimutatására vagy mérésére szolgáló egyéb módszerek közé tartozik a fibrinnel borított eritrociták agglutinációjának mérése oldható fibrin jelenlétében, gélkizárásos kromatográfia, a plazminogén aktiválás sebességének fokozása a t-PA plazminogén aktivátorral [W. Nieuwenhuizen: Blood Coagulation and Fibrinolysis 4, 93-94 (1993)], etanol vagy protamin-szulfát zselézés, a plazmából tisztított fibrinogén frakciók N-terminális elemzése, ^{14}C -jelzett glicinetilészter beépítése és agaróz gélkromatográfia [Bang és Chang, 111-118]. Ezek közül a vizsgálatok közül egy sem képes arra, hogy specifikusan mérje és kimutassa mind az oldható keresztkötéses, mind az oldható, keresztkötést nem tartalmazó fibrinpolimereket.

6.2. Oldható keresztkötéses fibrinpolimerek és oldható, keresztkötést nem tartalmazó fibrinpolimerek *in vitro* vizsgálata

A jelen találmány azon a felismerésen alapul, hogy lehetséges *in vitro* vizsgálatot alkotni, amellyel ki lehet mutatni és mérni lehet az oldható, keresztkötéses DesAABB fibrinpolimereket és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrinmonomereket, egy olyan vizsgálórendszerben, amelyben nem mutatjuk ki az (a) fibrinogént, (b) fibrinogén bomlástermékeket, (c) DesAA fibrin monomereket, (d) DesAA fibrin polimereket, (e) DesAABB fibrin monomereket, (f) keresztkötéses fibrinogént (XIIIa-val kezelt fibrinogén), (g) DesAA fibrin monomer-fibrinogén komplexeket és (h) a fibrin bomlástermékeket ("a)-(h) molekulafajták"). A fibrinogén bomlástermékeket és a fibrin bomlástermékeket a fibrinogén vagy a fibrin plazminos emésztésével állítjuk elő (5.2. szekció).

Az az általános vélemény alakult ki, hogy az előzőekben ismertetett vizsgálat különösen jól használható a trombózissal jellemzett állapotok klinikai diagnózisában. A vizsgálatot bármely testfolyadék alkalmas mintájával elvégezhetjük, de mintaként az emlős vért részesítjük előnyben. Az alkalmas emlősök közé tartoznak például a nyulak, majmok és az emberek, de az embereket részesítjük előnyben.

Az ilyen *in vitro* vizsgálatokban bármely olyan, ismert vagy még kifejlesztendő módszer alkalmazható az oldható, keresztkötéses DesAABB fibrin polimerek és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerek kimutatására, amely nem mutatja ki az (a)-(h) molekulafajtákat. Ha egyszer már kimutattuk, akkor megmérhetjük az oldható keresztkötéses DesAABB fibrin polimereket és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimereket egy mintában, akár egy kontroll mintával való összehasonlítás alapján, akár olyan standardok alkalmazásával, amelyek ismert mennyiségű oldható, keresztkötéses DesAABB fibrin



polimert és oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimert tartalmaznak, és amely standard semmit nem tartalmaz az (a)-(h) molekulafajtákból.

Meg kell jegyeznünk, hogy a kimutatás eszköze bármely olyan módszer, amellyel valaki képes meghatározni a számára érdekes anyag jelenlétét egy mintában. A kimutatás egy előnyös eszköze az oldható, keresztkötéses fibrin polimerek és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerek elleni ellenanyag, amely ellenanyag nem ad keresztreakciót a következőkkel: (a) fibrinogén, (b) fibrinogén bomlástermék, (c) DesAA fibrin monomerek, (d) desAA fibrin polimerek, (e) DesAABB monomerek, (f) keresztkötéses fibrinogén, (g) DesAA fibrin monomer-fibrinogén komplexek és (h) fibrin bomlástermékek. Az említett ellenanyag arra használható, hogy egy mintában megmérjük az oldható, keresztkötéses DesAABB fibrin polimer és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimer mennyiségét. Ezek az ellenanyagok lehetnek monoklonális vagy poliklonális ellenanyagok, de a monoklonális ellenanyagokat részesítjük előnyben. Az ellenanyag előnyösen humán vagy rágcsáló vagy nyúl eredetű. Emellett az ilyen ellenanyagok közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a kiméra ellenanyagok, az egyláncú ellenanyagok és a Fab fragmensek.

Az ilyen ellenanyagra példa az MH1 monoklonális ellenanyag, amit az 5.5.1.-5.5.3 pontokban, valamint az 5.6. pontban ismertettünk. Az az általános vélemény alakult ki, hogy az MH1, amellett, hogy az előzőekben ismertetett kötési jellemzőkkel rendelkezik, nem kötődik a fibrinogén-fibrin bomlástermék komplexhez. Az MH1-nek ez a jellemzője fokozhatja a hatékonyságát az oldható keresztkötéses és oldható nem-keresztkötéses DesAABB fibrin polimerek kimutatásában és mérésében.

Meg kell jegyeznünk, hogy két vagy több ellenanyag használható a kimutatás eszközeként. Tehát különböző specifitású ellenanyagok kombinációja használható az oldható keresztkötéses DesAABB fibrin polimerek és az oldható, keresztkötést

nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerek kimutatására és mérésére egy mintában, amelyben például egyik ellenanyag sem képes egyedül komplexet képezni az oldható, keresztkötéses DesAABB fibrin polimerekkel és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerekkel is, míg a két (vagy több) ellenanyag képes ilyen komplexeket képezni. Természetesen egyik ellenanyag sem képes az (a)-(h) molekulafajtákkal keresztreakciót adni.

Azt is meg kell jegyezni, hogy ha az ellenanyagokat alkalmazzuk, akkor fajspecifikus ellenanyagot kell alkalmazni.

Az ellenanyagok előállításához különböző gazdaállatok immunizálhatók az oldható, keresztkötéses DesAABB fibrin polimerek és oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB polimerek mint antigének injekciójával, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a nyulakat, egereket, patkányokat, stb. Ezek a polimerek szelektíven izolálhatók, például MH1 ellenanyag alkalmazásával, amelyet egy Sepharose MH1 ellenanyag affinitás oszlophoz kapcsoltunk. Ezeket a polimereket az alábbiak szerint izolálhatjuk: Az oldható fibrint először *in vitro* állítjuk elő, kis mennyiségű trombint adva a citráttal kezelt plazmához. Miután a trombin aktivitását kioltottuk egy hatékony trombin inhibitor, azaz például hirudin hozzáadásával, a plazma mintákat egy Sepharose-MH1 oszlopra visszük. Az ilyen MH1 oszlopot úgy állítjuk elő, hogy az NHI ellenanyagot brómcíánnal aktivált Sepharose 4B (Pharmacia) oszlopra kötjük, az szakterületen ismert módszer alkalmazásával (Pharmacia termékismertető, amelyben leírják egy ellenanyag-Sepharose 4B oszlop készítését, előre aktivált Sepharose 4B alkalmazásával). Az oldható fibrintelőször foszfáttal pufferelt sóoldat (PBS) jelenlétében visszük fel a Sepharose-MH1 oszlopra. Miután hozzákötődött a Sepharose-MH1 oszlophoz, PBS jelenlétében, az MH1-Sepharose-hoz kötődő oldható fibrint nátrium-tiocianát oldat al-

kalmazásával eluálhatjuk. A PBS-sel szembeni dialízis után az izolált oldható fibrin polimert -70 °C-on tárolhatjuk.

Különböző adjuvánsok használhatók az izolált polimerekkel, hogy ezzel fokozzuk az immunválaszt, a fajtól függően, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a Freund féle (komplett vagy nem komplett) adjuvánst, az ásványi géleket, úgymint az alumínium-hidroxidot, a felületaktív anyagokat, azaz például a lizolecitint, többszörös poliolokat, polianionokat, peptideket, olajemulziókat, fúrócsiga hemocianint, dinitrofenolt és a potenciálisan hasznos humán adjuvánsokat, azaz például a BCG-t (Calmette-Guerin bacillus) és a *Corynebacterium parvum*-ot.

Az oldható keresztkötéses és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerekre specifikus monoklonális ellenanyagokat, amelyek nem adnak keresztreakciót az (a)-(g) molekulafajtákkal, bármely olyan technikával előállíthatjuk, amely azt eredményezi, hogy ellenanyag molekulák termelődnek folyamatos sejtenyészetekben. Ezek közé tartozik, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a a hibridóma technika, amelyet eredetileg Kohler és Milstein írt le [Kohler és Milstein: Nature 256, 495-497 (1975)], az újabb humán B-sejt hibridóma technika [Kosbor és mtsai.: Immunology Today , 72 (1983)], és az EBV hibridóma technika [Cole és mtsai.: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96 (1985)]. A találmány egy további megvalósítási módja szerint a monoklonális ellenanyagok előállíthatók mikroorganizmus-mentes állatokban is, a legújabb technika alkalmazásával (lásd 5.2.-5.4. pontokat). Az ilyen ellenanyag előállítására egy példa az előzőekben ismertetett MH1 előállítás (lásd 5.3.-5.6. pontok).

A találmány szerint a humán ellenanyagokat úgy állíthatjuk elő, hogy humán hibridómákat alkalmazunk [Cote és mtsai.: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 80, 2026-2030 (1983)], vagy humán B sejteket *in vitro* EBV vírussal

transzformálunk [Cole és mtsai.: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 77-96 (1985)]. Valójában, a találmány szerint a "kiméra ellenanyagok" előállítására kidolgozott technikák [Morrison és mtsai.: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 81, 6851-6855 (1984); Neuberger és mtsai.: Nature 312, 604-608 (1984); Takeda és mtsai.: Nature 314, 452-454 (1985)] is alkalmazhatók, mely szerint az egy megfelelő antigén specifitással rendelkező egér ellenanyag molekulát kódoló géneket hozzáillesztjük a megfelelő biológiai aktivitással rendelkező humán ellenanyag molekulát kódoló génekhez, és ezt alkalmazzuk; ezek az ellenanyagok is a jelen találmány oltalmi körébe tartoznak.

A találmány szerint az egyszálú ellenanyagok készítésére ismertetett technikák [4,946,778 számú Amerikai Egyesült Államok-beli bejelentés] adaptálhatók specifikus egyszálú ellenanyagok előállítására.

A találmány további megvalósítási módja szerint a Fab expressziós könyvtárak készítésére leírt technikákat alkalmazzuk [Hise és mtsai.: Science 246, 1275-1281 (1989)], hogy gyorsan és könnyen azonosítani tudjuk az oldható keresztkötéses és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerekhez a keresett specifitással rendelkező monoklonális Fab fragmenseket.

Az oldható keresztkötéses és oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerekre specifikus kötési helyeket tartalmazó ellenanyag-fragmensek ismert módszerekkel állíthatók elő. Például, az ilyen fragmensek közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a következők: a $F(ab')_2$ fragmensek, amelyeket az ellenanyag molekula pepszines emésztésével lehet előállítani, és a Fab fragmensek, amelyeket úgy állíthatunk elő, hogy redukáljuk a $F(ab')_2$ fragmensek diszulfidhídjait.

A jelen találmány szerinti ellenanyagok használhatók bármely, a szakirodalomban ismert immunesszé rendszerben, beleértve, anélkül, hogy ezekre

korlátoznánk magunkat, a következőket: radioimmunesszé, enzimhez kötött immunszorbens esszé, "szendvics" esszék, precipitin reakciók, géldiffúziós immundiffúziós vizsgálatok, agglutinációs vizsgálatok, fluoreszcens immunesszék, protein A immunesszék és immunelektroforázis vizsgálatok, csak hogy néhányat megnevezzünk. A 4,629,783 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés és az abban idézett bejelentések is megfelelő esszéket írnak le.

Az ellenanyagok alapreagensekként használhatók számos különböző immunesszében, hogy meghatározzuk az oldható keresztkötéses és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerek jelenlétét egy vérmintában vagy más testfolyadékban. Általánosságban szólva az ellenanyagok bármely típusú immunesszében alkalmazhatók, mind mennyiségi mind minőségi vizsgálatban. Ezek közé tartozik mind a kétpontos szendvics esszé és az egyponthoz immunesszé, nem-kompetitív típusú, valamint a tradicionális kompetitív vizsgálatok.

Különösen előnyös, a kimutatás egyszerűsége és a kvantitatív természete szempontjából, a szendvics vagy kettős ellenanyag vizsgálat, amelyeknek számos variációja létezik, amelyek mindegyike a jelen találmány oltalmi körébe tartozik.

Például, egy tipikus "forward" szendvics vizsgálatban a jelzetlen ellenanyagot immobilizáljuk egy szilárd hordozóra, azaz például egy mikrotiter lemez lükeiba, és a vizsgálandó mintát érintkezésbe hozzuk a megkötött molekulával. Megfelelő inkubálási periódus után, ami alatt elég idő van ahhoz, hogy az ellenanyag-antigén bináris komplex kialakuljon, egy második ellenanyagot, amelyet egy kimutatható jel indukálására képes riporter molekulával jeleztünk, adunk hozzá, majd folytatjuk az inkubálást, elegendő időt adva arra, hogy az antigénhez kötődjön egy másik pontban és egy harmadlagos komplex alakuljon ki az ellenanyagból, az antigénből és a jelzett ellenanyagból. Minden el nem reagált anyagot lemosunk, majd az antigén jelenlétét egy jel megfigyelése alapján határozzuk meg, amelyet mennyiségileg is meghatá-

rozhatunk, kontroll mintákkal (standardokkal) hasonlítunk össze, amelyek ismert mennyiségű antigént tartalmaznak. A "forward" szendvics vizsgálat variánsai közé tartozik a szimultán esszé, amelyben mind a mintát, mind az ellenanyagot egyszerre adjuk a megkötött ellenanyaghoz, vagy a "reverz" szendvics vizsgálat, amelynek során először a jelzett ellenanyagot és a vizsgálandó mintát kombináljuk, majd együtt inkubáljuk, és utána adjuk a jelzetlen, felülethez kötött ellenanyaghoz. Ezek a technikák jól ismertek a szakterületen jártas szakember számára, és kisebb eltérések lehetősége nyilvánvaló. A továbbiakban a "szendvics esszé" szakkifejezés az alap kétpontos technika minden variációjára vonatkozik.

Egy sokkal specifikusabb példaként, egy tipikus "forward" szendvics vizsgálatban egy primer ellenanyag vagy kovalens kötással vagy passzívan kötődik egy szilárd hordozóhoz. A szilárd felszín általában üveg vagy polimer, a legáltalánosabb polimer a cellulóz, a poliakrilamid, a nylon, a polisztirol, a polivinilklorid vagy a polipropilén. A szilárd hordozók formája lehet cső, gyöngy, korong vagy mikrotiter lemez, vagy bármely olyan felszín, amely alkalmas immunesszé elvégzésére. A kötési folyamatok nagyon jól ismertek a szakterületen. A kötést követően a szilárd fázis-ellenanyag komplexet mossuk a vizsgált minta előkészítése során. Ezután a vizsgálandó testfolyadék egy alikvot részét hozzáadjuk a szilárd fázisú komplexhez és annyi ideig inkubáljuk, amennyi elegendő ahhoz, hogy kötés jöjjön létre bármely jelenlevő oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimer és oldható, keresztkötéses DesAABB valamint az említett fehérjékre specifikus ellenanyag között. A második ellenanyagot azután hozzáadjuk a szilárd fázisú komplexhez és annyi ideig inkubáljuk tovább, amennyi elegendő ahhoz, hogy a második ellenanyag kötődjön a primer ellenanyag - antigén szilárd fázisú komplexhez. A második ellenanyagot egy riporter molekulához kapcsoljuk, amelynek a látható jelét azután arra használjuk, hogy jelezzük a második ellena-

nyagnak bármely, a mintában való antigénhez való kötődését. A "riporter molekula" szakkifejezés alatt a jelen leírásban egy olyan molekulát értünk, amely kémiai természetéből következően analitikailag kimutatható jelet szolgáltat, amely lehetővé teszi az antigénhez kötött ellenanyag kimutatását. A kimutatásnak legalább részben értékelhetőnek kell mennyiségileg, hogy lehetővé tegye az antigén mennyiségének meghatározását a mintában, ami abszolút értékben számítható, vagy egy standarddal (vagy standardsorozattal) való összehasonlítás alapján, amelyismert, normál szintű antigént tartalmaz.

Az ilyen típusú vizsgálatban leggyakrabban használt riporter molekulák vagy enzimek vagy fluorofórok. Egy enzim immuonesszé esetében egy enzimet a második ellenanyaghoz konjugálunk, gyakran glutáraldehiddel vagy perjodáttal. Amint az azonban nyilvánvaló lesz, számos különböző konjugációs technika létezik, amelyek jól ismertek a szakterületen jártas szakember számára. Az általánosan használt enzimek közé tartozik a tormaperoxidáz, a glükózo oxidáz, a béta-galaktozidáz és az alkalikus foszfatáz, egyebek között. Például a p-nitrofenil foszfát alkalmas az alkalikus foszfatáz konjugátumokkal való alkalmazásra; a peroxidáz konjugátumokhoz általában az 1,2-fenilándiamint vagy toluidint alkalmazzák. Az is lehetséges, hogy fluoreszcens termékeket eredményező fluorigén szubsztrátokat alkalmazunk az előzőekben említett kromogén szubsztrátok helyett. Mindegyik esetben az enzimmel jelzett ellenanyagot hozzáadjuk az első ellenanyag komplexhez és hagyjuk, hogy kötődjön a komplexhez, majd a fölöslegben levő reagenst kimossuk. A megfelelő szubsztrátot tartalmazó oldatot azután hozzáadjuk az ellenanyag-antigén-jelzett ellenanyag tercier komplexéhez. A szubsztrát reagál a második ellenanyaghoz kapcsol enzimmel, ennek eredménye egy mennyiségileg mérhető vizuális jel, amelyet általában spektrofotometriásan értékelhetünk, ezzel mérhetjük a szérumban jelenlevő antigén mennyiségét.

Egy másik módszer szerint fluoreszcens vegyületek, azaz például a fluoreszcein vagy a rodamin kémiaiilag hozzákapcsolható az ellenanyagokhoz, anélkül, hogy ezzel megváltoztatnánk a kötési kapacitásukat. Ha egy adott hullámhosszúságú fénnnyel megvilágítva aktiváljuk, a fluorokrómmal jelzett ellenanyag abszorbeálja a fényenergiát, egy gerjesztett állapotot inkubálva a molekulában, majd ezt követi a fényemisszió egy jellegzetes, nagyobb hullámhosszon. Az emisszió jellegzetes színeként jelentkezik, ami fénymikroszkóppal vizuálisan érzékelhető. Csakúgy, mint az enzim immuneszében (EIA), a fluoreszcenciásan jelzett ellenanyagot hagyjuk az első antigén-komplexhez kötődni. A megkötetlen reagens kimosása után a megmaradt turner komplexet a megfelelő hullámhosszúságú fénynek tesszük ki, és a megfigyelt fluoreszcencia jelzi az antigén jelenlétét. Az immunfluoreszcencia és EIA technikák mind jól megalapozottak a szakirodalomban, és különösen előnyösnek tartjuk a jelen módszer alkalmazása során. Azonban más riporter molekulák, azaz például radioaktív izotópok, kemilumineszcens vagy biolumineszcens molekulák is alkalmazhatók. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogyan kell az eljárást variálni ahhoz, hogy megfeleljen a kívánt alkalmazásnak.

Egy másik módszer szerint a vizsgálandó mintát, emlős vért vagy más testfolyadékot, amely az oldható, keresztkötést nem tartalmazó fibrin DesAABB polimert és az oldható, keresztkötéses DesAABB fibrin polimert tartalmazza használhatjuk egy egyponos immuneszében, ha egy szilárd szubsztráthoz kötjük, kovalens vagy nem kovalens kötéssel. Egy jelzetlen ellenanyagot érintkeztetünk a szilárd szubsztráthoz kötött mintával. Megfelelő inkubálási idő után, amely elegendő ahhoz, hogy kialakuljon egy ellenanyag-antigén bináris komplex, egy második ellenanyagot adunk hozzá, amelyet egy kimutatható jelet indukálni képes riporter molekulával jeleztünk, és az inkubálást tovább folytatjuk, hogy elegendő idő legyen egy

antigén-ellenanyag-jelzett ellenanyag tercier komplex kialakulásához. Az egyponyos immunesszében a második ellenanyag lehet egy általános ellenanyag (azaz zenogén ellenanyag az immunglobulinra, főleg az anti-(IgM és IgG)-re, amely egy riporter molekulához kötődik), amely képes megkötni egy olyan ellenanyagot, amely az oldható keresztkötéses fibrin polimerre és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó fibrin polimerre specifikus.

Az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DEsAABB fibrin polimerek és az oldható, keresztkötéses DesAABB fibrin polimerek *in vitro* kimutatása és mérése különösen hasznos, ha ilyen kimutatást és mérést végzünk, a betegek plazmáját alkalmazva, azzal a céllal, hogy egy kezdődő, vagy már létező trombotikus eseményt mutassunk ki, amely esemény egy kezdődő vagy folyamatban levő trombózis jele [W. Nieuwenhuizen: Blood Coagulation and Fibrinolysis 4, 93-94 (1993); Bang és Chang, 109-122; Marder és mtsai.: 5,206,140 számú Amerikai Egyesült Államok-beli találmány]. Ilyen esemény például a mélyvénás trombózis ("DVT"), amely állapot a láb mély vénáiban való vérrögképződés eredményeképpen jön létre; a tüdőembólia (PE), ami akkor lép fel, ha egy vérrög elszabadul a mály vénákból és embóliát okoz a tüdőerekben; disszeminált intravaszkuláris koaguláció, ami a véralvadási kaszkád szisztémás aktiválásának eredménye (például baktériumfertőzés esetében); szívinfarktus (MI), ami akkor lép fel, ha egy vérrög elzárja a koronária ereket, amelyek vérrel látják el a szívizmot; sztrók; és az intrakardiális vérrögök, amelyek az atriális fibrilláció eredményeképpen lépnek fel. A trombotikus esemény típusát diagnosztizálhatjuk az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerek és az oldható, keresztkötéses DesAABB fibrin polimerek kimutatására és mérésére szolgáló módszerrel, kombinálva a beteg egyéb tüneteinek megfigyelésével. Azokat a tüneteket használjuk, amelyeket általában egy kezdődő trombotikus esemény klinikai diagnosztizálásában használnak. Például, az oldható

DEsAABB fibrin polimerek említett kimutatása és mérése különösen hasznos eszköz arra, hogy megkülönböztessük azokat a betegeket, akiknek mellkasi fájdalmuk van a kezdődő MI miatt, azoktól a betegektől, akiknek egyéb okok miatt van mellkasi fájdalmuk.

6.3. Anyagok és módszerek

6.3.1. Fehérjék

A szarvasmarha szérumalbumint és trombint az ICN-től vásároljuk (Costa Mesa, CA). A hirudint, a torna-peroxidázt és az o-feniléndiamin dihidroklorid szubsztrát tablettát a Sigma Chemical Co.-tól (St. Louis, MO) vásároljuk. A humán fibrinogént (L minőség) a Helena Laboratories-től vásároljuk (Beaumont, TX). A fibrinogént tovább tisztítjuk ammónium-szulfátos kicsapással, Holm és munkatársai leírása szerint [Holm és mtsai.: Thromb. Res. 37, 165-176 (1985)]. Az esszérendszerben használt MH1 anti-fibrin monoklonális ellenanyagot az előző, 5. szekcióban ismertetett módon állítjuk elő. A 45J jelű antifibrinogén monoklonális ellenanyagot az előző, 5. szekcióban ismertetett módon állítjuk elő.

A DEsAABB fibrin monomert úgy állítjuk elő, hogy a keresztkötést nem tartalmazó fibrin polimert nátriumbromidot tartalmazó, 50 mmol/l koncentrációjú nátrium-acetát pufferben (pH=5,3) oldjuk.

A keresztkötéses DEsAABB fibrin polimereket úgy állítjuk elő, hogy fibrinogént vagy citráttal kezelt plazmát alacsony koncentrációjú trombinnal (0,025 egység/ml) inkubálunk 7-8 percig. A reakcióelegy tartalmaz XIIIa faktort is. A reakciót a reakcióelegyhez adott hirudin hozzáadásával állítjuk le (végkoncentráció 10 ATU/ml).

A keresztkötést nem tartalmazó oldható DEsAABB fibrin polimereket úgy állítjuk elő, hogy a citráttal kezelt plazmát vagy fibrinogént 7-8 percig 37 °C-on olyan trombinoldattal inkubáljuk, amely EDTA-t tartalmaz (12 mmol/l végkoncentráció). A

reakciót úgy állítjuk le, hogy a reakcióelegyhez főlegben adunk hirudint (végkoncentráció 10 ATU/ml).

6.3.2. MH1 és 45J tormaperoxidáz konjugátum

[adaptálva: Wilson és Nakane: Immunfluorescence and Related Staining Techniques, Knapp és mtsai. (szerk.), 215-224, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam (1978)]

A tormaperoxidázt (HRP) ($RZ > 3$) (10 mg) 1 ml desztillált vízben oldjuk. Frissen készült 0,1 mol/l koncentrációjú nátrium-perjodát oldatot (0,4 ml) adunk hozzá, majd óvatosan kevertetjük 20 percig. Az oldatot azután nátrium-acetát pufferbe vesszük át (15 mmol/l, pH=4,4) 4 °C-on, egy Centricon 10 mikro-koncentrátort alkalmazva.

Az oldat pH-ját 9,5-re emeljük, 40 µl 0,2 mol/l koncentrációjú nátrium-hidrogén-karbonát puffert adva hozzá (pH=9,5). Ezután azonnal hozzáadunk 20 mg MH1 ellenanyagot 2,0 ml 0,01 mol/l nátrium-hidrogén-karbonát pufferben (pH=9,5). Ezt az oldatot óvatosan kevertetjük szobahőmérsékleten 2 óra hosszat 0,2 ml frissen készített nátrium-bórhidrid oldat (4 mg/ml) hozzáadása után.

Végezetül az ellenanyag-HRP konjugátumot 5x4 liter PBS-sel szemben dializáljuk 2-8 °C-on.

A konjugátumot barna edényben tároljuk 2-8 °C-on.

6.3.3. Vérminták

Vérmintát veszünk mind egészséges önkéntesektől (beleegyezésükkel) mind az intenzív osztályon levő betegektől, akik az MI klinikai tüneteit mutatják, azaz például erős mellkasi fájdalmakat. A vérmintákat nátrium-citrátba gyűjtjük, vacutainer-ek alkalmazásával (Becton Dickinson). A plazmát centrifugáljuk (2400 rpm, 15 perc). A plazmát vagy azonnal felhasználjuk, vagy -70 °C-ra fagyasztva tároljuk.

6.3.4. ELISA eljárás oldható fibrin mérésére

Az oldható fibrint friss vagy fagyasztott plazmamintákban mutatjuk ki, szendvics típusú enzimhez kötött immuonesszé rendszert alkalmazva. A jelen találmányban a befogó ellenanyag az antifibrin MH1 ellenanyag. A kimutató (vagy jelző ellenanyag) ugyanannak az ellenanyagnak a HRP konjugátuma. Egy másik módszer szerint a 45J antifibrinogén ellenanyag használható jelző ellenanyagként.

96 lukas polivinil-klorid (PVC) mikrotiter lemezeket (Costar Cambridge, MA) borítunk az MH1 monoklonális ellenanyaggal, 100 µl Mab oldatot (50 µg/ml) alkalmazva a borító pufferben (nátrium-borát, pH=8,5) 4 °C-on 12-16 óra hosszat. A megkötetlen ellenanyagot eltávolítjuk a lemezről, a lukakat háromszor mosva egy PBS-Tween oldattal. Az MH1-gyel borított lukakat tovább fedjük BSA-val, 200 µl 1%-os BSA oldatot PBS-ben inkubálva (PBS-BSA) 1 óra hosszat 37 °C-on. A megkötetlen BSA-t eltávolítjuk, a lemezeket megfordítva, és óvatosan egy papírtörülközőhöz érintve. Az oldható fibrint tartalmazó citrátozott mintákat (50 µl) az MH1-BSA blokkolt lukakon inkubáljuk 30 percig 37 °C-on. A megkötetlen anyagot a mikrotiter lemez lefele fordításával és óvatos törlésével távolítjuk el. A lukakat azután háromszor mossuk PBS-Tween-nel. A megkötött oldható fibrint úgy mutatjuk ki, hogy először az MH1-HRP konjugátumnak (vagy a HRP és egy antifibrin(ogén) ellenanyag, 45J) 100 µl PBS-BSA oldatát inkubáljuk a lukakban 30 percig 37 °C-on. A megkötetlen konjugátumot a lemez lefele fordításával és a lukak háromszori PBS-Tween-es mosásával távolítjuk el. A megkötött konjugátumot úgy mutatjuk ki, hogy 100 µl O-feniléndiamin dihidroklorid oldatot adunk hozzá 10 percre szobahőmérsékleten. A szubsztrátoldatot úgy állítjuk elő, hogy egy O-feniléndiamin dihidroklorid oldatot oldunk H₂O₂-t tartalmazó nátrium-citrát oldatban.

A kolorimetriás reakciót 10 perc elteltével oltjuk ki, 25 µl 1 mol/l koncentrációjú H₂SO₄ oldat hozzáadásával. Az egyes lukakban az oldat fényelnyelését 490 nm-en határozzuk meg, egy Thermomax mikrotiter lemezleolvasóval (Molecular devices, Menlo Park, CA).

6.3.5. Oszlopok készítése affinitás oszlopkromatográfiához

Sepharose MH1 oszlopokat az alábbiak szerint készítünk:

1 g fagyasztva szárított, brómcíánnal aktivált Sepharose 4B-t (Pharmacia) mérünk ki, majd 1 mmol/l HCl-ben szuszpendáljuk. A megduzzadt gél 15 percig mossuk 1 mmol/l HCl-ben zsugorított üvegszűrőn.

20 mg MH1 ellenanyagot oldunk kapcsoló pufferben (0,1 mol/l NaHCO₃, pH=8,3, 0,5 mol/l NaCl-t tartalmaz), majd óvatosan összekeverjük a megduzzadt géllal egy lezárt edényben (2 óra szobahőmérséklet, vagy 4 °C éjszakán át).

A keverés után a gél kapcsoló pufferrel mossuk, a főlegben levő ellenanyag eltávolítására. A blokkolatlan aktív helyeket blokkoljuk, 0,1 mol/l TRIS-HCl, pH=8,0 (vagy 1 mol/l etanolamin, pH=9,0) oldattal 2 óra hosszat kezelve szobahőmérsékleten. Az ellenanyaghoz kötött gél után háromszor mossuk 0,1 mol/l acetát pufferrel (pH=4,0, 0,5 mol/l nátrium-kloridot tartalmaz), majd TRIS pufferrel (0,1 mol/l, pH=8,0, 0,5 mol/l nátrium-kloridot tartalmaz). A kapcsolt ellenanyagot 4 °C-on nátrium-azid oldatban tároljuk (0,05%).

A Sepharose DesAABB fibrin monomer oszlopokat a következők szerint készítjük el: a DesAABB fibrin monomereket brómcíánnal aktivált Sepharose 4B-hez kapcsoljuk, 0,1 mol/l NaBr jelenlétében (0,1 mol/l borát pufferben, pH=8,2), a Sepharose MH1 készítésénél ismertetett eljárást követve.

6.3.6. Az oldható fibrin polimerek *in vitro* vizsgálatával felismert oldható fibrin jellemzése, az oldható fibrin kimutatására MH1-t használva

Igazoltuk az előzőekben, az 5.5. szekcióban, hogy az MH1 ellenanyag nem ismeri fel a fibrinogént, a plazma prekuzort vagy a fibrin polimert. Az is igazoltuk az előzőekben, az 5.5. szekcióban, hogy a fibrin plazminnal való lebomlása (vagy bármilyen olyan folyamat, amely a fibrin polimer struktúrájának lebomlásához vezet) a fibrinnek az ilyen ellenanyagokkal való immunfelismerésének elvesztéséhez vezet. Ennek következtében az MH1 ellenanyag nem ismer fel semmilyen ismert plazmin bomlásterméket vagy keresztkötéses fibrint.

Annak igazolását, hogy az MH1 ellenanyag a DesAABB fibrinnek csak a polimer struktúráját ismeri fel, és nem ismeri fel a monomer desAABB fibrin egységet, affinitáskromatográfiával kaptuk. Röviden, 0,5 mg MH1 ellenanyagot bocsátunk át egy 5 ml-es Sepharose desAABB fibrin monomer oszlopon. Az oszlopot az egyensúlyba hozó pufferrel (0,1 mol/l TRIS-sel pufferelt sóoldat, TBS, pH=8,5) mossuk. Az ellenanyagnak nem figyelhető meg jelentős kötődése az oszlophoz. Amint az az 1A. ábráról látható, az ellenanyag az oszlopon átfolyó oldattal eluálódik. Ha az oszlopot 6 mol/l guanidin-hidrokloriddal eluáljuk, akkor kismennyiségű fehérjét lehet kinyerni. A fehérjét az összes frakció 280 nm-es mérésével mutatjuk ki. Az ellenanyagot úgy határozzuk meg, hogy szilárd fázisú ELISA-val vizsgáljuk a fehérje immunológiai reaktivitását, fibrinnel borított mikrotiter lukakat alkalmazva. A használt ELISA leírását lásd az 5.4.2. szekcióban ismertetjük. Az oszlopon megkötött fehérje a szennyezésként jelenlevő kismennyiségű oldható DesAABB fibrinnek a DesAABB monomer oszlophoz való kötődésének eredménye. Ez a szennyeződés a DesAABB fibrin monomer oszlop készítésénél használt kiindulási anyagban található. Annak igazolására, hogy a Sepharose desAABB fibrin monomer oszlop képes megkötni egy ellenanyagot, egy fibrinogén-specifikus monoklonális ellenanyagot (Mab) engedünk

monomer oszlop képes megkötni egy ellenanyagot, egy fibrinogén-specifikus monoklonális ellenanyagot (Mab) engedünk át az oszlopon egy kontroll kísérletben. Amint az az 1B. ábrán látható, az oszlop megköti a kontroll Mab-ot, az antifibrinogén 45J ellenanyagot, és a guanidin-hidrokloridos kezelésre (6 mol/l) van szükség ahhoz, hogy a 45J ellenanyagot eluáljuk.

Annak igazolását, hogy az előzőekben ismertetett MH1 ellenanyag felismeri mind a keresztkötéses mind a keresztkötést nem tartalmazó oldható DesAABB fibrin polimereket, egy olyan kísérletből kapjuk, amelyben az oldható DEsAABB fibrin polimereket trombinnak a citrátozott plazmamintához való adásával állítjuk elő, EDTA jelenlétében illetve távollétében (az EDTA megakadályozza, hogy a XIIIa faktor keresztkötést hozzon létre a DesAABB fibrin polimerekben). A keresztkötéses és a keresztkötést nem tartalmazó oldható DesAABB fibrin polimerek előállítását a 6.3.1. szekcióban írjuk le, és az immunológiai reaktivitásukat a 6.3.4. szekcióban ismertetett ELISA-val nézzük. Amint az a 2. ábráról látható, nincs szignifikáns különbség a keresztkötéses (B) és a keresztkötést nem tartalmazó (C) fibrin polimerek között a vizsgáló rendszerben.

Annak igazolását, hogy az MH1 ellenanyag nem ismeri fel az oldható desAA fibrin polimert, egy olyan kísérletből kapjuk, amelyben a DesAA fibrin polimert úgy állítjuk elő, hogy a fibrinogént vagy a plazmát kígyóméregből származó Batroxobinnal (*Bothrops atrox*-ból) kezeljük, amely szelektíven lehasítja a fibrinopeptid A-t (FPA) a fibrinogén molekuláról. A Batroxobin nem hasítja le a fibrinopeptid B-t (FPB), a trombinnal ellentétben, amely mind az FPA-t mind az FPB-t lehasítja. Az FPA eltávolítása azt eredményezi, hogy a desAA fibrin monomer egységek polimerizálódnak, és DesAA fibrinrög keletkezik. A 3. ábrán láthatjuk a rögképződést, amit a reakcióelegy 340 nm-en mért abszorbanciájával mérünk, ha egy batroxobin oldatot inkubálunk 15 percig szobahőmérsékleten egy fibrinogén

mintával. Az abszorbancia fokozatosan nő az idővel, ahogy az oldható DesAA fibrin polimereknek nő a hosszuk és a koncentrációjuk, ameddig végül kialakul a vérrög. Abban a kísérletben, amelyben az oldható desAA fibrin MH1 által való felismerését vizsgáljuk, oldható desAA fibrin polimert állítunk elő *in vitro*, egy batroxobinos fibrinogén mintával (végkoncentráció 0,5 egység/ml), 37 °C-on. 7 perc elteltével egy alikvot részt távolítunk el a batroxobinnal kezelt mintából, majd a 6.3.4. pontban ismertetett ELISA-val vizsgáljuk. Ebben a mintában nem lehet reaktivitást igazolni (C minta), amint az a 4. ábrán látható. Ebből a kísérletből azt a következtetést is le lehet vonni, hogy a vizsgáló rendszer nem ismeri fel a fibrinogén-desAA fibrin komplexet, amely az oldható fibrinnek egy másik forrása. Világos, hogy az ebben a kísérletben előállított reakcióelegy azért tartalmaz ilyen "oldható fibrin" egységeket, mivel a batroxobin olyan desAA fibrin monomereket képez, amelyek szabadon kölcsönhatásba lépnek más desAA monomerekkel, vagy nem emésztett fibrinogén molekulákkal. Mivel a batroxobin hozzáadása után a vizsgáló rendszerben nem lehet reakciót kimutatni, ezért azt a következtetést lehet levonni, hogy a vizsgálat nem mutatja ki ezeket a fibrinogén-desAA fibrin egységeket. A B minta, amely a pozitív kontroll, desAABB fibrin polimerekből áll, amelyet a plazmaminta trombinnal és hirudinnal való kezelésével állítunk elő. A kezeletlen fibrinogén az A minta, ezt használjuk negatív kontrollként.

Az oldható fibrin komplex származhat még a természetes fibrinogén molekuláknak a XIIIa faktor által létrehozott keresztkötéséből, fibrinogén dimerek létrehozásával [Kanaide és mtsai.: J. Lab. Clin. Med. 86, 574-579 (1975)]. A XIIIa faktorról (FXIIIa) kezelt fibrinogént nem lehet kimutatni a vizsgáló rendszerrel. Ebben a kísérletben a fibrinogénnel kezelt mikrotiter lemezeket először trombinnal aktivált XIIIa faktorról kezeljük 37 °C-on 1,5 óra hosszat. A maradék trombin aktivitás kioltása után az MH1 ellenanyagot az FXIIIa-val kezelt lukakban inkubáljuk, majd a

megkötött MH1-et anti-egér alkalikus foszfatáz konjugátummal mutatjuk ki. A megkötött anti-egér ellenanyagot alkalikus foszfatáz szubsztrát hozzáadásával mutatjuk ki. A lukakhoz kötött MH1 szintjét úgy mérjük, hogy 490 nm-en leolvassuk az optikai sűrűséget. Az 5. ábrán, az Fg+FXIIIa jelzésű minta azt mutatja, hogy a lukakhoz nem kötődött MH1, jelezve, hogy az ellenanyag nem ismeri fel a keresztkötéses fibrinogén struktúrákat. Pozitív kontrollként a fibrinogénnel borított lukakat trombinnal kezeljük, így desAABB fibrin polimereket állítunk elő, és vizsgáljuk az MH1 ellenanyaggal való immunológiai reaktivitását, 5. ábra, Fg+Trombin jelű minta.

6.3.7. Az oldható DesAABB fibrin polimer *in vitro* képződésének mérése

Az oldható DesAAbb fibrin polimereket *in vitro* állítjuk elő, kis mennyiségű trombint (0,025 NIH egység/ml) adva citráttal kezelt plazmamintához. A mintát 37 °C-on inkubáljuk. A mintából percenként alikvot részeket távolítunk el, majd a trombin aktivitását a potens trombin inhibitor, hirudin hozzáadásával oltjuk ki (végkoncentrációja 2 ATU/ml). Az egyes alikvot részekben az oldható DesAABB mennyiségét a 6.3.4. szekcióban ismertetett ELISA eljárással mérjük.

Amint az a 6. ábráról látható, az oldható fibrin polimer mennyisége, amit a 490 nm-en mért abszorbancia mutat, erősen megnő, egy 4-5 perces lag periódus után, ha a plazmához trombint adunk. Az oldható fibrin polimerek szintje a trombinnak a plazmához való hozzáadása után körülbelül 7,5 perccel éri el a csúcspontot. Az oldható fibrinszintnek 9-10 perc után megfigyelt erős csökkenése egybeesik a gélképződéssel és az oldható fibrin polimerek képződésével (rögzítőképződés).

6.3.8. Az oldható fibrin polimerek plazmából való tisztítása Sepharose-MH1 affinitáskromatográfiával

Plazmamintát inkubálunk trombinnal (0,025 egység/ml) 37 °C-on 7 percig. A trombin aktivitását főlegben levő hirudin hozzáadásával oltjuk ki. A reakcióelegyet egy Sepharose-MH1 oszlopon bocsátjuk át. A kiindulási anyag, az átfolyó (megkötetlen anyag), a megkötetlen fehérje (tisztított fehérje), amely fehérjét NaSCN-nel eluálunk (3) és PBS-sel szemben dializálunk, immunológiai reakcióképességét MH1-gyel vizsgáljuk, a 6.3.4. szekcióban ismertetett ELISA vizsgálattal. A trombinnal kezelt plazmának hirudinnal való kioltása után (kiindulási anyag), vagy a megkötött fehérjének az oszlopról való leoldása és dialízis után (elúció), és a meg nem kötött anyag (megkötetlen) immunológiai reaktivitását a 7. ábrán mutatjuk be. A kiindulási anyag és a megkötött fehérje dialízis után immunológiailag reagál az MH1-gyel, míg a meg nem kötött anyag nem reagál.

6.3.9. Az oldható keresztkötéses és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó fibrin polimerek *in vitro* kimutatása az MI diagnosztizálására

36 különböző plazmamintát vizsgálunk meg, hogy mennyi benne az oldható keresztkötéses és oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimer, a 6.3.4. szekcióban ismertetett ELISA vizsgálattal, MH1-gyel mint befogó ellenanyaggal. A begyűjtés után a plazmamintákat antikoagulánsokba tesszük és lefagyaszttjuk. A megolvasztott mintákban megvizsgáljuk, hogy mennyi bennük az oldható keresztkötéses és a keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimer. Ebből a 36 mintából tizet egészséges önkéntesekből vesszük. Az egészséges önkénteseket azok közül a laboratóriumi dolgozók közül választjuk, akik kiváló egészségnek örvendenek, és akiknek nem volt mellkasi fájdalmuk, még megterhelés után sem. Minden egyéb mintát egy helyi kórház intenzív osztályán levő betegektől vettünk. Minden intenzív osztályon levő betegnek klinikai tünetei voltak (mellkasi fájdalom), ami a szívinfarktusra (MI) utal; 15 betegnél megerősítettük, hogy

szívinfarktusuk volt; a többi 11 betegnél megerősítettük, hogy nem volt szívinfarktusuk. Az utóbbi betegcsoportot különböző klinikai állapotúnak diagnosztizáltuk, beleértve az angina pectorist, a szorongást és a tüdőödémát. A vérmintákat közvetlenül azután vettük a betegektől, miután felvettük őket az intenzív osztályra. A legtöbb esetben a tünetek időtartamát is feljegyeztük. Ebben a vizsgálatban minden betegnek mellkasi fájdalma volt, 1-3 órával a kórházba kerülés előtt. Amint az a 8. ábráról látható, minden betegnél, akinél meg lehetett erősíteni az MI-t, lényegesen magasabb szintű volt az oldható DesAABB fibrin polimerek szintje, mint az egészséges kontrolloknál (3-30-szoros különbség). Azoknál a betegeknél, akiknek mellkasi fájdalmuk volt ugyan, de szívinfarktusuk nem, az oldható DesAABB fibrin polimerek szintje nem tért el szignifikánsan az egészséges kontrollok szintjétől (az oldható keresztkötéses és oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerek szintjét "Oldható fibrin ELISA egységek (x1000) szintje" formájában mutatjuk be).

Ennek a vizsgáló módszernek az érzékenysége tehát 100% volt (n=36-ra) és a specifitása is 100% volt (n=36-ra), azaz nem volt hamis pozitív és hamis negatív eredmény. Tehát azt a következtetést lehet levonni, hogy ennek a vizsgáló rendszernek nagy a diagnosztikai pontossága a szívinfarktusra.

6.4. Kitek az oldható, keresztkötéses fibrin polimerek és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó fibrin polimerek *in vitro* kimutatására

Az nyilvánvaló, hogy a vizsgálat során a jelen találmány nem korlátozódik a monoklonális ellenanyagok alkalmazására. Azonban, ha ilyen ellenanyagot használunk, akkor a kit szempontjából ezek a kitek egy standard-sorozatot, egy első ellenanyagot (azaz befogó ellenanyagot, azaz például MH1-et) tartalmaznak, ami immobilizálható a felszínre és tartalmaznak egy második egy második ellenanyagot,

amelyet egy jelgenerátorral jeleztünk az előzőkben leírt módon. Ezek a kiték a standardokat ismert mennyiségű oldható, keresztkötéses DesAABB fibrin polimer és oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimer formájában tartalmazzák. Ezeket a standardokat úgy állíthatjuk elő, hogy oldható keresztkötéses és oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimereket izolálunk, az MH1 Sepharose affinitáskromatográfiás oszlopon, az előzőkben leírt módon. A kiték tartalmazhat még specifikus puffereket, elválasztó ágenseket és kontrollokat. A kiték tartalmazhatnak begyűjtő eszközöket vagy vegyszereket, a vizsgálandó minta kezelésére céljából.

Minden idézett publikációt és szabadalmi bejelentést referenciaként kezelünk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az oldható, keresztkötéses DesAABB fibrin polimerek és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerek jelenlétének vagy mennyiségének *in vitro* kimutatására egy emlős mintából, azzal jellemezve, hogy a mintát egy olyan ellenanyaggal vagy annak immunreaktív fragmensével hozzuk érintkezésbe, amely képes specifikusan kötődni az oldható keresztkötéses DesAABB fibrin polimerekhez és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerekhez, de amely nem képes specifikusan kötődni a következőkhöz: (a) fibrinogén, (b) fibrinogén bomlástermékek, (c) DesAA fibrin monomerek, (d) DesAA fibrin polimerek, (e) DesAABB fibrin monomerek, (f) keresztkötéses fibrinogén, (g) DesAA fibrin monomer-fibrinogén komplex és (h) fibrin bomlástermékek, és kimutatja az immunkomplex jelenlétét vagy mennyiségét.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ellenanyag specifikusan kötődik az MH1 jelű monoklonális ellenanyag által felismert epitophoz, amely ellenanyagot az ATCC HB 9739 hibridóma termeli.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ellenanyag az ATCC HB 9739 hibridóma által termelt MH1 jelű monoklonális ellenanyag.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az emlős minta egy humán minta.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a humán minta egy testfolyadék.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a testfolyadék vér.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az immunkomplexet egy, az említett immunkomplexhez kötődő szekunder ellena-

nyaggal vagy annak egy immunreaktív fragmensével mutatjuk ki vagy határozzuk meg a mennyiségét, aholis az említett szekunder ellenanyagot vagy annak immunreaktív fragmensét egy riporter molekulával jelezzük, amely kimutatható jelet ad, amely megmérhető és korrelál az említett immunkomplex jelenlétével vagy mennyiségével.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szekunder ellenanyag egy olyan ellenanyag, amely az ATCC HB 9740 hibridóma által termelt 45J monoklonális ellenanyag által felismert epitophoz kötődik.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szekunder ellenanyag az ATCC HB 9740 hibridóma által termelt 45J jelű monoklonális ellenanyag.

10. Eljárás trombotikus eseményre való hajlam kiértékelésére, egy trombotikus esemény előfordulása diagnosztizálásának alátámasztására, vagy egy trombotikus esemény követésére egy emlősben, azzal jellemezve, hogy kimutatjuk az oldható, keresztkötéses DeAABB fibrin polimerek és az oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerek mennyiségét egy emlős mintából, úgy, hogy a mintát egy olyan ellenanyaggal vagy annak immunreaktív fragmensével hozzuk érintkezésbe, amely képes immunkomplexet képezni velük, de amely nem képes specifikusan kötődni a következőkhöz: (a) fibrinogén, (b) fibrinogén bomlástermékek, (c) DesAA fibrin monomerek, (d) DesAA fibrin polimerek, (e) DesAABB fibrin monomerek, (f) keresztkötéses fibrinogén, (g) DesAA fibrin monomer-fibrinogén komplex és (h) fibrin bomlástermékek; immunkomplexet létrehozva velük, kimutatva az említett immunkomplex mennyiségét és a kapott értéket egy kontroll mintához hasonlítva, hogy kiértékeljük a trombotikus eseményre való hajlamot, a trombotikus esemény létrejöttét, vagy kövessük a trombotikus eseményt az emlősben.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ellenanyag specifikusan kötődik az MH1 jelű monoklonális ellenanyag által felismert epitophoz, amely ellenanyagot az ATCC HB 9739 hibridóma termeli.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ellenanyag az ATCC HB 9739 hibridóma által termelt MH1 jelű monoklonális ellenanyag.

13. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a trombotikus eseményt az alábbi csoportból választjuk: szívizom infarktus, mélyvénás trombózis, tüdőembólia, disszeminált intravaszkuláris koaguláció, sztrók, és atriális fibrilláció következtében kialakult intrakardiális vérrög.

14. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az emlős minta egy humán minta.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a humán minta egy testfolyadék.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a testfolyadék vér.

17. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az immunkomplex mennyiségét egy, az említett immunkomplexhez kötődő szekunder ellenanyaggal vagy annak egy immunreaktív fragmensével határozzuk meg, aholis az említett szekunder ellenanyagot vagy annak immunreaktív fragmensét egy riporter molekulával jelezzük, amely kimutatható jelet ad, amely megmérhető és korrelál az említett immunkomplex mennyiségével.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szekunder ellenanyag egy olyan ellenanyag, amely az ATCC HB 9740 hibridóma által termelt 45J monoklonális ellenanyag által felismert epitophoz kötődik.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szekunder ellenanyag az ATCC HB 9740 hibridóma által termelt 45J jelű monoklonális ellenanyag.

20. Kit az oldható keresztkötéses DesAABB fibrin polimerek és oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerek *in vitro* kimutatására egy emlős mintából, amely a következő komponenseket tartalmazza:

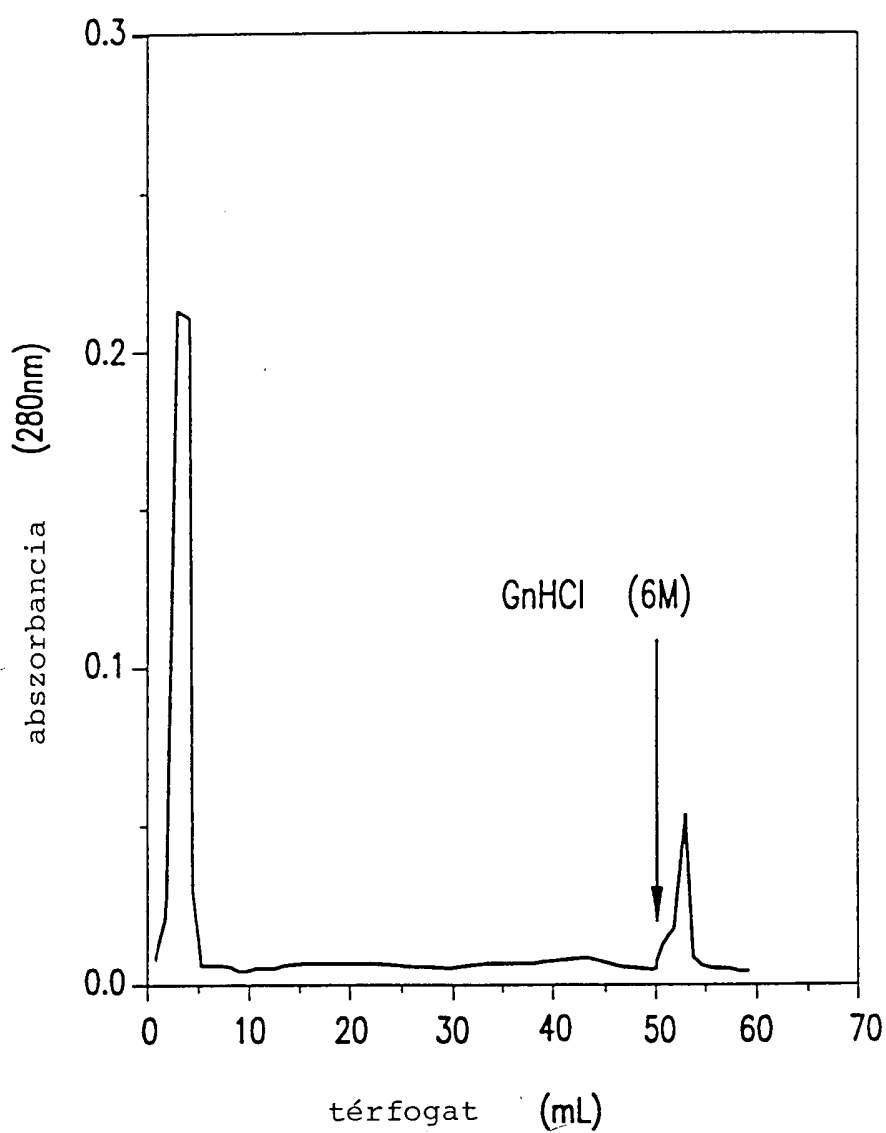
(a) mért mennyiségű standardok, amelyek az említett oldható keresztkötéses DesAABB fibrin polimereket és az említett oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimereket tartalmazzák;

(b) eszközök immunkomplex létrehozására az említett oldható keresztkötéses DesAABB fibrin polimerekkel és az említett, keresztkötést nem tartalmazó oldható DesAABB fibrinekkal, amely eszközök egy ellenanyagot vagy annak immunreaktív fragmensét tartalmazzák, amely ellenanyag vagy immunreaktív fragmens nem kötődik specifikusan az alábbiakhoz: (i) fibrinogén, (ii) fibrinogén bomlástermékek, (iii) DesAA fibrin monomerek, (iv) DesAA fibrin polimerek, (v) DesAABB fibrin monomerek, (vi) keresztkötéses fibrinogén, (vii) DesAA fibrin monomer-fibrinogén komplex és (viii) fibrin bomlástermékek, és

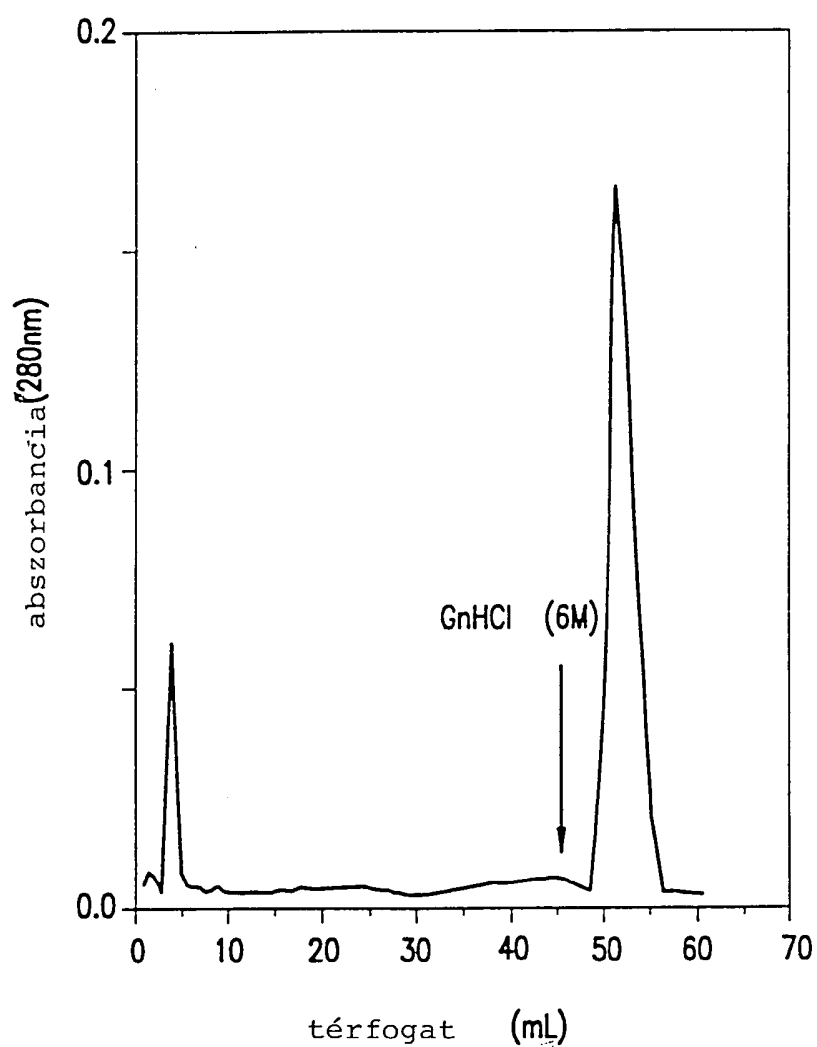
(c) eszközök az említett immunkomplex mennyiségének kimutatására.

21. A 20. igénypont szerinti kit, amelyben az említett oldható keresztkötéses DesAABB fibrin polimerekkel és oldható, keresztkötést nem tartalmazó DesAABB fibrin polimerekkel immunkomplex létrehozására szolgáló eszköz egy ellenanyag vagy annak immunreaktív fragmense, amely specifikusan kötődik az ATCC HB 9739 hibridóma által termelt MH1 jelű monoklonális ellenanyag által felismert epitophoz.

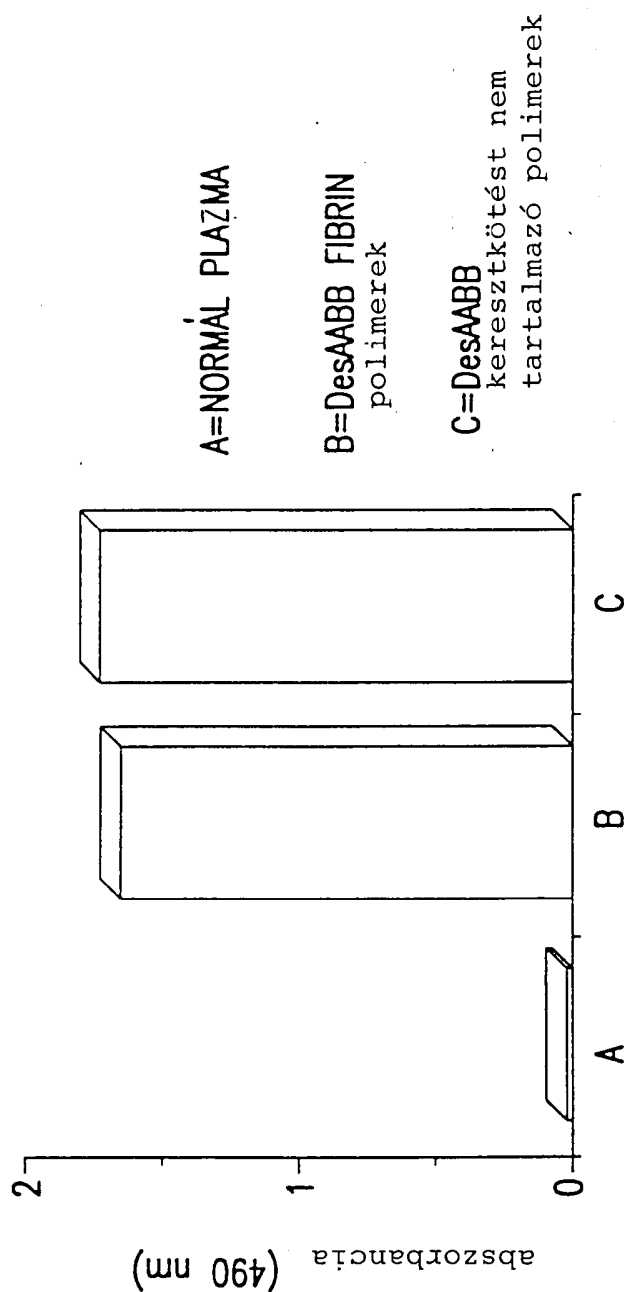
22. A 21. igénypont szerinti kit, amelyben az ellenanyag az ATCC HB 9739 hibridóma által termelt MH1 jelű monoklonális ellenanyag.



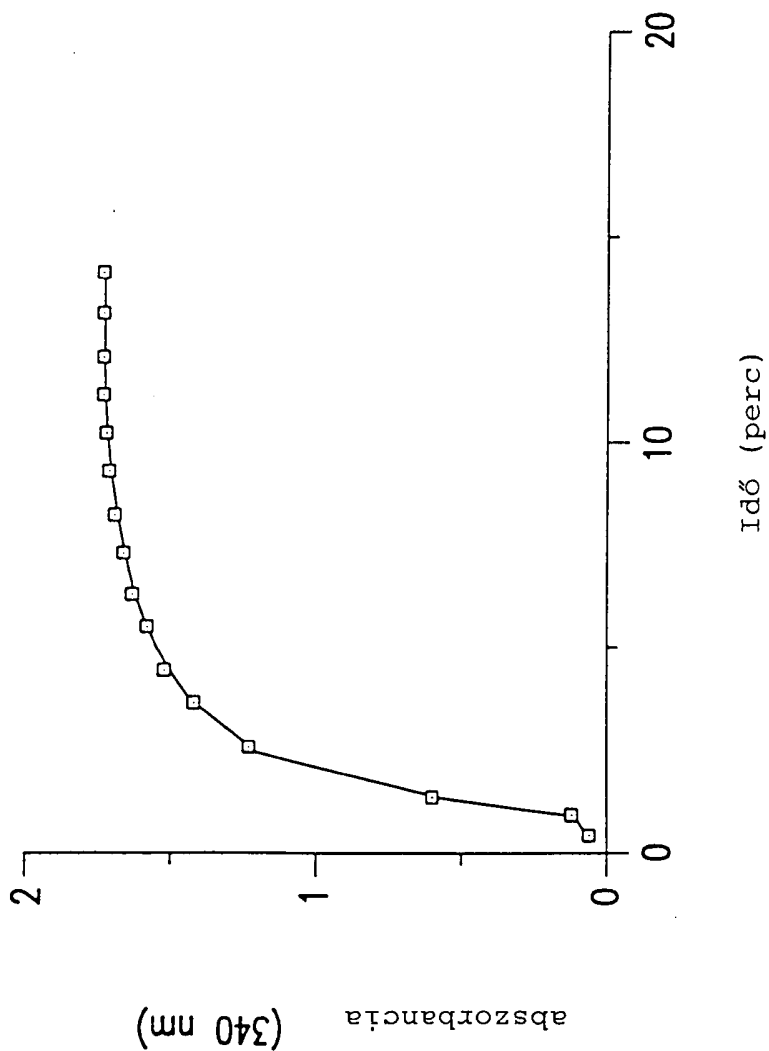
1A ábra



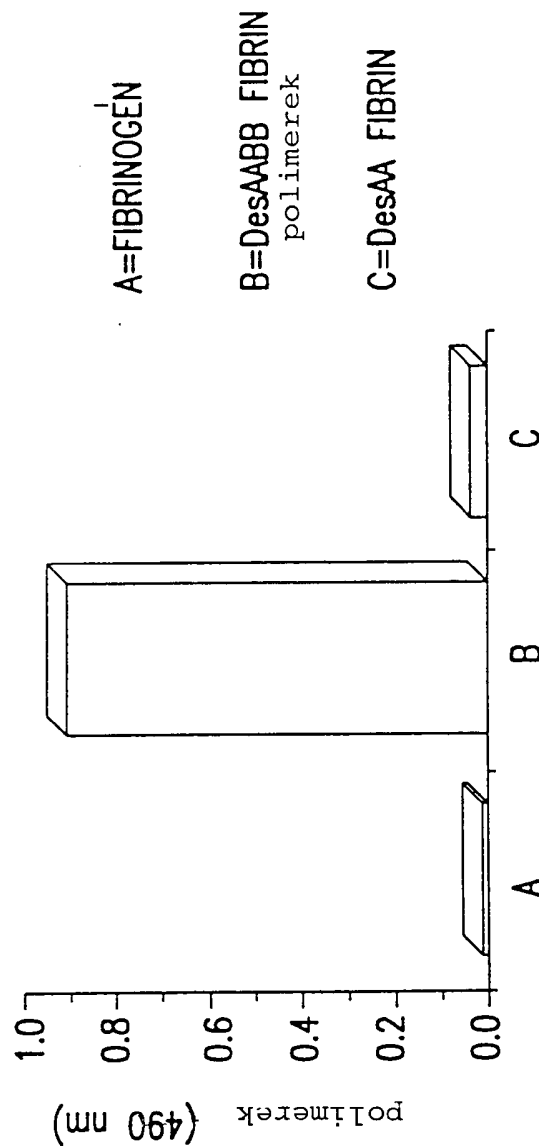
1B ábra



2. ábra

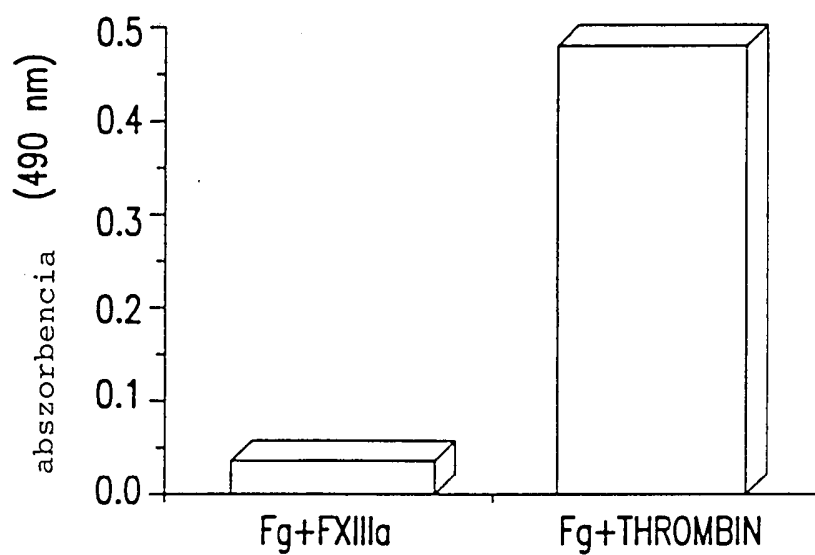


3. ábra

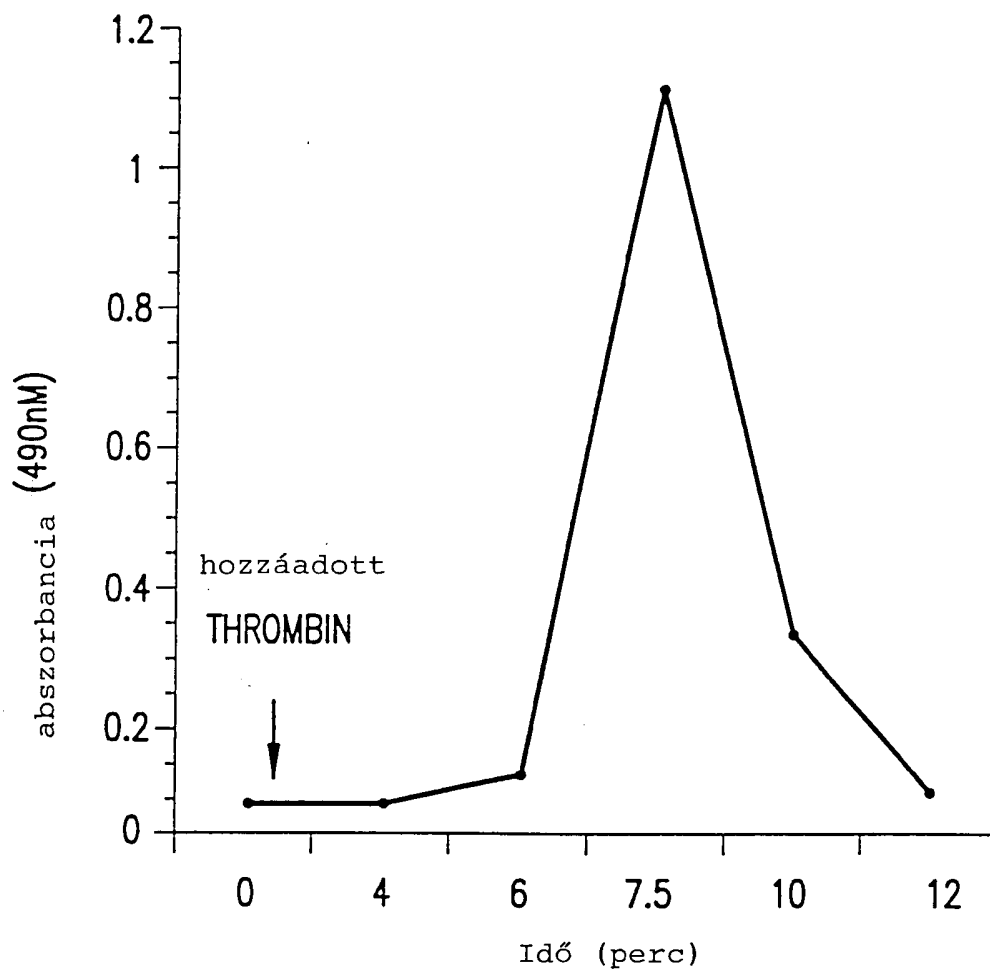


4. ábra

6/9

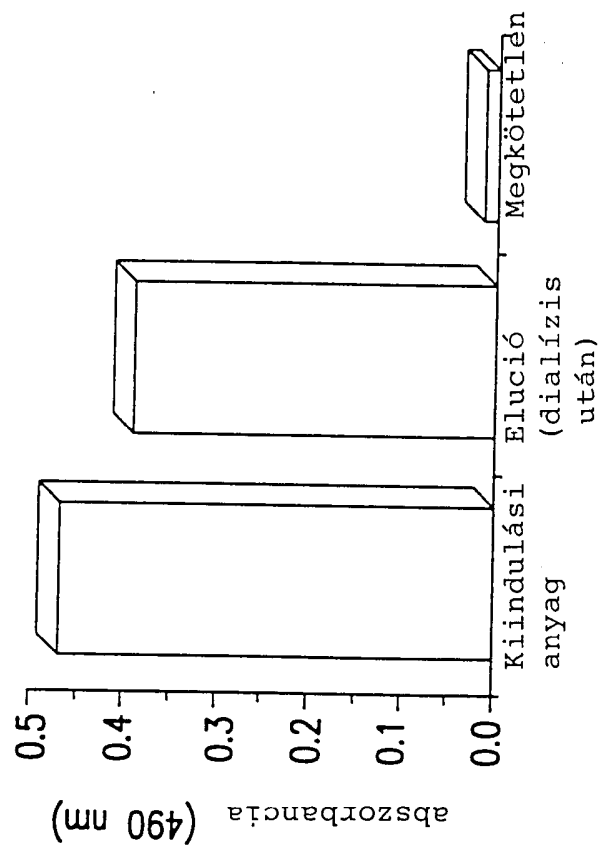


5. ábra



6. ábra

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323



7. ábra

