(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 37 927 T2** 2008.03.20

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 842 949 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 927.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP97/01639**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 922 063.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/043315**
(86) PCT-Anmeldetag: **15.05.1997**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **20.11.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.05.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **18.07.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.03.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C07K 16/18*** (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12N 15/06 (2006.01)
C12R 1/91 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
14513996 15.05.1996 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
KOHNO, Isao, Tokyo 162-0812, JP; INUZUKA, Kimiko, Tokyo 162-0812, JP; ITO, Yumiko, Tokyo 162-0812, JP; FUKUSHI, Ken, Tokyo 162-0812, JP

(54) Bezeichnung: **NEUARTIGE MONOKLONALE ANTIKÖRPER UND VERFAHREN ZUR IMMUNOLOGISCHEN ANALYSE DES e-D DIMERS UND DES e-DD/E-KOMPLEXES**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technischer Bereich

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen neuartigen monoclonalen Antikörper sowie einen immunologischen Test eines D-Dimers, das durch Verdauen von menschlichem stabilisierten Fibrin mit Granulocytenelastase (nachstehend manchmal als "e-D-Dimer" bezeichnet) erzeugt wird, und einen DD/E-Komplex, der durch Verdauen von menschlichem stabilisiertem Fibrin mit Granulocytenelastase (nachstehend manchmal als e-DD/E-Komplex bezeichnet) erzeugt wird.

[0002] Der monoclonale Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung ist als Reagenz für den immunologischen Test des e-D-Dimers und des e-DD/E-Komplexes, welche in Plasma oder Serum erzeugt werden, wenn menschliches stabilisiertes Fibrin mit Granulocytenelastase verdaut wird, nützlich. Das e-D-Dimer und der e-DD/E-Komplex sind als Marker zur Vorhersage von postoperativen Erkrankungen multipler Organe und einer Lungenemphyse anwendbar.

Hintergrund der Erfindung

[0003] In der klinischen Diagnose sind Verdauungsprodukte von menschlichem stabilisiertem Fibrin durch verschiedenartige Proteasen als diagnostische Marker nützlich. Beispielsweise werden ein D-Dimer, das durch Verdauen von menschlichem stabilisiertem Fibrin mit Plasmin erzeugt wird (nachstehend manchmal als "p-D-Dimer" bezeichnet), und ein DD/E-Komplex, der durch Verdauen von menschlichem stabilisiertem Fibrin mit Plasmin erzeugt wird (nachstehend manchmal als "p-DD/E-Komplex" bezeichnet), häufig als diagnostische Marker einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) verwendet. Bei der Bestimmung des p-D-Dimers und des p-DD/E-Komplexes in Proben, die aus einem menschlichen Körper stammen, wird im Allgemeinen die Agglutination von Latex verwendet, der mit einem monoclonalen Antikörper, der spezifisch für das p-D-Dimer ist, sensibilisiert worden war.

[0004] Des Weiteren sind das e-D-Dimer und der e-DD/E-Komplex von menschlichem stabilisiertem Fibrin als Marker zur Vorhersage von postoperativen Erkrankungen multipler Organe und einer Lungenemphyse anwendbar. Die Agglutinationsreaktion von Latex, der mit dem oben erwähnten monoclonalen Antikörper, welcher spezifisch für das p-D-Dimer ist, sensibilisiert wurde, ermöglicht es, das p-D-Dimer und den p-DD/E-Komplex, die unter der Einwirkung von Plasmin erzeugt wurden, zu bestimmen. Die Bestimmung des e-D-Dimers und des e-DD/E-Komplexes, die unter der Einwirkung von Granulocytenelastase erzeugt wurden, ist damit jedoch nicht möglich. Dementsprechend gab es verschiedene Ansätze, um das e-D-Dimer und den e-DD/E-Komplex von menschlichem stabilisierten Fibrin zu bestimmen.

[0005] Von einem monoclonalen Antikörper, der mit einer N-terminalen Stelle (Aα 22–36) reagiert, die in der Aα-Kette von Fibrinogen neu gebildet wird, wenn es mit Granulocytenelastase verdaut wird, wurde bereits berichtet (Blond Coagulation and Fibrinolysis, Bd. 6, p. 259, 1995). Dieser monoclonale Antikörper besitzt eine Antigen-Anbindungsstelle in der E-Domäne und unterscheidet sich deshalb von dem monoclonalen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung. Darüberhinaus reagiert ersterer Antikörper in geringem Masse mit Fibrinogen, weshalb Verdauungsprodukte von Fibrinogen oder Fibrin mit Granulocytenelastase im Plasma nicht mittels EIA, bei der erstere monoclonale Antiköper verwendet wird, bestimmt werden können.

[0006] Weiterhin werden manchmal polyclonale Antikörper verwendet, die dadurch erzeugt wurden, dass Antikörper, die mit Plasmin-verdautem D-Monomer, Plasminverdautem D-Dimer, Plasmin-verdautem DD/E-Komplex sowie Fibrinogen reagieren können aus polyclonalen Antikörpern, die durch Immunisierung mit Granulocytenelastase-D-Fragment des Fibrinogens erhalten wurden, absorbiert und entfernt werden (J. Lab. Clin. Med. Bd. 102, p. 858, 1983); dieses Verfahren ist jedoch recht umständlich.

Offenbarung der Erfindung

[0007] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zum Nachweis von e-D-Dimer- und e-DD-Komplex-Mengen in einer aus einem menschlichen Körper stammenden Probe wie zum Beispiel Plasma bereitzustellen, ohne die Mengen an Fibrinogen, durch Plasmin verdaute Produkte von Fibrinogen oder durch Plasmin verdaute Produkte von menschlichem stabilisierten Fibrin (insbesondere p-D-Dimer oder p-DD/E-Komplex), von welchen angenommen wird, dass sie in einer Probe mit vorhanden sind, zu beeinflussen.

[0008] Andere Aufgaben und Vorteile werden aus der nachstehenden Beschreibung deutlich werden.

[0009] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein monoclonaler Antikörper bereitgestellt, welcher spezifisch reagiert mit einem D-Monomer, das durch Verdauen des menschlichen Fibrinogens mit Granulocytenelastase hergestellt wird, der D-Domäne enthaltenden Verdauungsprodukte, die durch Verdauen von menschlichem stabilisiertem Fibrin mit Granulocytenelastase hergestellt werden, und einem partiellen Aα-Ketten-Fragment eines D-Monomeren, das durch Verdauen von menschlichem Fibrinogen mit Granulocytenelastase hergestellt wird, wobei das partielle Fragment erzeugt wird durch Entfernen eines Polypeptids mit einer Aminosäuresequenz der ersten bis 111ten Aminosäure der Aα-Kette, aber nicht reagiert mit Fibrinogen oder einem Fragment X, Y oder E, die hergestellt werden durch Verdauen von Fibrinogen mit Granulocytenelastase, den Verdauprodukten des menschlichen Fibrinogens mit Plasmin oder den Verdauprodukten des stabilisierten Fibrins mit Plasmin.

[0010] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird auch ein monoclonaler Antikörper bereitgestellt, der mit einem Peptid mit der folgenden Aminosäuresequenz, SEQ ID NO: 1:
Ser Glu Asp Leu Arg Ser
reagiert.

[0011] Weiterhin wird gemäß der vorliegenden Erfindung ein immunologischer Test für ein D-Dimer und einen DD/E-Komplex, welche durch Verdauen von menschlichem stabilisiertem Fibrin mit Granulocytenelastase erzeugt werden, in einer Probe bereitgestellt, die aus einem menschlichen Körper stammt, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe mit einem Träger in Kontakt gebracht wird, der mit dem oben erwähnten monoclonalen Antikörper oder Fragmenten davon beschichtet ist, und das Aggregat nachgewiesen wird, das aus dem D-Dimer oder dem DD/E-Komplex mit dem beschichteten Träger gebildet wird.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0012] Fig. 1 ist eine graphische Darstellung der Korrelation zwischen Antigenkonzentrationen und Agglutinationsraten in Agglutinationsreaktionen, die dadurch herbei geführt wurden, indem verschiedene Antigene mit Latexen in Kontakt gebracht wurden, die mit dem monoclonalen Antikörper IF-101 der vorliegenden Erfindung sensibilisiert worden waren.

Beste Ausführungsmethode der Erfindung

[0013] Der Begriff "Granulocytenelastase", wie er hierin verwendet wird, bezeichnet eine Elastase, die in den azurophilen Granula der Granulocyten enthalten ist; aus den durch örtliche Entzündung aktivierten Granulocyten freigesetzt wird; und die physiologische Substrate wie zum Beispiel in der Zellmatrix enthaltene Elastin, Kollagen, Fibronectin oder das Proteoglycan sowie Proteine des Blutes wie zum Beispiel Fibrinogen, Fibrin, Plasminogen oder Antithrombin III am Carbonsäureterminus der hydrophoben Aminosäuren wie zum Beispiel Valin oder Alanin hydrolysiert.

[0014] In der vorliegenden Beschreibung wird ein Verdauungsprodukt, das durch Verdauen mit Granulocytenelastase erzeugt wurde, manchmal dadurch gekennzeichnet, dass der Buchstabe "e" dem Namen des Produktes vorangestellt wird. Beispielsweise wird das D-Monomer, das durch Verdauen von menschlichem Fibrinogen mit Granulocytenelastase erzeugt wird, ein Fragment X, das durch Verdauen von menschlichem Fibrinogen mit Granulocytenelastase hergestellt wird, ein Fragment Y, das durch Verdauen von menschlichem Fibrinogen mit Granulocytenelastase hergestellt wird, oder ein Fragment E, das durch Verdauen von menschlichem Fibrinogen mit Granulocytenelastase hergestellt wird, als e-D-Monomer von menschlichem Fibrinogen, e-Fragment X von menschlichem Fibrinogen, e-Fragment Y von menschlichem Fibrinogen beziehungsweise als e-Fragment E von menschlichem Fibrinogen bezeichnet.

[0015] Weiterhin wird in der vorliegenden Beschreibung ein Verdauungsprodukt, das durch Verdauen mit Plasmin hergestellt wurde, manchmal dadurch gekennzeichnet, dass der Buchstabe "p-" dem Namen des Produktes vorangestellt wird.

[0016] Der monoclonale Antikörper der vorliegenden Erfindung kann durch ein Verfahren zur Herstellung von monoclonalen Antikörpern aus einem Hybridom erhalten werden, das mittels einer Methode zur Zellfusion hergestellt wurde, wie sie in verschiedenen Bereichen in der letzten Zeit verwendet wurden.

[0017] Der monoclonale Antikörper der vorliegenden Erfindung reagiert spezifisch mit dem D-Monomer, das

durch Verdauen von menschlichem Fibrinogen mit Granulocytenelastase hergestellt wird (e-D-Monomer), und den die D-Domäne enthaltenden Verdauungsprodukte, die durch Verdauen von menschlichem stabilisiertem Fibrin mit Granulocytenelastase hergestellt werden, reagiert aber nicht mit Fibrinogen oder den Fragmenten X, Y oder E, die durch Verdauen von Fibrinogen mit Granulocytenelastase hergestellt werden. Der Begriff "D-Domäne enthaltende Verdauungsprodukte, die durch Verdauen von menschlichem stabilisiertem Fibrin mit Granulocytenelastase hergestellt werden" bezeichnet Verdauungsprodukte, welche durch eine Behandlung von menschlichem stabilisiertem Fibrin mit Granulocytenelastase hergestellt werden und die eine e-D-Domäne von menschlichem stabilisiertem Fibrin enthalten. Es können beispielsweise e-DD/E-Polymer ähnliche Substanzen erwähnt werden, die e-DD/E-Einheiten, das e-D-Dimer oder den e-DD/E-Komplex, insbesondere das e-D-Dimer oder den e-DD/E-Komplex enthalten.

[0018] Der monoclonale Antikörper der vorliegenden Erfindung reagiert vorzugsweise nicht mit Verdauungsprodukten von menschlichem Fibrinogen durch Plasmin oder mit Verdauungsprodukten von menschlichem stabilisiertem Fibrin durch Plasmin.

[0019] Die vorliegende Erfindung betrifft einen monoclonalen Antikörper, der mit einem Peptid mit der folgenden Aminosäuresequenz, SEQ ID NO: 1:
Ser Glu Asp Leu Arg Ser
reagiert. Die oben genannte Aminosäuresequenz, SEQ ID NO: 1, entspricht der Aminosäuresequenz der 112ten bis 117ten Aminosäure der Aα-Kette, wobei vom N-Terminus der Aα-Kette gezählt wird. Die Aα-Kette ist eines von drei Polypeptiden (d.h. Aα-Kette, Bβ-Kette und γ-Kette), aus denen menschliches Fibrinogen aufgebaut ist. Weiterhin entspricht die oben genannte Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 1 der Aminosäuresequenz der ersten bis sechsten Aminosäure eines partiellen Fragments der Aα-Kette, wobei vom Aminogruppenende des partiellen Aα-Ketten-Fragments gezählt wird, welches eines der Polypeptide darstellt, aus denen mit Granulocytenelastase verdaute D-Monomere von menschlichem Fibrinogen aufgebaut sind; und zwar ein Peptid, das erzeugt wird durch Entfernen eines Polypeptids mit einer Aminosäuresequenz der ersten bis 111ten Aminosäure der Aα-Kette; hierin als/α-Kette bezeichnet.

[0020] Der monoclonale Antikörper der vorliegenden Erfindung reagiert vorzugsweise mit dem Peptid mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1 und reagiert spezifisch mit dem e-D-Monomer von menschlichem Fibrinogen und den eine D-Domäne enthaltenden Verdauungsprodukten von menschlichem stabilisierten Fibrin durch Granulocytenelastase. Er reagiert aber nicht mit Fibrinogen oder den Fragmenten X, Y oder E, die durch Verdauen von Fibrinogen mit Granulocytenelastase hergestellt wurden. Stärker bevorzugt reagiert der monoclonale Antikörper der vorliegenden Erfindung nicht mit Verdauungsprodukten von menschlichem Fibrinogen durch Plasmin oder mit Verdauungsprodukten von menschlichem stabilisierten Fibrin durch Plasmin.

[0021] Der monoclonale Antikörper der vorliegenden Erfindung kann durch Kultivieren eines Hybridoms (wie zum Beispiel eines Maushybridoms), welches in der Lage ist, einen derartigen monoclonalen Antikörper zu erzeugen, hergestellt werden, beispielsweise in einem geeigneten Medium oder in der Bauchhöhle eines Säugetieres wie zum Beispiel einer Maus. Das Hybridom kann durch Zellfusion einer Säuger- (zum Beispiel Maus) oder Vogel-Milzzelle, die mit dem e-D-Dimer als Immunogen immunisiert wurde, und einer Myelomzelle eines Säugetieres (zum Beispiel Maus) gemäß der Standardmethode der Zellfusion nach Köhler und Milstein (siehe Nature, Vol. 256, S. 495, 1975) hergestellt werden. Im Besonderen kann das Hybridom gemäß der nachstehend in den Beispielen genannten Verfahren hergestellt werden.

[0022] Als Medium zur Kultivierung der Hybridome kann ein jegliches Medium, das zur Kultivierung eines Hybridoms geeignet ist, verwendet werden. Vorzugsweise wird ein Medium, das Dulbecco modifiziertes Eagle-Minimalmedium (nachstehend als DME bezeichnet) sowie fötales Kälberserum, L-Glutamin, L-Brenztraubensäure und Antibiotika (Penicillin G und Streptomycin) enthält, verwendet.

[0023] Die Kultivierung des Hybridoms wird bevorzugt in beispielsweise 5% CO_2 bei 37°C über etwa 3 Tage in einem Medium oder über etwa 14 Tage in der Bauchhöhle von Mäusen durchgeführt.

[0024] Es ist möglich, den monoclonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung aus der entstandenen Kulturbrühe oder der Aszitesflüssigkeit der Mäuse zu isolieren oder zu reinigen, beispielsweise unter Verwendung einer allgemeinen zur Isolierung und Reinigung von Proteinen verwendeten Methode. Als Beispiele dazu seien das Aussalzen mit Ammoniumsulfat, Ionenaustausch-Säulenchromatographie unter Verwendung von Cellulose als Ionenaustauscher, Molekularsieb-Säulenchromatographie unter Verwendung eines Gels als Molkularsieb, Affinitäts-Säulenchromatographie unter Verwendung von Protein A bindenden Polysacchariden, Dialyse oder Lyophilisierung genannt.

[0025] Als Fragmente des Antikörpers der vorliegenden Erfindung, namentlich die Antikörper-Fragmente des monoclonalen Antikörpers gemäß der vorliegenden Erfindung, welche eine antigenbindende Stelle enthalten, die spezifisch mit dem D-Monomer, das durch Verdauen von menschlichem Fibrinogen mit Granulocytenelastase hergestellt wurde, und den eine D-Domäne enthaltenden Verdauungsprodukten reagiert, die durch Verdauen von menschlichem stabilisiertem Fibrin durch Granulocytenelastase hergestellt wurden, seien beispielsweise Fab, Fab', $F(ab')_2$ und Fv genannt. Das Fragment kann beispielsweise durch Verdauen des monoclonalen Antikörpers der vorliegenden Erfindung mit einer Protease in herkömmlicher Weise erhalten werden, woraufhin ein herkömmliches Isolations- und Reinigungsverfahren für Proteine durchgeführt wird.

[0026] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann bei einem herkömmlichen Agglutinationsverfahren wie zum Beispiel einem Latex-Agglutinationsverfahren angewendet werden, mit der Ausnahme, dass der monoclonale Antikörper oder ein Fragment davon gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet wird. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann nicht nur beim visuellen Nachweis von Agglutination auf gläsernen Objektträgern angewendet werden, sondern auch bei optisch automatisierten Verfahren mittels automatischer Analysatoren. Weiterhin ist es gemäß des Verfahrens der vorliegenden Erfindung möglich, das Vorhandensein von mit Granulocytenelastase verdautem D-Dimer und von mit Granulocytenelastase verdautem DD/E-Komplex von menschlichem stabilisierten Fibrin nachzuweisen, oder das mit Granulocytenelastase verdaute D-Dimer und den mit Granulocytenelastase verdauten DD/E-Komplex von menschlichem stabilisierten Fibrin semi-quantitativ oder quantitativ zu bestimmen.

[0027] Ein Träger, der mit den monoclonalen Antikörpern und/oder Fragmenten davon beschichtet wurde und welcher im Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, kann mittels eines herkömmlich bekannten Verfahrens hergestellt werden. Ein Träger (wie etwa ein wasserunlöslicher Träger, vor allem Polystyrollatex) wird beispielsweise mit einem die Antikörper enthaltenden Puffer durch Rühren vermischt, das Gemisch wird zentrifugiert und der so entstandene Niederschlag in einem geeigneten Puffer suspendiert.

[0028] Der beschichtete Träger kann mit dem e-D-Dimer und dem e-DD/E-Komplex beziehungsweise dem e-D-Monomer reagieren, nicht jedoch mit anderen Substanzen. Wird der beschichtete Träger in Kontakt mit dem e-D-Dimer oder dem e-DD/E-Komplex gebracht, wird eine Agglutinationsreaktion des beschichteten Trägers hervorgerufen, da das e-D-Dimer und der e-DD/E-Komplex mehrfach antigene Determinaten aufweisen. Im Gegensatz dazu weist das e-D-Monomer nur eine antigene Determinante auf. Dementsprechend wird, wenn der beschichtete Träger mit dem e-D-Monomer in Kontakt gebracht wird, keine Agglutinationsreaktion des beschichteten Trägers hervorgerufen. Daher wird, wenn eine Probe, die das e-D-Dimer, den e-DD/E-Komplex sowie das e-D-Monomer enthält, in Kontakt mit den beschichteten Trägern gebracht wird, die Agglutinationsreaktion durch die Reaktion mit dem e-D-Dimer und dem e-DD/E-Komplex hervorgerufen. Die Menge an e-D-Dimer und/oder e-DD/E-Komplex in einer Probe, die von einem lebenden Körper stammt, kann ohne den Einfluss des e-D-Monomers auf Grund der Unterschiede in diesen Agglutinationsreaktionen gemessen werden.

[0029] Die Menge einer Fraktion, die eine Raumstruktur des e-D-Dimers und/oder des e-DD/E-Komplexes in der Probe, die von einem lebenden Körper stammt, beibehält, kann beispielsweise dadurch bestimmt werden, dass eine bestimmte Menge an beschichteten Latizes und eine bestimmte Menge an Probe aus einem menschlichen Körper auf einer Trägerplatte oder einer Mikrotiterplatte über einen bestimmten Zeitraum hinweg mit einander vermischt werden und daraufhin das Vorhandensein oder Fehlen von Aggregaten oder die Festigkeit der Aggregate beobachtet wird. Alternativ dazu kann eine Menge einer Fraktion, die eine Raumstruktur des e-D-Dimers und/oder des e-DD/E-Komplexes in der Probe, die von einem lebenden Körper stammt, beibehält, dadurch bestimmt werden, dass eine bestimmte Menge an beschichteten Latizes und eine bestimmte Menge an Probe aus einem menschlichen Körper miteinander vermischt werden und daraufhin nach einer bestimmten Zeit eine Absorptionszunahme bei einer geeigneten Wellenlänge spektroskopisch gemessen wird.

[0030] Des weiteren reagiert der beschichtete Träger in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung weder mit menschlichem Fibrinogen noch mit Verdauungsprodukten von menschlichem Fibrinogen durch Plasmin oder mit Verdauungsprodukten von menschlichem stabilisiertem Fibrin durch Plamin, auch wenn die Probe, die aus einem lebenden Körper stammt, derartige Bestandteile enthält. Daher kann die Menge an e-D-Dimer und/oder e-DD/E-Komplex in der Probe ohne den Einfluss derartiger Bestandteile gemessen werden.

[0031] Dabei kann es sich bei der Probe, die aus einem lebenden Körper stammt und die in der vorliegenden Erfindung getestet werden kann, zum Beispiel um Plasma, Serum oder Urin handeln.

Beispiele

[0032] Die vorliegenden Erfindung wird nun durch die folgenden Beispiele näher veranschaulicht, ist jedoch bei weitem nicht darauf beschränkt.

Beispiel 1: Herstellung des e-D-Dimers und des e-DD/E-Komplexes

[0033] Das e-D-Dimer wurde weitgehend in Übereinstimmung mit der Methode von Stephanie A. Olexa und Andrei Z. Budzynski (1978), der Methode von Olexa et al., Circulation, Erg. 58, 119, (1979) sowie der Methode in Biochim. Biophys. Acta 576, S. 39 bis 50, hergestellt. Menschliches Thrombin (in der Endkonzentration von 10 Einheiten/ml) und Calciumchlorid (in der Endkonzentration von 10 mM) wurden zu 20 mg (10 mg/ml) Fibrinogen (Kabi Diagnostica; Schweden) gegeben und bei 37°C über 2 Stunden reagieren gelassen, um Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln. Das Fibrin wurde mittels Zentrifugieren (18.000 × g) für 30 Minuten von den nicht-koagulierten Bestandteilen getrennt. Das Fibrin wurde in 20 ml eines 0,15 M Tris-HCl-Puffers (pH 7,8)/5 mM Calciumchlorid/0,02% NaN_3 suspendiert. Zu der so erhaltenen Suspension wurden 0,5 ml menschliche Granulocytenelastase (25 Einheiten/ml; Elastin Product; USA) gegeben. Eine Reaktion wurde bei 37°C durchgeführt. Nach 8 Stunden wurde Diisopropylfluorphosphat (DFP) (Mobay Chemical Corp.) in der Endkonzentration von 2 mM zugegeben, um die Verdauung zu beenden. Die Verdauungsprodukte, die durch die Behandlung über 1 Stunde nach der Zugabe von DFP erhalten wurden, wurden als die DD/E-Komplex/Granulocytenelastase-Verdauungsprodukte von stabilisiertem Fibrin bezeichnet. Das Fragment war das Gemisch aus DD/E und DD/E-Polymer-ähnlichen Substanzen, das DD/E-Basiseinheiten enthielt.

[0034] Eine Sepharose CL6B-Säule (Pharmacia; Schweden; Durchmesser = 2,6 cm; Länge = 90 cm), welche mit einem 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5)/0,15 M Natriumchlorid/5 mM Calciumchlorid (nachstehend als Lösung A bezeichnet) äquilibriert worden war, wurde mit den so erhaltenen DD/E-Komplex/Granulocytenelastase-Verdauungsprodukten von stabilisiertem Fibrin beladen, mittels Molekularsieb-Chromatographie behandelt und mit Lösung A entwickelt. Die e-DD/E-Komplex-Fraktion wurde mittles Molekulargewichtsmarkern und der Ouchterlony-Methode unter Verwendung von anti-D-Antiserum und anti-E-Antiserum (Hoechst, Deutschland) identifiziert und isoliert. Der enthaltene e-DD/E-Komplex wurde bei 37°C über 4 Stunden in einer 3 M Harnstoff/50 mM Citrat-Lösung (pH 5,5) inkubiert. Eine Sepharose CL6B-Säule (Durchmesser = 2,6 cm; Länge = 90 cm), welche mit einem 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,4)/28 mM Natriumcitrat/0,1 M Natriumchlorid (nachstehend als Lösung B bezeichnet) äquilibriert worden war, wurde mit dem so erhaltenen Harnstoff behandelten e-DD/E-Komplex beladen und mit Lösung B entwickelt. Die e-D-Dimer-Fraktion (DD) und die e-E-Fraktion (E) wurden mittles Molekulargewichtsmarkern und der Ouchterlony-Methode unter Verwendung von anti-D-Antiserum und anti-E-Antiserum identifiziert und isoliert. Als Ergebnis wurden 10 ml des e-D-Dimers mit einer bestimmten Absorbanz (A280 nm = 2,0) erhalten. Das erhaltene e-D-Dimer wurde sowohl als Immunogen zur Herstellung von Hybridomen, welche monoclonale Antikörper sezernieren können, die spezifisch mit dem e-D-Dimer reagieren, wie auch als Antigen zum Selektieren der Hybridome im Enzym-Immuntest (ELISA) verwendet.

Beispiel 2: Herstellung der Hybridome

(a) Herstellung von immunisierten Milzzellen

[0035] Die in Beispiel 1 gewonnene immunogene e-D-Dimer-Lösung (A280 nm = 2,0) wurde mit dem gleichen Volumen kompletten Freundschen Adjuvans bis zum Emulgieren vermischt, und daraufhin wurden Mäusen 100 µl des Gemisches intraperitoneal verabreicht, um diese zu immunisieren (erste Immunisierung). Nach 30 Tagen wurde den Mäusen auf gleiche Weise das oben genannte Gemisch intraperitoneal verabreicht (zweite Immunisierung). 21 Tage nach der zweiten Immunisierung wurden den Mäusen 100 µl der verdünnten Lösung, die durch Verdünnen der immunogenen e-D-Dimer-Lösung (A280 nm = 2,0) mit dem gleichen Volumen an physiologischer Kochsalzlösung hergestellt worden war, intravenös verabreicht (letzte Immunisierung). 3 Tage nach der letzten Immunisierung wurden den Mäusen die Milzen steril entnommen und in den nachfolgenden Zellfusionen verwendet.

(b) Zellfusion

[0036] Die oben genannten, steril entnommenen Milzen wurden in Laborschüsseln gegeben, die 5 ml DME-Medium mit 10 bis 15% fötalem Kälberserum enthielten. Daraufhin wurden die Milzen mit etwa 15 ml DME-Medium mit 10–15% fötalem Kälberserum perfundiert, um so die Milzzellen herauszuspülen. Die so erhaltene Suspension von Milzzellen wurde durch ein Nylonmaschennetz passiert. Die Milzzellen wurden in ei-

nem 50 ml-Zentrifugationsröhrchen gesammelt und bei 500 × g 10 Minuten lang zentrifugiert. Den so erhaltenen Pellets wurden 3 bis 5 ml Hämolyselösung (155 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 1 mM Na_2EDTA; pH 7,0) zugegeben, um die Pellets darin zu suspendieren. Die Suspension wurde bei 0°C 5 bis 10 Minuten lang stehen gelassen, um die roten Blutkörperchen darin zu lysieren. Ein DME-Medium (10 bis 20 ml), das 10–15% fötales Kälberserum enthielt, wurde zugegeben und das Gemisch zentrifugiert. Die so erhaltenen Zellpellets wurden in einem DME-Medium mittels der Zentrifugationsmethode gewaschen und die Anzahl der lebenden Milzzellen wurde ermittelt.

[0037] Die oben genannten Milzzellen (1×10^8) wurden zu etwa 2×10^7 vorher kultivierten Mausmyelomzellen SP2/0-Ag14 zugegeben, das Ganze wurde gründlich in DME-Medium vermischt und zentrifugiert (500 × g, 10 Minuten). Der Überstand wurde abgesaugt und die Pellets wurden gründlich abgelöst. Es wurden tropfenweise 0,5 ml 40% Polyethylenglykol-4000-Lösung (auf 37°C erwärmt) zugegeben, woraufhin das Zentrifugationsröhrchen 1 Minute lang vorsichtig von Hand gedreht wurde, um so die Polyethylenglykol-Lösung mit den Zellpellets zu vermischen. Daraufhin wurde auf 37°C erwärmtes DME-Medium 1 ml-weise alle 30 Sekunden zugegeben und das Röhrchen vorsichtig gedreht. Nachdem dieses Vorgehen zehnmal wiederholt worden war, wurden 20 bis 30 ml eines DME-Mediums, das 10 bis 15% fötales Kälberserum enthielt, zugegeben und das Ganze wurde zentrifugiert (500 × g, 10 Minuten). Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurden die Zellpellets zweimal mit Hilfe der Zentrifugationsmethode in HAT-Medium (hergestellt aus DME-Medium durch Zusatz von Aminopterin, Thymidin und Hypoxanthin, so dass folgende Konzentrationen 4×10^{-7} M, $1{,}6 \times 10^{-5}$ M beziehungsweise 1×10^{-4} M erhalten wurden), das 10 bis 15% fötales Kälberserum enthielt, gewaschen und daraufhin in 40 ml des HAT-Mediums suspendiert. Die Zellsuspension wurde in einer Menge von 200 µl/Vertiefung in die einzelnen Vertiefungen einer Kultivierungsplatte mit 96 Vertiefungen ausgebracht und in einem CO_2-Inkubator mit 5% Kohlendioxidgas bei 37°C inkubiert. Während der Kultivierung wurden aus jeder Vertiefung in 2- oder 3-Tagesabständen etwa 100 µl des Mediums entfernt und mit 100 µl frischem HAT-Medium ersetzt, um so die Hybridome, die in HAT-Medium wachsen, zu selektieren. Nach etwa 8 Tagen wurde das Medium durch ein HT-Medium (hergestellt aus CME-Medium durch Zusatz von Thymidin und Hypoxanthin, so dass folgende Konzentrationen $1{,}6 \times 10^{-5}$ M beziehungsweise 1×10^{-4} M erhalten wurden), das 10 bis 15% fötales Kälberserum enthielt, ersetzt und das Wachstum der Hybridome beobachtet. Etwa um den achten Tag herum wurden die Hybridome, die die mit dem e-D-Monomer und dem e-D-Dimer reagierende Antikörper (nachfolgend als Anti-e-D-Monomer/e-D-Dimer-Antikörper bezeichnet) herstellen, mit Hilfe der ELISA-Methode abgesucht, wie nachfolgend beschrieben.

(c) Etablierung der Hybridome

[0038] Das Vorhandensein der so hergestellten Antikörper im Überstand der Hybridomkultur wurde mit Hilfe der ELISA-Methode bestimmt. In jede Vertiefung einer ELISA-Platte mit 96 Vertiefungen (Immulon II; Nippon Dynatech K.K) wurden je 50 µl der in Beispiel 1 erhaltenen gereinigten e-D-Dimer-Lösung (A280 nm = 0,05, verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung) gegeben und bei 25°C 2 Stunden lang stehen gelassen. Daraufhin wurden die Vertiefungen dreimal mit 0,05% Tween 20/physiologischer Kochsalzlösung gespült. Danach wurden jeder Vertiefung 50 µl Überstand der Hybridomkultur zugefügt und 1 Stunde lang eine Reaktion bei 25°C durchgeführt.

[0039] Daraufhin wurden jeder Vertiefung 50 µl eines Peroxidase-konjugierten anti-Maus-Antikörpers (Dako Co., Dänemark), der 200-fach mit 0,05% Tween 20/physiologischer Kochsalzlösung verdünnt worden war, zugegeben. Nachdem die Reaktion vollständig abgelaufen war, wurden die Vertiefungen dreimal mit 0,05 Tween 20/physiologischer Kochsalzlösung gespült. Daraufhin wurden jeder Vertiefung 250 µl einer 0,5 mM Aminoantipyrine, 10 mM Phenol und 0,005% Wasserstoffperoxid enthaltenden Lösung zugegeben und es wurde 30 Minuten lang eine Reaktion bei 25°C durchgeführt. Dann wurde von jeder Vertiefung die Absorption bei 490 nm gemessen. Als Ergebnis konnte in 12 der 192 Vertiefungen eine Antikörperproduktion beobachtet werden.

[0040] Die mit Hilfe der oben beschriebenen ELISA-Methode ausgewählten anti-e-D-Dimer-Antikörper in den Kulturüberständen wurden auf ihre Reaktivität gegenüber e-D-Monomer, e-Fragment X, e-Fragment Y, e-Fragment E sowie Fibrinogen unter Verwendung von ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen, die mit den Antigenen auf gleiche Art und Weise sensibilisiert worden waren, hin untersucht. Die Endergebnisse zeigten, dass von den 12 Kulturüberstanden der Vertiefungen, die mit dem e-D-Dimer reagierten, der Kulturüberstand einer Vertiefung mit dem e-D-Monomer reagierte, aber nicht mit dem e-Fragment X, dem e-Fragment Y, dem e-Fragment E oder mit Fibrinogen, während die Kulturüberstände der verbleibenden 11 Vertiefungen zwar nicht mit e-Fragment E reagierten, jedoch mit dem e-D-Monomer, dem e-Fragment X, dem e-Fragment Y und mit Fibrinogen.

[0041] Die Hybridome in den spezifisch auf e-D-Dimer und e-D-Monomer reagierenden Überständen in den

Vertiefungen wurden auf eine Platte mit 24 Vertiefungen übertragen und über 4 bis 5 Tage in einem HT-Medium, das 10 bis 15% fötales Kälberserum enthielt, kultiviert. Danach wurden mit Hilfe der ELISA-Methode die Kreuzreaktivitäten mit Verdauungsprodukten des Fibrinogens durch Plasmin (ein Gemisch aus p-Fragment X, p-Fragment Y, p-Fragment D und p-Fragment E) und Verdauungsprodukten von stabilisiertem Fibrin durch Plasmin (p-DD/E-Komplex) bestimmt, wobei keine Kreuzreaktionen mit mit Plasmin verdauten Produkten zu finden waren. Darüberhinaus wurde das Vorhandensein der hergestellten anti-e-D-Monomer/e-D-Dimer-Antikörper mit Hilfe der ELISA-Methode bestätigt, woraufhin Clonieren mittels der Grenzverdünnungsmethode durchgeführt wurde. Bei der Grenzverdünnungsmethode wurden in jede Vertiefung einer Platte mit 96 Vertiefungen 100 µl einer mit HT-Medium dahingehend verdünnten Zellsuspension, dass die Hybridom-Konzentration 5 Hybridome/ml betrug, gegeben, wobei in jede Vertiefung vorher 2×10^4 Bauchzellen von normalen BALB/C-Mäusen gegossen worden waren. Nach etwa 10 Tagen wurden anti-e-D-Dimer- und anti-e-D-Monomer-Antiköper produzierende Hybridomclone mit Hilfe der ELISA-Methode abgesucht. Als Ergebnis wurden 20 Antiköper produzierende Clone erhalten. Aus diesen Clonen wurden stabile Clone ausgewählt, die starke Proliferation und eine große Fähigkeit zur Antikörpersezernierung aufwiesen, mittels des vorstehend genannten Verfahrens nochmals cloniert und das anti-e-D-Monomer/e-D-Dimer-Antikörper produzierende Hybridom IF-101 wurde gewonnen. Das vorstehend genannte Hybridom wurde lokal am National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology Agency of Industrial Science and Technology (Adresse: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305, Japan) am 24. April 1996 unter der Hinterlegungsnummer FERM P-15599 hinterlegt und am 31. März 1997 in eine internationale Hinterlegung überführt. Die internationale Hinterlegungsnummer ist FERM BP-5890.

Beispiel 3: Herstellung des monoclonalen Antikörpers

(a) In vitro-Methode

[0042] Das Maushybridom IF-101 wurde in einem DME-Medium, das 15% fötales Kälberserum enthielt, bei 37°C über 72 bis 96 Stunden in einer 5% CO_2-Atmosphäre kultiviert. Nach dem Zentrifugieren der Kultur (10.000 × g, 10 Minuten) wurde dem Überstand stufenweise festes Ammoniumsulfat zugegeben, so dass die Endkonzentration davon 50% betrug. Das Gemisch wurde 30 Minuten lang unter Kühlen in Eis gerührt. Nachdem das Gemisch 60 Minuten lang stehen gelassen worden war, wurde das Gemisch zentrifugiert (10.000 × g, 10 Minuten). Der Niederschlag wurde in einer geringen Menge 10 mM Phosphatpuffer (pH 8,0) gelöst und gegen eine 1000-fache Menge 10 mM Phosphatpuffer dialysiert. Eine DEAE-Cellulose-Säule, die mit 10 mM Phosphatpuffer äquilibriert worden war, wurde mit dem so erhaltenen Dialysat beladen. Der monoclonale Antikörper wurde mit Hilfe der Dichtegradientenmethode zwischen 10 mM Phosphatpuffer (pH 8,0) und 10 mM Phosphatpuffer (pH 8,0) mit 0,2 M NaCl eluiert. Der eluierte monoclonale Antikörper wurde durch Ultrafiltration konzentriert und gegen einen 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8,0) dialysiert. Um das Rinderserum-IgG zu entfernen, wurde das dialysierte Produkt über eine Ziegen-anti-Rind-IgG-Sepharose 4B-Säule geleitet. Die durchgelaufene Lösung wurde daraufhin auf eine Protein A-Sepharose 4B-Säule aufgetragen, die zuvor mit einem 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8,0) äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit einem Puffer (pH 3,5) eluiert, um den gereinigten anti-e-D-Monomer/e-D-Dimer-monoclonalen Antikörper IF-101 gemäß der vorliegenden Erfindung zu erhalten.

(b) In vivo-Methode

[0043] 10 bis 12 Wochen alten BALB/C-Mäusen wurden 0,5 ml Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadekan) intraperitoneal verabreicht. Nach 14 bis 20 Tagen wurden die Bauchhöhlen der Mäuse mit in vitro vermehrten Hybridomzellen IF-101 in einer Menge von 2×10^6 Zellen/Maus inokuliert.

[0044] Von jeder Maus wurden etwa 10 bis 15 ml Bauchhöhlenflüssigkeit gewonnen. Die Konzentration an Antikörper war 5 bis 10 mg/ml. Die Aufreinigung der monoclonalen Antikörper aus der Bauchhöhlenflüssigkeit wurde unter Wiederholung des bei der in vitro-Reinigung verwendeten Verfahrens durchgeführt, außer dass der Schritt, bei dem das Produkt über eine Ziegen-anti-Rind-IgG-Sepharose-Säule geleitet wird, ausgelassen wurde.

Beispiel 4: Bestimmung der Immunglobulin-Klasse und Spezifität des monoclonalen Antikörpers

[0045] Die Immunglobulin-Klasse des anti-e-D-Monomer/e-D-Dimer-monoclonalen Antikörpers IF-101 der vorliegenden Erfindung wurde mit dem Immundiffusionsverfahren nach Ouchterlony untersucht. Die Immunglobulin-Klasse des monoclonalen Antikörpers IF-101 war IgG1κ.

Beispiel 5: Bestimmung von Stellen, die von dem monoclonale Antikörper erkannt werden

[0046] Die Erkennungsstelle des monoclonalen Antikörpers IF-101 wurde mittels eines Western-Blot-Verfahrens identifiziert. Die Vorgehensweise war im Wesentlichen gemäß der Gebrauchsanweisung der Zeta-Probe Blotting Membranes (Bio-Rad, USA), wie folgt: Fibrinogen wurde 30 Minuten, 60 Minuten oder 24 Stunden lang mit Granulocytenelastase behandelt. Die Verdauungsprodukte des Fibrinogens wurden nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten, 60 Minuten und 24 Stunden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelekrophorese in Gegenwart oder Abwesenheit von Dithiothreit (DTT) behandelt. Blot-Verfahren und Enzym-Immuntests wurden gemäß der oben genannten Methode durchgeführt. Die damit gewonnenen Ergebnisse sowie die Ergebnisse aus der Proteinfärbung der vorstehenden SDS-Polyacrylamid-Gelelekrophorese mit Coomassie Brilliant Blau G-250 wurden miteinander verglichen, um die Erkennungsstelle des monoclonalen Antikörpers IF-101 zu identifizieren. Die gleiche Vorgehensweise wurde für Fibrinogen, gereinigtes e-D-Dimer und gereinigten e-DD/E-Komplex (Verdauungsprodukte von stabilisiertem Fibrin mit Granulocytenelastase) wiederholt. Die Bindungsreaktivitäten des vorliegenden monoclonalen Antikörpers IF-101 gegenüber verschiedenen Antigenen sind in Tabelle 1 dargestellt. In Tabelle 1 bedeutet "+", dass der monoclonale Antikörper eine Bindungsreaktivität aufwies, und bedeutet, dass der monoclonale Antikörper keine Bindungsreaktivität aufwies.

Tabelle 1

Antigene	Bindungsreaktivität
Fibrinogen	–
e-X	–
e-Y	–
e-D	+
e-E1	–
e-E2	–
e-E3	–
e-D-Dimer	+
e-DD/E-Komplex	+
Aα	–
Bβ	–
Y	–
e-D-Monomer/α	+
e-D-Monomer/β	–
e-D-Monomer/γ	–

[0047] Weiterhin wurden die gleichen Vorgehensweisen für die verdauten Fragmente X, Y, D und E des Fibrinogens durch Plasmin sowie für das p-D-Dimer und den p-DD/E-Komlex (Verdauungsprodukte von stabilisiertem Fibrin mit Plasmin) wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Antigene	Bindungsreaktivität
Fibrinogen	–
p-X	–
P-Y	–
p-D	–
p-E1	–
p-E2	–
p-E3	–
p-D-Dimer	–
p-DD/E-Komplex	–
Aα	–
Bβ	–
Y	–
p-D-Monomer/α	–
p-D-Monomer/β	–
p-D-Monomer/γ	–

[0048] Wie vorstehend erwähnt, zeigen die Ergebnisse der Tabellen 1 und 2, dass der monoclonale Antikörper IF-101 der vorliegenden Erfindung die/α-Kette des e-D-Monomers erkennt.

Beispiel 6: Identifizierung von Epitopen des monoclonalen Antikörpers IF-101

[0049] Die Ergebnisse aus Beispiel 5 zeigen, dass der monoclonale Antikörper IF-101 die/α-Kette des e-D-Monomers erkennt. Somit wurde, um das Epitop des monoclonalen Antikörpers IF-101 im Einzelnen zu analysieren, die Aminosäuresequenz der/α-Kette des e-D-Monomers bestimmt. Danach wurden Peptide, die dieselbe Aminosäuresequenz aufwiesen, hergestellt, und Versuche zur Bindungshemmung zwischen dem monoclonalen Antikörper IF-101 und dem e-D-Monomer, der e-D-Monomer/α-Kette, dem e-D-Dimer sowie dem e-DD/E-Komplex wurden unter Verwendung der Peptide durchgeführt, um so die Aminosäuresequenz des Epitops zu bestimmen. Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: Die Aminosäuresequenz am N-terminalen Ende der/α-Kette des e-D-Monomers wurde mit einem Protein-Sequenziergerät (Applied Systems Japan K.K.) durchgeführt, wobei folgende Sequenz gefunden wurde:
Ser Glu Asp Leu Arg Ser Arg Ile (SEQ ID No: 2).
Ein Vergleich der vorstehend gefundenen Sequenz mit der Sequenz der Aα-Kette des menschlichen Fibinogens offenbarte, dass die/α-Kette des e-D-Monomers mit der 112ten Aminosäure der Aα-Kette beginnt. Es wurde, anders ausgedrückt, herausgefunden, dass die N-terminale Aminosäuresequenz einschließlich der N-terminalen Aminosäure der/α-Kette des e-D-Monomers
Ser_{112}-Glu_{113}-Asp_{114}-Leu_{115}-Arg_{116}-Ser_{117}-Arg_{118}-Ile_{119}-
der Aα-Kette von menschlichem Fibrinogen entspricht.

[0050] Es wurden drei Peptide mit Aminosäuresequenzen nach der 112ten Aminosäure der Aα-Kette des menschlichen Fibrinogens hergestellt. Die Versuche zur Bindungshemmung zwischen dem monoclonalen Antikörper IF-101 und dem e-D-Monomer, der e-D-Monomer/α-Kette, dem e-D-Dimer sowie dem e-DD/E-Komplex (Verdauungsprodukt von stabilisiertem Fibrin mit Granulocytenelastase) wurden unter Verwendung der Peptide durchgeführt.

[0051] Die Versuche zur Bindungshemmung wurden mit Hilfe der Western-Blot-Methode durchgeführt. Im Besonderen wurden die Produkte (die das e-D-Monomer enthielten), die durch Verdauen von Fibrinogen mit Granulocytenelastase über 24 Stunden erhalten wurden, mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelekrophorese zusammen mit dem gereinigten e-D-Dimer und dem e-DD/E-Komplex (Verdauungsprodukte von stabilisierten Fibrin mit Granulocytenelastase) in Gegenwart oder Abwesenheit von Dithiothreit (DTT) behandelt. Daraufhin wurde ein Blot-Verfahren in Übereinstimmung mit der Gebrauchsanweisung der Zeta-Probe Blotting Membranes (Bio-Rad, USA) durchgeführt. Bei dem Blot-Verfahren wurde der monoclonale Antikörper IF-101 in Gegen-

wart oder Abwesenheit der Peptide (100 µM) zur Reaktion gebracht, um so festzustellen, ob die Petide die Reaktion des monoclonalen Antikörpers IF-101 hemmen oder nicht.

[0052] Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Das Peptid A hat folgende Aminosäuresequenz:
Ser Glu Asp Leu Arg Ser (SEQ ID NO: 1),
was der Aminosäuresequenz der 112ten bis 117ten Aminosäure in der Aα-Kette des menschlichen Fibrinogens entspricht. Das Peptid B hat folgende Aminosäuresequenz:
Ser Arg Ile Glu Val Leu (SEQ ID NO: 3),
was der Aminosäuresequenz der 117ten bis 122ten Aminosäure in der Aα-Kette des menschlichen Fibrinogens entspricht. Das Peptid C hat folgende Aminosäuresequenz:
Leu Lys Arg Lys Val Ile (SEQ ID NO: 4),
was der Aminosäuresequenz der 122ten bis 127ten Aminosäure in der Aα-Kette des menschlichen Fibrinogens entspricht. In Tabelle 3 bedeutet "+", dass die Bindung des monoclonalen Antikörpers IF-101 an die mit Granulocytenelastase verdauten Produkte durch das hinzugefügte Peptid gehemmt wurde, und "–" bedeutet, dass die Bindung durch das hinzugefügte Peptid nicht gehemmt wurde.

[0053] Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, dass das Epitop des monoclonalen Antikörpers IF-101 an der Stelle vorkommt, die die N-terminale Aminosäuresequenz:
Ser-Glu-Asp-Leu-Arg-Ser,
welche die N-terminale Aminosäure der/α-Kette des e-D-Monomers enthält, aufweist.

[0054] Die Aminosäuresequenz entspricht
Ser_{112}-Glu_{113}-Asp_{114}-Leu_{115}-Arg_{116}-Ser_{117}-Arg_{118}-Ile_{119}-
der Aα-Kette des menschlichen Fibrinogens.

Tabelle 3

	e-D-Monomer	e-D-Monomer/α	e-D-Dimer	e-DD/E-Komplex
Peptid A	+	+	+	+
Peptid B	–	–	–	–
Peptid C	–	–	–	–

Beispiel 7: Herstellung von an monoclonalen Antikörper IF-101 gebundenen Latex und Bestimmung des e-D-Dimers und des e-DD/E-Komplexes (Verdauungsprodukte von stabilisiertem Fibrin mit Granulocytenelastase) unter Verwendung des Latex

[0055] Polystyrollatex [Seradyn; USA, 10% (Gew./Vol.) Suspension, Partikeldurchmesser = 0,489 µM] (0,2 ml) wurde mit 1,8 ml eines 50 mM Tris-HCl-Puffers (pH 8,0) (Antikörper-Konzentration = 0,9 mg/ml), der den in Beispiel 3 gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellten anti-e-D-Monomer/e-DD/E-Komplexmonoclonalen Antikörper IF-101 enthielt, vermischt, und das Gemisch mit einem Magnetrührer gerührt.

[0056] Das Gemisch wurde zentrifugiert (20.000 × g, 10 Minuten), viermal mit destilliertem Wasser, das 0,05% NaN_3 enthielt, gewaschen, in 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0), der BSA (1 mg/ml) enthielt, suspendiert und aufbewahrt. Der beschichtete Latex wurde mit verschiedenen Konzentrationen des e-D-Dimers, des e-DD/E-Komplexes, der Verdauungsprodukte von Fibrinogen durch Granulocytenelastase, der Verdauungsprodukte von Fibrin durch Plasmin oder der Verdauungsprodukte von stabilisiertem Fibrin durch Plasmin gemischt. Zur Bestimmung wurde ein vollautomatisiertes Immunserum-Testsystem (LPIA-200; Mitsubishi Chemical corp.) verwendet, um die Agglutinationsreaktionsraten zu messen.

[0057] Die Ergebnisse sind in Fig. 1 dargestellt. In Fig. 1 stellt die Linie a die Ergebnisse von e-D-Dimer als Antigen dar, Linie b stellt die Ergebnisse des e-DD-Komplexes dar, Linie c stellt die Ergebnisse eines Gemisches aus e-DDE-Komplex und p-DDE-Komplex in äquivalenten Mengen dar, Linie d stellt die Ergebnisse der Verdauungsprodukte des Fibrinogens mit Plasmin dar, Linie e stellt die Ergebnisse des p-DDE-Komplexes dar, und Linie f stellt die Ergebnisse der Verdauungsprodukte von Fibrinogen durch Granulocytenelastase dar. Der V-Wert bezeichnet die Agglutinationsreaktionsrate.

[0058] Die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen, dass das e-D-Dimer oder der e-DDE-Komplex mit Hilfe von mit monoclonalem Antikörper IF-101 beschichtetem Latex quantitativ gemessen werden kann.

Industrielle Anwendbarkeit

[0059] Wie vorstehend ausgeführt, steht fest, dass der monoclonale Antikörper der vorliegenden Erfindung einen immunologischen Test bereitstellen kann, der dazu in der Lage ist, die Menge an e-D-Dimer oder e-DD/E-Komplex in einer Probe, die aus dem menschlichem Körper stammt, quantitativ und spezifisch zu bestimmen, wobei eine Beeinträchtigung durch Substanzen, die vermutlich in der Probe vorhanden sind, d.h. Fibrinogen, Verdauungsprodukte von Fibrinogen durch Plasmin oder Verdauungsprodukte von stabilisiertem Fibrin durch Plasmin, insbesondere p-D-Dimer oder p-DD/E-Komplex, nicht vorkommt.

Sequenzprotokoll

SEQ ID NO: 1

Länge der Sequenz: 6

Sequenztyp: Aminosäure

Topologie: linear

Molekültyp: Peptid

Beschreibung der Sequenz:

Ser Glu Asp Leu Arg Ser
1 5

SEQ ID NO: 2

Länge der Sequenz: 8

Sequenztyp: Aminosäure

Topologie: linear

Molekültyp: Peptid

Beschreibung der Sequenz:

Ser Glu Asp Leu Arg Ser Arg Ile
1 5

SEQ ID NO: 3

Länge der Sequenz: 6

Sequenztyp: Aminosäure

Topologie: linear

Molekültyp: Peptid

Beschreibung der Sequenz:

Ser Arg Ile Glu Val Leu
1 5

SEQ ID NO: 4

Länge der Sequenz: 6

Sequenztyp: Aminosäure

Topologie: linear

Molekültyp: Peptid

Beschreibung der Sequenz:

Leu Lys Arg Lys Val Ile
1 5

(1) Allgemeine Information:

(i) Anmelder:

(A) Name: Iatron Laboratories, Inc.
(B) Strasse: 11-4, Higashi-kanda 1-chome, Chiyoda-ku
(C) Stadt: Tokyo
(D) Staat: keiner
(E) Land: Japan
(F) Postleitzahl (PLZ): 101

(ii) Titel der Erfindung: Neuartige monoklonale Antikörper und Verfahren zur immunologischen Analyse des e-D-Dimers und des e-DD/E-Komplexes

(iii) Anzahl der Sequenzen: 4

(iv) Computerlesbare Form:

(A) Medium: Diskette
(B) Computer: IBM PC kompatibel
(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) Information zu SEQ ID NO: 1:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 6 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(C) Strangform: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(iii) Hypothetisch: nein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 1:

Ser Glu Asp Leu Arg Ser
1 5

(2) Information zu SEQ ID NO: 2:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 8 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(C) Strangform: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(iii) Hypothetisch: nein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 2:

Ser Glu Asp Leu Arg Ser Arg Ile
1 5

(2) Information zu SEQ ID NO: 3:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 6 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(C) Strangform: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(iii) Hypothetisch: nein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 3:

Ser Arg Ile Glu Val Leu
1 5

(2) Information zu SEQ ID NO: 4:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 6 Aminosäuren
(B) Typ: Aminosäure
(C) Strangform: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(iii) Hypothetisch: nein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 4:

Leu Lys Arg Lys Val Ile
1 5

Patentansprüche

1. Monoclonaler Antikörper oder ein Fragment davon, der/das spezifisch mit dem D-Monomer reagiert, das durch Verdauen des menschlichen Fibrinogens mit Granulocytenelastase hergestellt wird, der D-Domäne enthaltend Verdauungsprodukte, die durch Verdauen von menschlichem stabilisierten Fibrin mit Granulocytenelastase hergestellt werden, und einem partiellen Aα-Ketten-Fragment des D-Monomeren, das durch Verdauen von menschlichem Fibrinogen mit Granulocytenelastase hergestellt wird, wobei das partielle Fragment erzeugt wird durch Entfernen eines Polypeptids mit einer Aminosäuresequenz der ersten bis 111ten Aminosäure der Aα-Kette, aber nicht reagiert mit Fibrinogen, dem Fragment X, Y oder E, die hergestellt werden durch Verdauen von Fibrinogen mit Granulocytenelastase, den Verdauprodukten des menschlichen Fibrinogens mit Plasmin oder den Verdauprodukten des stabilisierten Fibrins mit Plasmin.

2. Antikörper nach Anspruch 1, wobei ein Epitop in der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1 existiert.

3. Hybridom, welches den monoclonalen Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 erzeugt.

4. Immunologischer Test für das D-Dimer, das durch Verdauen von menschlichem stabilisierten Fibrin mit Granulocytenelastase erzeugt wird, und den DD/E-Komplex, der durch Verdauen von menschlichem stabilisierten Fibrin mit Granulocytenelastase erzeugt wird, in einer Probe, die von einem menschlichen Körper stammt, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe mit einem Träger in Kontakt gebracht wird, der mit einem monoclonalen Antikörper oder einem Fragment davon gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 beschichtet ist, und das Aggregat nachgewiesen wird, das aus dem D-Dimer oder dem DD/E-Komplex mit dem beschichteten Träger gebildet wird.

5. Diagnostische Zusammensetzung, umfassend den monoclonalen Antikörper oder das Fragment davon

gemäß Anspruch 1 oder 2.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

F I G. 1

