



F1000098705B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

98705

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 11 08 1997

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

A 61K 39/395, C 07K 16/18, 16/44, C 12N 5/20,
G 01N 33/543

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	891953
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	25.04.89
(24) Alkupäivä - Löpdag	25.04.89
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	28.10.89
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.04.97
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
27.04.88 DE 3814216 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Hoechst Aktiengesellschaft, Postfach 80 03 20, 6230 Frankfurt am Main 80, Germany, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Brocks, Dietrich, Goethering 9, 6200 Wiesbaden, Germany, (DE)
 2. Günzler-Pukall, Volkmarr, Gross-Seelheimer Strasse 13, 3550 Marburg, Germany, (DE)
 3. Hachmann, Henning, Merzinger Weg 1a, 6000 Frankfurt am Main 71, Germany, (DE)
 4. Pünter, Jürgen, Reichenberger Weg 11, 6238 Hofheim am Taunus, Germany, (DE)
 5. Timpl, Rupert, Julius-Haerlinstrasse 3, 8035 Gauting, Germany, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Monoklonaalinen vasta-aine intaktin prokollageenipeptidin (tyyppi III) ja prokollageenin (tyyppi III) selektiiviseksi immunologiseksi määrittämiseksi ruumiinnesteistä
 Monoklonal antikropp för selektiv immunologisk bestämning av intakt prokollagenpeptid (typ III) och prokollagen (typ III) i kroppsvätskor

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 87042308 ECACC
 88030202 ECACC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI C 96433 (C 12N 5/18), FI C 95579 (C 07K 16/18)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee monoklonaalista vasta-ainetta intaktin prokollageenipeptidin (tyyppi III) ja prokollageenin (tyyppi III) selektiiviseksi immunologiseksi määrittämiseksi ruumiinnesteistä. Monoklonaalisen vasta-aineen avulla, joka on suuntautunut spesifisesti aminoterminaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) epitooppia vastaan, jota ei ole fragmentissa Col 1, ja toisen monoklonaalisen tai polyklonaalisen vasta-aineen avulla aminoterminaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) epitooppia vastaan voidaan mainittu peptidi määrittää hyvin tarkasti.

Uppfinningen avser monoklonala antikroppar för selektiv immunologisk bestämning av intakt prokollagen peptid (typ III) och av prokollagen (typ III) i kroppsvätskor. Med hjälp av en monoklonal antikropp, vilken är speciellt avsedd för en epitop av den aminoterminala prokollagenpeptiden (typ III), vilken inte förekommer i fragmentet Col 1, och med hjälp av en annan monoklonal eller polyklonal antikropp avsedd för en epitop av aminoterminal prokollagenpeptid (typ III) kan nämnda peptid bestämmas mycket noggrant.

Monoklonaalinen vasta-aine intaktin prokollageenipeptidin (tyyppi III) ja prokollageenin (tyyppi III) selektiiviseksi immunologiseksi määrittämiseksi ruumiinnesteistä

5 Prokollageenipeptidi (tyyppi III) (PIIIP) on kollageenin (tyyppi III) aminotermiinalinen propeptidi, joka prokollageenimolekyylin (tyyppi III) erittymisen jälkeen hajoaa ekstrasellulaarisesti. Prokollageenipeptidi (tyyppi III) puolestaan on mahdollista hajottaa kollageenaasilla
10 edelleen osiksi Col 1, Col 2 ja Col 3, jotka voidaan eristää sinänsä tunnettujen proteiinikemiallisten menetelmien avulla (Nowack, H. et al., Eur. J. Biochem. 70, 205-216 (1976), Bruckner, P. et al., Eur. J. Biochem. 90, 595-603 (1978)).

15 Tämän prokollageenipeptidin pitoisuus voidaan määrittää ruumiinnesteistä radioimmunologisella määritysmenetelmällä, joka on kuvattu EP-patenttijulkaisussa no. 4940. Peptidin seerumikonsentraation tunteminen mahdollistaa ennusteet fibroottisten sairauksien, kuten esim. maksasairauksien, aktiivisuudesta (Rohde, H. et al., Eur. J. Clin. Invest. 9, 451-459 (1979)).
20

Prokollageenipeptidin (tyyppi III) ja prokollageenin (tyyppi III) tarkka, selektiivinen määritys seerumista ja muista ruumiinnesteistä on esitetty EP-patenttihakemuksessa 289 930. Tällöin ovat kuitenkin välttämättömiä monet sentrifugointivaiheet, jotka vaikeuttavat tämän testin käyttöä rutiinilaboratoriossa. Yksinkertaisemman suorituksen mahdollistaa Immunoradiometric Assay-testimenetelmä (IRMA). Tässä menetelmässä käytetään kahta vasta-ainetta,
25 joista toinen on sidottu kiinteään kantajaan, minkä johdosta saostusvaihe ja siten sentrifugointivaihe ja muutamia pipetointivaiheita jää pois. Yllättävästi löydettiin nyt monoklonaalinen vasta-aine, joka reagoi prokollageenifragmentin (tyyppi III) kanssa, joka tähän saakka ei
30 ole ollut geelisuodatuskromatografiassa erotettavissa oma-

na piikkinään. Yhdistelmänä muiden monoklonaalisten tai polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa, jotka ovat spesifisiä prokollageenipeptidille (tyyppi III) ja/tai prokollageenille (tyyppi III), tämä vasta-aine mahdollistaa näiden antigeenien määrittämisen IRMA-tekniikan avulla.

Keksintö koskee siten:

1. Monoklonaalista vasta-ainetta, jolla on kuviossa 2 esitetty reaktiomalli intaktia prokollageenia (tyyppi III) ja pN-kollageenia (prokollageeni, josta puuttuu C-terminaalinen propeptidi (piikki 1a)), intaktia aminotermiinaalista prokollageenipeptidiä (tyyppi III) (piikki 2a), aminotermiinaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) hajoamistuotteita, joiden molekyylipainot ovat aminotermiinaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) ja Col 1:n (piikki 3a) molekyylipainojen välillä, sekä Col 1:tä ja aminotermiinaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) hajoamistuotteita, joilla on sama molekyylipaino kuin Col 1:llä (piikki 4a), vastaan. Keksinnön mukaiselle vasta-aineelle on tunnusomaista, se mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään.

2. Hybridoma-solulinja ECACC 88030202, joka saadaan fuusioimalla myeloomalinjasta peräisin olevia soluja ja etukäteen prokollageenipeptidillä (tyyppi III) immunisoidun eläimen lymfosyyttejä ja joka tuottaa edellä kuvattua vasta-ainetta.

3. Menetelmä keksinnön mukainen vasta-aineen valmistamiseksi, jolle menetelmälle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 4 esitetään.

4. Menetelmä prokollageenipeptidin (tyyppi III) kvantitatiiviseksi immunologiseksi määrittämiseksi keksinnön mukaisella vasta-aineella. Menetelmälle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 6 esitetään.

5. Diagnostinen tarpeisto prokollageeni peptidin (tyyppi III) määrän määrittämiseksi ruumiinnesteistä, joka muodostuu vaikuttavasta määrästä keksinnön mukaista

monoklonaalista vasta-ainetta yksin tai yhdistelmänä muiden vasta-aineiden kanssa, erityisesti vaikuttavan määrän kanssa EP-patenttihakemuksessa 289 930 esitettyä monoklonaalista vasta-ainetta, seoksena diagnostisesti hyväksyttävän kantajan kanssa. Tarpeistolle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 12 esitetään.

Seuraavassa keksintöä valaistaan yksityiskohtaisesti, erityisesti edullisia suoritusmuotoja.

Monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseksi voidaan immunisoida eläimiä, edullisesti jyrsijöitä, kuten esim. hiiriä, rottia, kaneja, marsuja, prokollageenipeptidillä (tyyppi III), joka on eristetty eurooppalaisen patentin 4940 menetelmän mukaisesti, adjuvantin läsnä ollessa. Erityisen edullisesti käytetään hiiriä, erityisesti sellaisia, jotka kuuluvat SJL-kantaan. Immuunivastetta vahvistetaan toistetuilla sekundaari-injektioilla esimerkiksi 4-8 viikon välein. Immunisoinnin onnistumista kontrolloidaan määrittämällä vasta-aineiden pitoisuus radiologisella sitoutumistestillä (R. Timpl ja L. Risteli, Immunochemistry of the extracellular matrix, H. Furthmayr Ed., Vol 1, 199 (1982)). Muutamia päiviä ennen lymfosyyttien fuusiota myeloomasolulinjan kanssa eläimiä käsitellään prokollageenipeptidillä (tyyppi III) ilman adjuvanttia. Otetaan eläinten lymfosyytit ja fuusioidaan myeloomasolulinjan kanssa, joka samoin voi olla peräisin jostakin edellä mainitusta eläinlajista, edullisesti kuitenkin hiirestä, erityisesti solulinjan P3X63AG8.653 kanssa. Edullisesti lymfosyytit fuusioidaan samojen lajien myeloomasolulinjojen kanssa. Fuusio ja solukloonin jatkoviljely suoritetaan ammattimiehen tuntemalla tavalla, jolloin soluviljelynesteistä määritetään spesifisten vasta-aineiden pitoisuus immunologisella sitoutumistestillä. Tällä menetelmällä saaduista soluklooneista valitaan klooni käytettäväksi IRMA:ssa. Erityisen edullisesti käytetään solulinjaa, joka valmistetaan fuusioimalla prokollageenipeptidil-

lä (tyyppi III) immunisoiduista SJL-kannan hiiristä peräisin olevia lymfosyyttejä hiiren myeloomasolulinjan P3X63AG8.653 kanssa ja joka tuottaa monoklonaalista vastaainetta, jolla on kuviossa 2 esitetty reaktiomalli. Tämä solulinja talletettiin 2.3.1988 Budapestin sopimuksen ehdoilla kokoelmaan European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), PHLS Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, SP40JG, U.K., numerolla 88 030 202.

10 Keksinnön mukaiset monoklonaaliset vasta-aineet kuuluvat IgG-proteiinien luokkaan. Alaluokan IgG2b vasta-aineet ovat erityisen edullisia käytettäväiksi. Monoklonaalisten vasta-aineiden ominaisuuksia selvennetään solulinjasta ECACC 88030202 saadun monoklonaalisen vasta-aineen

15 PIIIP 226 avulla, kun seerumissa olevat antigeenit erotetaan geelisuodatuskromatografialla molekyylipainonsa perusteella ja kromatografiafraktiot käytetään radioimmunologiseen määrittelykseen (radioimmunoassay). Kuviossa 2 on esitetty geelisuodatuskromatografian eluutioprofiili

20 monoklonaaliselle vasta-aineelle PIIIP 226, verrattuna polyklonaalisten vasta-aineiden eluutioprofiiliin. Piikki 1/1a vastaa intaktia prokollageenia (tyyppi III) tai pN-kollageenia (tyyppi III). Piikki 2/2a vastaa intaktia aminotermiinaalista prokollageenipeptidiä (tyyppi III) ja

25 tämän hajoamistuotteita, joilla on sama koko. Piikkiin 3a sisältyy prokollageenipeptidin (tyyppi III) hajoamistuotteita, jotka antavat kromatogrammissa pienemmän piikin kuin prokollageenipeptidi (tyyppi III), kuitenkin selvästi suuremman kuin Col 1. Hajoamistuotteiden molekyylipainot

30 ovat siis kulloinkin välillä n. 45000 (prokollageenipeptidi) ja n. 10000 (Col 1). Piikki 4/4a vastaa Col 1:tä sekä aminotermiinaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) hajoamistuotteita, joilla on sama molekyylipaino kuin Col 1:llä. Kävi ilmi, että antigeenifraktio, joka analyysissä

35 polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa tarttuu mukaan ja

jolla on hajoamistuotteen Col 1 molekyyllipaino tai joka on Col 1, tarttuu keksinnön mukaiseen monoklonaaliseen vasta-aineeseen selvästi heikommin. Keksinnön mukaisella monoklonaalisella vasta-aineella on siis spesifinen vaikutus aminotermiinaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) epi-
5 tooppia vastaan, jota ei ole Col 1:ssä. Edelleen vasta-aine PIIIP 226 ei tunnista osaa antigeeneista, jotka piikissä 2 tarttuvat polyklonaalisiin vasta-aineisiin siten, että piikin 2 kohdalla on vasta-aineella PIIIP 226 tunnis-
10 tettavissa kaksi piikkiä (2a ja 3a). Piikkiä 3a ei havaita myöskään saksalaisessa patenttihakemuksessa esitetyllä vasta-aineella PIIIP 296.

Keksinnön mukaisten vasta-aineiden valmistamiseksi on tärkeää, että antigeenin saamiseksi on käytettävissä
15 sopiva lähde. Kuten jo on mainittu, eristetään ihmisen tai eläimen korkean puhtauden omaava prokollageenipeptidi (tyyppi III) edullisesti EP-patentin 4940 menetelmän mukaisesti hajottamalla kudokset tai patologiset ruumiin-
teet kollageenaasilla ja prokollageenipeptidi erotetaan reaktioseoksesta ja puhdistetaan käyttäen kromatografisten
20 menetelmien yhdistelmää ja/tai immunoadsorptiota.

Keksinnön mukaista monoklonaalista vasta-ainetta voidaan käyttää erilaisissa immunologisissa menetelmissä, mukaan lukien kaikki radioimmunologisen määrittämisen muo-
25 dot, esim. sekventiaalinen kyllästysanalyysi tai tasapainoanalyysi, sekä muissa kompetitiivisissa ja ei-kompetitiivisissa sitoutumismäärittämis-
menetelmissä, kuten fluoresenssi-, entsyymi-, kemiluminesenssi- tai muut immunologiset määrittämis-
menetelmät. Se soveltuu ennen kaikkea käytettäväk-
30 si sandwich-menetelmissä immunoabsorbenttimenetelmien yhteydessä. Monoklonaalista vasta-ainetta voidaan siten käyttää immunologisissa menetelmissä prokollageenipeptidin (tyyppi III) eristämiseksi ja karakterisoimiseksi sekä kvantitatiiviseksi määrittämiseksi kudoksista ja ruumiin-
35 nesteistä. Käytetään ammattimiehen sinänsä tuntemia mene-

telmiä, edullisesti saattamalla nestemäinen näyte, joka sisältää prokollageenipeptidiä (tyyppi III), reaktioon keksinnön mukaisen monoklonaalisen vasta-aineen kanssa, joka on sidottu kiinteään matriisiin, joka on edullisesti
5 muovimateriaalia, erityisesti muoviputki, ja prokollageenipeptidin (tyyppi III) määrä määritetään sitoutumisen avulla polyklonaaliseen tai toiseen monoklonaaliseen vasta-aineeseen, edullisesti EP-patenttihakemuksessa 289 930 esitettyyn monoklonaaliseen vasta-aineeseen, joka on va-
10 rustettu radioaktiivisella tai muulla leimalla. Tämä menetelmä voidaan suorittaa myös sitomalla polyklonaaliset tai monoklonaaliset vasta-aineet, erityisesti eurooppalaisessa patenttihakemuksessa 289 930 esitetty monoklonaalinen vasta-aine, kiinteään matriisiin ja saattamalla reaktioon
15 antigeenin kanssa, jolloin tämä antigeeni määritetään siten kvantitatiivisesti leimatun keksinnön mukaisen vasta-aineen sitoutumisen perusteella. Näissä menetelmissä ei ole merkitystä sillä, onko prokollageenipeptidi (tyyppi III) vielä liittyneenä prokollageenin (tyyppi III)
20 aminopäähän vai ei. Tähän saakka immunologisessa määrittämisessä polyklonaalisia vasta-aineita käyttäen prokollageenipeptidin (tyyppi III) häiritsevät hajoamistuotteet, erityisesti Col 1, eivät kuvatussa testisysteemissä tule mukaan.

25 EP-patenttihakemuksessa 289 930 esitetyllä monoklonaalisella vasta-aineella on kuviossa 3 esitetty reaktiomalli intaktia prokollageenia (tyyppi III) ja pN-kollageenia (prokollageeni, josta puuttuu C-terminaalinen propeptidi, piikki 4a), intaktia aminotermiinalista prokollageenipeptidiä (tyyppi III) (piikki 5a) sekä Col 1:tä ja
30 aminotermiinalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) hajoamistuotteita, joilla on sama molekyyllipaino kuin Col 1:llä (piikki 6a), vastaan.

Tämän monoklonaalisen vasta-aineen valmistamiseksi
35 menetellään pääasiassa, kuten edellä on kuvattu. Erityisen

edullisesti käytetään solulinjaa, joka valmistetaan prokollageenipeptidillä (tyyppi III) immunisoiduista SJL-kan-
nan hiiristä peräisin olevien lymfosyyttien fuusiolla hii-
ren myeloomasolulinjan P3X63AG8.653 kanssa. Tämä solulinja
5 on talletettu kokoelmaan European Collection of Animal
Cell Cultures (ECACC), PHLS Centre for Applied Microbiolo-
gy and Research, Porton Down, Salisbury, SP40JG, U.K. nu-
merolla 87042308.

Seuraavissa esimerkeissä keksintöä valaistaan lä-
10 hemmin. Prosenttiarvot perustuvat painoon ellei toisin ole
ilmoitettu.

Esimerkki 1

Prokollageenipeptidin (tyyppi III) valmistus

Prokollageenipeptidi (tyyppi III) valmistetaan an-
15 tamalla kollageenaasin vaikuttaa prokollageeniin (tyyppi
III) 37 °C:ssa. Tällöin peptidi ei joudu alttiiksi denatu-
roiville aineille. Suurempien peptidimäärien valmistami-
seksi käytetään modifioitua menetelmää. Kaikki menetelmä-
vaiheet aina kollageenaasin vaikutukseen saakka suoritetaan
20 kylmähuoneessa. Eri NaCl-liuokset, joita käytetään liukoi-
seksi tekemiseen, sisältävät 0,05 M Tris-HCl:ää, pH 7,4,
0,01 M EDTA:aa, natriumatsidia (200 mg/ml) ja proteaasi-
inhibiittoreita, fenyyliimetyylisulfonyylifluoridia (3 µg/
ml) ja p-kloorimerkuribentsoaattia (3 µg/ml).

25 Fetaalista vasikan ihoa (3 kg) homogenisoidaan 10
l:ssa NaCl:a ja uutetaan kaksi päivää. Liukoinen kollagee-
ni saostetaan uuttoliuoksesta lisäämällä kiinteää NaCl:a
siten, että loppukonsentraatio on 2,5 M. Sekoittamisen
jälkeen yli yön sakka kerätään sentrifugoimalla (1800 x g,
30 20 minuuttia), pestään kaksi kertaa 2,5 M NaCl:lla ja
liuotetaan uudelleen sekoittamalla yli yön 10 l:ssa 0,5 M
NaCl:a. Pienet määrät liukenematonta materiaalia poiste-
taan sentrifugoimalla. Siten saatu kollageenin (tyyppi
III) ja prokollageenin (tyyppi III) seos saostetaan 1,6 M
35 NaCl:lla. Sakka suspendoidaan sitten 2 l:aan 0,05 M Tris-

HCl:ää (pH 8,0) ja kuumennetaan 0,02 M CaCl_2 :n lisäyksen jälkeen 20 min 50 °C:ssa ja inkuboidaan sen jälkeen 3 tuntia 37 °C:ssa yhdessä 1500 U:n kanssa bakteeriperäistä kollageenia (CLSPA, Worthington, USA) grammaa kohti kostea

5 aa sakkaa. Kollagenaasin vaikutuksen jälkeen erotetaan muodostunut sakka sentrifugoimalla ja liuos dialysoidaan 0,005 M Tris-HCl:ää, pH 8,0, 6,8 M virtsa-ainetta vastaan ja pannaan DEAE-selluloosapylvääseen (5,0 x 30 cm), joka oli tasapainotettu samalla puskurilla.

10 Pylvääseen sitoutuneet proteiinit pestään pois NaCl-liuoksella, jonka konsentraatio lisääntyy 0-0,3 M. Kokonaiseluutiomäärä on 2 l. Pylväästä ulos virtaava liuos testataan absorptio suhteen 236 nm:ssä ja antigeeniaktiivisuutensa suhteen käyttäen vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä prokollageenin (tyyppi III) aminotermiinaliselle

15 segmentille. Normaalisti viimeinen pylväästä eluoituva piikki sisältää prokollageenipeptidin (tyyppi III). Peptidistä poistetaan suola dialysoimalla tislattua vettä vastaan ja kylmäkuivataan. Jatkopuhdistus tapahtuu pylväässä Agarose A 1,5 M:llä (2 x 120 cm) (Biorad), joka on tasapainotettu 1 M CaCl_2 :lla, 0,05 M Tris-HCl:llä, pH 7,5.

20

Esimerkki 2

Hybridoman valmistus

SJL-kannan hiiriä immunisoidaan 5 µg:lla prokollageenipeptidiä (tyyppi III), joka oli saatu esimerkin mukaisesti, komplementtisen Freundin adjuvantin läsnä ollessa intramuskulaarisesti. Neljän viikon kuluttua ja kolmen kuukauden kuluttua immuunirekatiota vahvistetaan intramuskulaarisella lisäinjektiolla 5 µg:lla prokollageenipeptidiä (tyyppi III) ei-komplementtisen Freundin adjuvantin läsnä ollessa. Kolme päivää ennen fuusiota immuunivastetta vahvistetaan injisoimalla vielä 50 µg prokollageenipeptidiä (tyyppi III).

25

30

Fuusiota varten eläimet tapetaan ja pernasolut eristetään. Polyetyleeniglykolin läsnäollessa pernasolut

35

fuusioidaan myeloomasolulinjan P3X63AG8.653 kanssa. (Syn-
tyvä solulinja on talletettu ECACC:hen numerolla
88030202.) Viljelemällä fuusioseosta hypoksantiini-aminop-
teriini-tymidiini-elatusaineessa kahden viikon ajan vali-
5 koidaan pernasolu x P3X63AG8.653-hybridit. Monoklonaalisen
solulinjan saavuttamiseksi subkloonataan saadut solu-
kloonit useampaan kertaan. Muodostuneiden solupesäkkeiden
päällä olevat nesteet testataan radioimmunologisella si-
toutumistestillä vasta-aineen tuoton suhteen. Siten saa-
10 daan bimonoklonaalinen vasta-aine PIIIP 226.

Esimerkki 3

Radioimmunologinen sitoutumistesti

300 µl:aa soluviljelynestettä tai muuta näytettä,
kuten esim. askitesta hiirten vatsaontelosta hybridomaso-
15 lujen kasvatuksen jälkeen, inkuboidaan 100 µl:n kanssa ¹²⁵I-
prokollageenipeptidin (tyyppi III) liuosta (1 ng proteiini-
nia/100 µl, valmistettu, kuten EP 4940:ssä, esimerkissä 1,
on kuvattu) yli yön. Muodostuneet antigeeni-vasta-ainekom-
pleksit saostetaan lisäämällä lampaan tai jonkin muun la-
20 jin anti-hiiren-IgG-seerumia. Sentrifugoinnin ja päällä
olevan nesteen dekantoinnin jälkeen määritetään saostuneen
radioaktiivisuuden määrä gammatuikespektrometrillä.

Esimerkki 4

Vasta-aineiden radioaktiivinen leimaus

25 0,2 ml liuosta, jossa on 0,2 mg saksalaisen patent-
tihakemuksen P 37 14 633.5, esimerkin 2, mukaisesti saatua
monoklonaalista vasta-ainetta PIIIP 296 tai muuta vasta-
ainetta 0,05 M fosfaattipuskurissa, pH 7,4, pannaan poly-
styreenikoeputkeen (12 x 55 mm) ja lisätään 100 MBq Na¹²⁵I-
30 liuosta, puskuroitu 10 µl:lla 0,5 M fosfaattipuskuria, pH
7,4. Kun on lisätty 50 l kloramiini T:n (20 µg) vesi-
pitoista liuosta, sekoitetaan 1 minuutti. Sen jälkeen jo-
dusreaktio lopetetaan lisäämällä 50 µl natriumdisulfii-
tin (20 g) vesipitoista liuosta. Reagoimaton Na¹²⁵I erote-
35 taan sen jälkeen ¹²⁵I-leimatuista vasta-aineista käyttäen

kromatografiaa anioninvaihtajalla. Kromatografiafraktiot, jotka sisältävät puhdistetun ^{125}I -leimatun vasta-aineen, laimennetaan liuoksella, jossa on 20 μg Tween 20:tä ja 41,6 g Na_2EDTA :ta litrassa 0,05 M Tris-HCl:ää, pH 8,0, sitten, että leimatun vasta-ainen pitoisuus on 200 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Esimerkki 5

Koeputkien päällystäminen vasta-aineilla

Vasta-aineiden kiinnittämiseksi polystyreenikoeputkiin (12 x 75 mm) pannaan jokaiseen putkeen 300 μl liuosta, joka sisältää 4 mg/l vasta-ainetta, esim. PIIIP 226:ta, 0,01 M natriumfosfaattipuskurissa, pH 6,4, ja inkuboidaan yli yön huoneen lämpötilassa. Sen jälkeen vasta-aineliuos imetään pois ja jokaiseen putkeen pannaan 500 μl naudan seerumin albumiinin 1-prosenttista liuosta 0,05 M Tris-sitraatissa, pH 7,5. Inkubaation jälkeen yli yön huoneen lämpötilassa liuos imetään pois. Vasta-aineella päällystetyt putket kuivataan silikageelin päällä.

Esimerkki 6

Immunoradiometrinen testi (Radioimmunometric Assay, IRMA)

0,1 ml:aa analysoitavaa näytettä tai prokollageeni-peptidin (tyyppi III) standardia inkuboidaan 2 tuntia huoneen lämpötilassa polystyreeniputkissa, jotka on päällystetty esimerkin 5 mukaisesti monoklonaalisella vasta-aineella PIIIP 226, lisäten 0,1 ml fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS). Sen jälkeen koeputket pestään kaksi kertaa kulloinkin 1 ml:lla PBS:ää. Sen jälkeen putkiin pannaan 200 μl ^{125}I -leimattua vasta-ainetta PIIIP 296 (= 40 ng vasta-ainetta) tai muuta vasta-ainetta ja inkuboidaan 2 tuntia huoneen lämpötilassa. Putken seinämään sitoutuneen vasta-aine-antigeeni- ^{125}I -vasta-aine-kompleksin radioaktiivisuus määritetään kaksinkertaisen pesun jälkeen kulloinkin 1 ml:lla PBS:ää ja sitä seuraavan dekantoinnin jälkeen gammatuikespektrometrillä.

Vertaamalla vakiokäyrään, jonka valmistamiseksi käytetään standardeja, joissa on eri määrä prokollageeni-peptidiä (tyyppi III), voidaan sitten laskea prokollageeni-peptidin (tyyppi III) pitoisuus tuntemattomassa näyte-
5 liuoksessa. Kuva 1 esittää immunoradiometrisen testin vakiokäyrää (B/T tarkoittaa sitoutuneen radioaktiivisuuden suhdetta koko käytettyyn radioaktiivisuuteen).

Esimerkki 7

10 Ihmisen seerumin PIIIP 226:n kanssa reagoivien antigeenien molekyylipainojakauman määrittäminen

1 ml seerumia erotetaan geelisuodatuskromatografiaa käyttäen allyylidekstraanilla, joka on ristisitoutunut N,N'-metyleenibisakryyliamidin kanssa (Sephacryl® S 300-pylväs (1,6 x 130 cm), tasapainotettu PBS:ssä, jossa on
15 0,04 % ei-ionista detergenttiä, esimerkiksi polyetoksiloitua sorbitaanimonolauraattia (Tween 20). 0,2 ml:aa jokaisesta yksittäisestä fraktiosta inkuboidaan leimatun antigeenin määrän suhteen rajoittuvan määrän kanssa tutkittavaa vasta-ainetta (0,1 ml:ssa puskuria) ja 0,1 ml:n kanssa
20 ¹²⁵I-leimattua prokollageeni-peptidiä (tyyppi III) (sisältää 1 ng:n proteiinia) yli yön 4 °C:ssä. Sen jälkeen inkuboidaan etukäteen testatun määrän kanssa lampaan anti hiiren IgG-seerumia 10 %:n polyetyleeniglykolia (PEG 6000) läsnä ollessa 1 tunti. Saostuneet antigeeni-vasta-aine-komplek-
25 sit sentrifugoidaan pois (1500 x g) ja dekantoinnin jälkeen radioaktiivisuus määritetään gammatuikespektrometrillä. Vertaamalla vakiokäyrään, jonka valmistamiseksi käytetään standardeja, joissa on eri määrät prokollageeni-peptidiä (tyyppi III), voidaan sitten määrittää käytetyn vas-
30 ta-aineen kanssa reagoivien antigeenien pitoisuus kromatografiafraktioissa. Kuvio 2 esittää PIIIP 226:n avulla määritetyn antigeenin eluutioprofiilia verrattuna polykloonaalisten vasta-aineiden avulla määritetyn antigeenin profiiliin.

Patenttivaatimukset

1. Monoklonaalinen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että

5 a) sillä on kuviossa 2 esitetty reaktiomalli intaktia prokollageenia (tyyppi III) ja pN-kollageenia (piikki 1a), intaktia aminoterminalista prokollagenipeptidiä (tyyppi III) (piikki 2a), aminoterminalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) hajoamistuotteita, joiden molekyyli-
10 lipainot ovat aminoterminalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) ja Col 1:n molekyyli-
painojen välillä (piikki 3a), sekä Col 1:tä ja aminoterminalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) hajoamistuotteita, joilla on sama molekyyli-
paino kuin Col 1:llä (piikki 4a), vastaan;

15 b) sillä on spesifinen vaikutus sellaista aminoterminalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) epitooppia vastaan, jota ei ole Col 1:ssä;

c) se kuuluu IgG-luokkaan; ja

d) se muodostuu hybridoomaa esim. ECACC 88030202
20 käyttäen, joka on muodostunut myeloomalinjan solujen fuusiolla etukäteen aminoterminalisella prokollageenipeptidillä (tyyppi III) immunisoidun eläimen lymfosyyttien kanssa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen monoklonaalinen
25 vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että se on hybridoomasolulinjan ECACC 88030202 monoklonaalinen vasta-aine PIIIP 226.

3. Hybridoomasolulinja, t u n n e t t u siitä, että se tuottaa patenttivaatimuksen 1 mukaista vasta-ainetta, ja on muodostunut fuusioitumalla myeloomasolulinjan
30 soluista ja etukäteen prokollageenipeptidillä (tyyppi III) immunisoidun eläimen lymfosyyteistä ja että se on ECACC 88030202.

4. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen monoklonaalisen vasta-aineen valmistamiseksi, t u n - n e t t u siitä, että

5 a) eläimiä immunisoidaan aminotermiinaalisella prokollageenipeptidillä (tyyppi III),

b) otetaan lymfosyytit ja fuusioidaan myeloomasolujen kanssa,

10 c) valitaan hybridit vasta-aineen, jolla on patenttivaatimuksessa 1 annetut ominaisuudet, esiintymisen perusteella ja kloonataan ja

d) saadaan vasta-aine mainituista klooneista esim. hybridoomasta ECACC 88030202.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheen d) suorittamiseksi
15 käytetään hybridomasolulinjaa ECACC 88030202.

6. Menetelmä prokollageenipeptidin (tyyppi III) kvantitatiiviseksi immunologiseksi määrittämiseksi vasta-aineilla, t u n n e t t u siitä, että

20 a) nestemäinen näyte, joka sisältää aminotermiinaalista prokollageenipeptidiä (tyyppi III) tai prokollageenia (tyyppi III), saatetaan reagoimaan patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen monoklonaalisen vasta-aineen kanssa, ja

25 b) aminotermiinaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) tai prokollageenin (tyyppi III) määrä määritetään muodostuneen antigeeni-vasta-aine-kompleksin perusteella.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että

30 a) patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen monoklonaalinen vasta-aine sidotaan kiinteään matriisiin,

b) nestemäinen näyte, joka sisältää aminotermiinaalista prokollageenipeptidiä (tyyppi III) tai prokollageenia (tyyppi III) saatetaan reagoimaan mainitun vasta-aineen kanssa, ja

35 c) sitoutunut antigeeni osoitetaan käyttäen leimat-
tuja monoklonaalisia tai polyklonaalisia vasta-aineita,

jotka ovat spesifisiä prokollageenipeptidille (tyyppi III) tai prokollageenille (tyyppi III).

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että

5 a) polyklonaalinen tai monoklonaalinen vasta-aine, joka on spesifinen prokollageenipeptidille (tyyppi III) ja/tai prokollageenille (tyyppi III) sidotaan kiinteään matriisiin,

10 b) nestemäinen näyte, joka sisältää aminotermiinaalista prokollageenipeptidiä (tyyppi III) tai prokollageenia (tyyppi III) saatetaan reagoimaan mainitun vasta-aineen kanssa, ja

15 c) sitoutunut antigeeni osoitetaan käyttäen leimatua patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaista monoklonaalista vasta-ainetta.

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheeseen c) käytetään monoklonaalisena vasta-aineena vasta-ainetta, jolla on kuviossa 3 esitetty reaktiomalli intaktia prokollageenia (tyyppi 20 III) ja pN-kollageenia (piikki 4a), intaktia aminotermiinaalista prokollageenipeptidiä (tyyppi III) (piikki 5a) sekä Col 1:tä ja aminotermiinaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) hajoamistuotteita, joilla on sama molekyyli-paino kuin Col 1:llä (piikki 6a), vastaan.

25 10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheeseen a) käytetään monoklonaalisena vasta-aineena vasta-ainetta, jolla on kuviossa 3 esitetty reaktiomalli intaktia prokollageenia (tyyppi 30 III) ja pN-kollageenia (piikki 4a), intaktia aminotermiinaalista prokollageenipeptidiä (tyyppi III) (piikki 5a) sekä Col 1:tä ja aminotermiinaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) hajoamistuotteita, joilla on sama molekyyli-paino kuin Col 1:llä (piikki 6a), vastaan.

11. Patenttivaatimuksen 9 tai 10 mukainen menetelmä, 35 t u n n e t t u siitä, että monoklonaalisena vasta-

aineena käytetään hybridomasolulinjan ECACC 87042308 PIIIP 296:ta.

- 5 12. Diagnostinen tarpeisto prokollageenipeptidin (tyyppi III) määrän määrittämiseksi ruumiinnesteistä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää vaikuttavan määrän patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaista monoklonaalista vasta-ainetta, seoksena diagnostisesti hyväksyttävän muovimateriaalia olevan kantajan kanssa.

Patentkrav

1. Monoklonal antikropp, k ä n n e t e c k n a d
av att

5 a) den har det i figur 2 givna reaktionsmönstret
mot intakt prokollagen (typ III) och pN-kollagen (pik 1a),
intakt aminoterminal prokollagenpeptid (typ III) (pik 2a),
nedbrytningsprodukter av aminoterminal prokollagenpeptid
(typ III) vilkas molekylvikter är mellan molekylvikterna
10 hos aminoterminal prokollagenpeptid (typ III) och Col 1
(pik 3a) samt Col 1 och nedbrytningsprodukter av aminoter-
minal prokollagenpeptid (typ III), vilka har samma mole-
kylvikt som Col 1 (pik 4a);

b) den har speciell verkan på en epitop i aminoter-
15 minal prokollagenpeptid (typ III) vilken epitop inte finns
i Col 1;

c) den hör till IgG-klassen; och

d) den bildas under användning av ett hybridom
t.ex. ECACC 88030202, som bildats genom fusion av celler
20 av en myelomlinje med lymfocyter från ett djur som på för-
hand immuniserats med aminoterminal prokollagenpeptid (typ
III).

2. Monoklonal antikropp enligt patentkrav 2,
k ä n n e t e c k n a d av att att den är den monoklonala
25 antikroppen PIIP 226 från hybridomcellinjen ECACC
88030202.

3. Hybridomcellinje, k ä n n e t e c k n a d av
att den producerar en antikropp enligt patentkrav 1 och
har bildats genom fusion av celler av en myelomcellinje
30 med lymfocyter från ett djur som på förhand immuniserats
med prokollagenpeptid (typ III) och att den är ECACC
88030202.

4. Förfarande för framställning av en monoklonal antikropp enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e - t e c k n a t av att man

5 a) immunicerar ett djur med aminoterminal prokollagenpeptid (typ III),

b) tar tillvara lymfocyterna och fusionerar dem med myelomceller,

10 c) väljer ut hybriderna på basen av förekomsten av en antikropp med de i patentkrav 1 angivna egenskaperna och klonar, och

d) erhåller antikroppen ur nämnda kloner, t.ex. ur hybridomet ECACC 88030202.

15 5. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e - t e c k n a t av att man för att utföra steg d) använder hybridomcellinjen ECACC 88030202.

6. Förfarande för kvantitativ immunologisk bestämning av prokollagenpeptid (typ III) medelst antikroppar, k ä n n e t e c k n a t av att man

20 a) bringar ett vätskeformigt prov, som innehåller aminoterminal prokollagenpeptid (typ III) eller prokollagen (typ III), att reagera med en monoklonal antikropp enligt patentkrav 1 eller 2, och

25 b) bestämmer mängden aminoterminal prokollagenpeptid (typ III) eller prokollagen (typ III) på basen av bildat antigen-antikropp-komplex.

7. Förfarande enligt patentkrav 6, k ä n n e - t e c k n a t av att man

a) binder en monoklonal antikropp enligt patentkrav 1 eller 2 till en fast matris,

30 b) bringar ett vätskeformigt prov, som innehåller aminoterminal prokollagenpeptid (typ III) eller prokollagen (typ III), att reagera med nämnda monoklonala antikropp, och

35 c) påvisar bundet antigen genom att använda märkta monoklonala eller polyklonala antikroppar, vilka är specifika för prokollagenpeptid (typ III) eller prokollagen (typ III).

8. Förfarande enligt patentkrav 6, k ä n n e -
t e c k n a t av att man

a) binder en polyklonal eller monoklonal antikropp,
som är specifik för prokollagenpeptid (typ III) och/eller
5 prokollagen (typ III) vid en fast matris,

b) bringar ett vätskeformigt prov, som innehåller
aminoterminal prokollagenpeptid (typ III) eller prokolla-
gen (typ III), att reagera med nämnda antikropp, och

c) påvisar den bundna antigenen genom att använda
10 en märkt antikropp enligt patentkrav 1 eller 2.

9. Förfarande enligt patentkrav 7, k ä n n e -
t e c k n a t av att man som monoklonal antikropp i steg

c) använder en antikropp som har det i figur 3 givna reak-
tionsmönstret mot intakt prokollagen (typ III) och pN-kol-
lagen (pik 4a), intakt aminoterminal prokollagenpeptid
15 (typ III) (pik 5a) samt Col 1 och nedbrytningsprodukter av
aminoterminal prokollagenpeptid (typ III), vilka har samma
molekylvikt som Col 1 (pik 6a).

10. Förfarande enligt patentkrav 8, k ä n n e -

20 t e c k n a t av att man som monoklonal antikropp i steg
a) använder en antikropp som har det i figur 3 givna reak-
tionsmönstret mot intakt prokollagen (typ II) och pN-kol-
lagen (pik 4a), intakt aminoterminal prokollagenpeptid
(typ III) (pik 5a) samt Col 1 och nedbrytningsprodukter av
25 aminoterminal prokollagenpeptid (typ III), vilka har samma
molekylvikt som Col 1 (pik 6a).

11. Förfarande enligt patentkrav 9 eller 10,

k ä n n e t e c k n a t av att man som monoklonal anti-
kropp använder PIIIP 296 från hybridomcellinjen ECACC
30 87042308.

12. Diagnostiskt kit för att bestämma mängden pro-
kollagenpeptid (typ III) i kroppsvätskor, k ä n n e -
t e c k n a t av att det omfattar en verksam mängd av en
monoklonal antikropp enligt patentkrav 1 eller 2 blandat
35 med en diagnostiskt godtagbar bärare av ett plastmaterial.

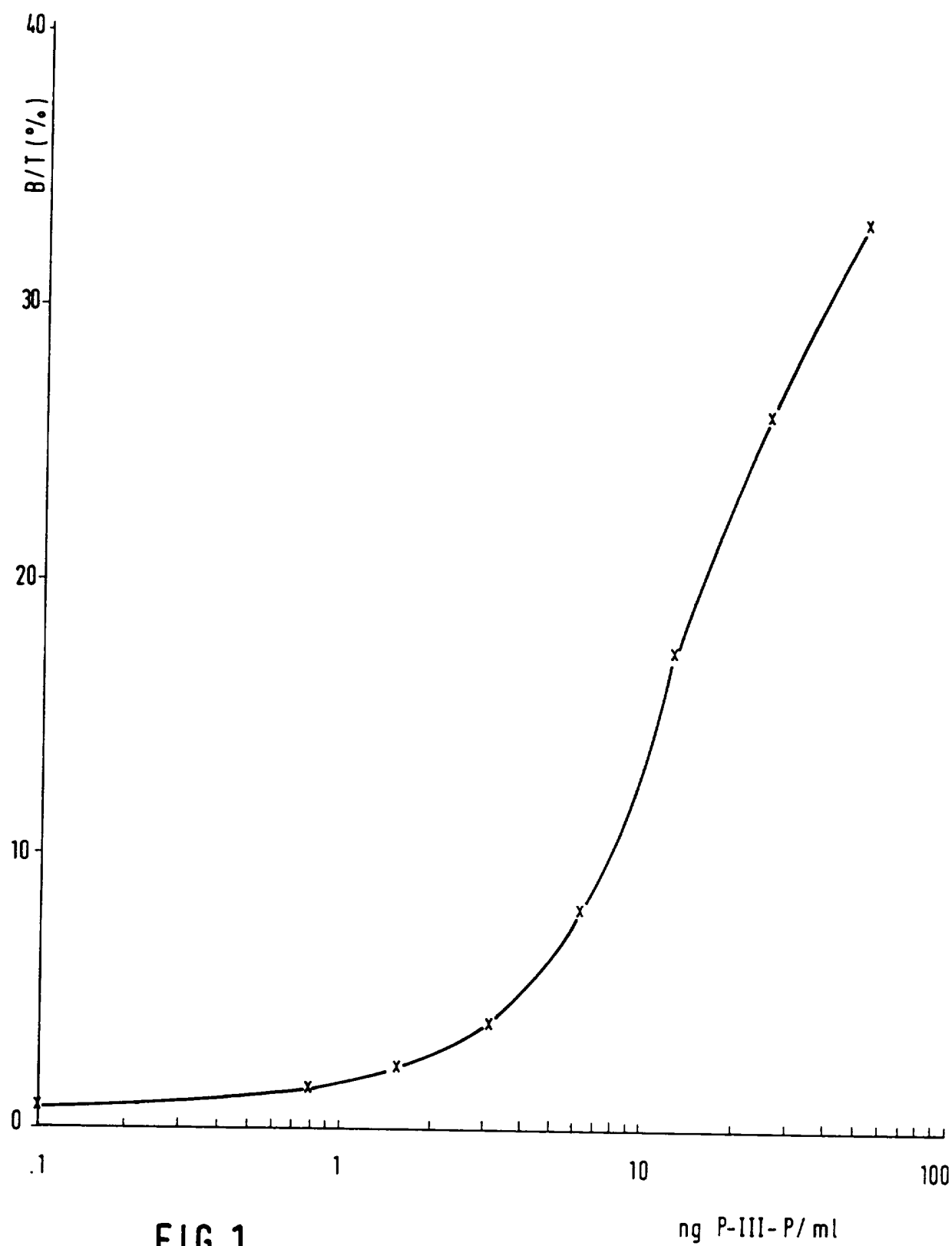
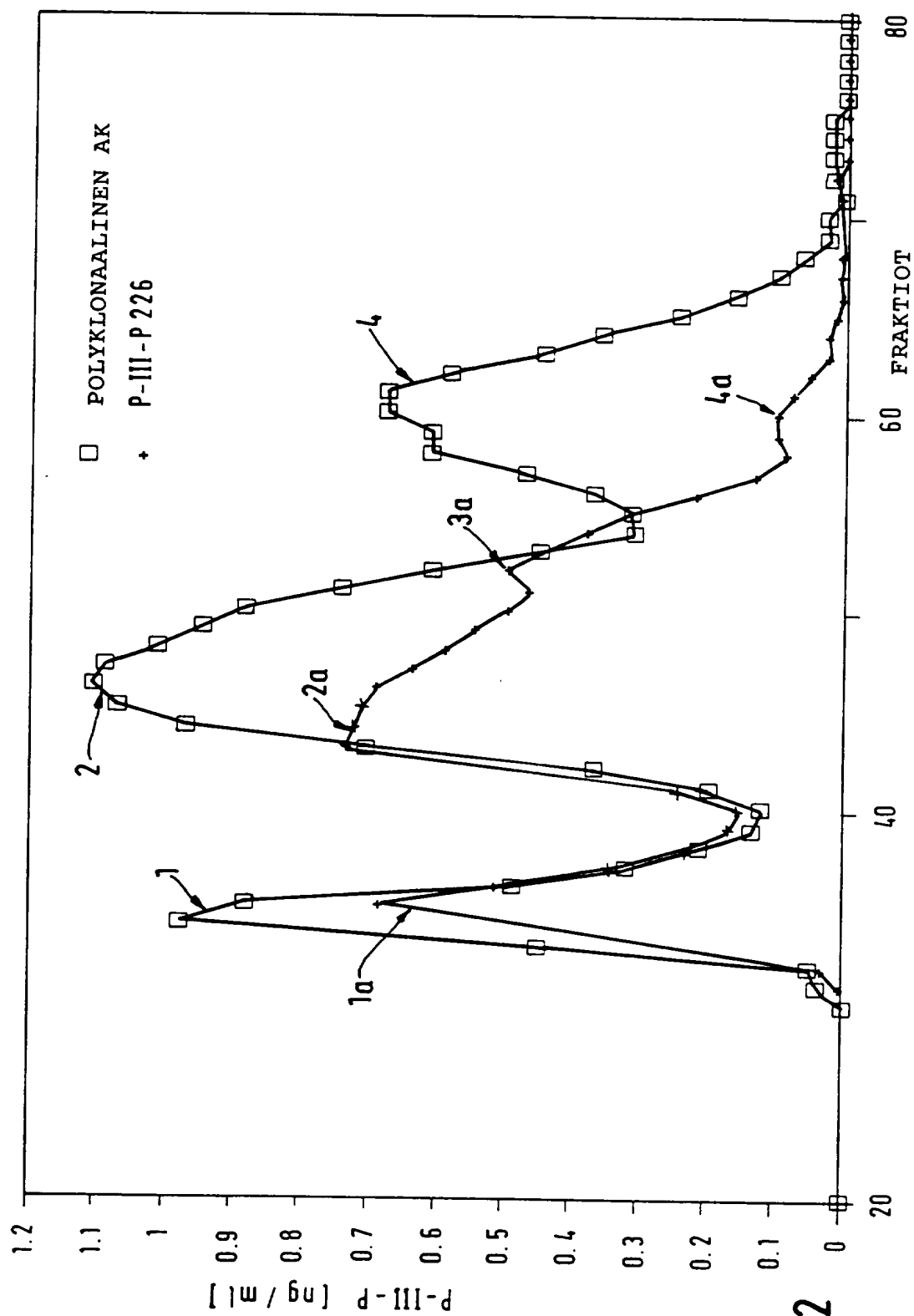


FIG.1



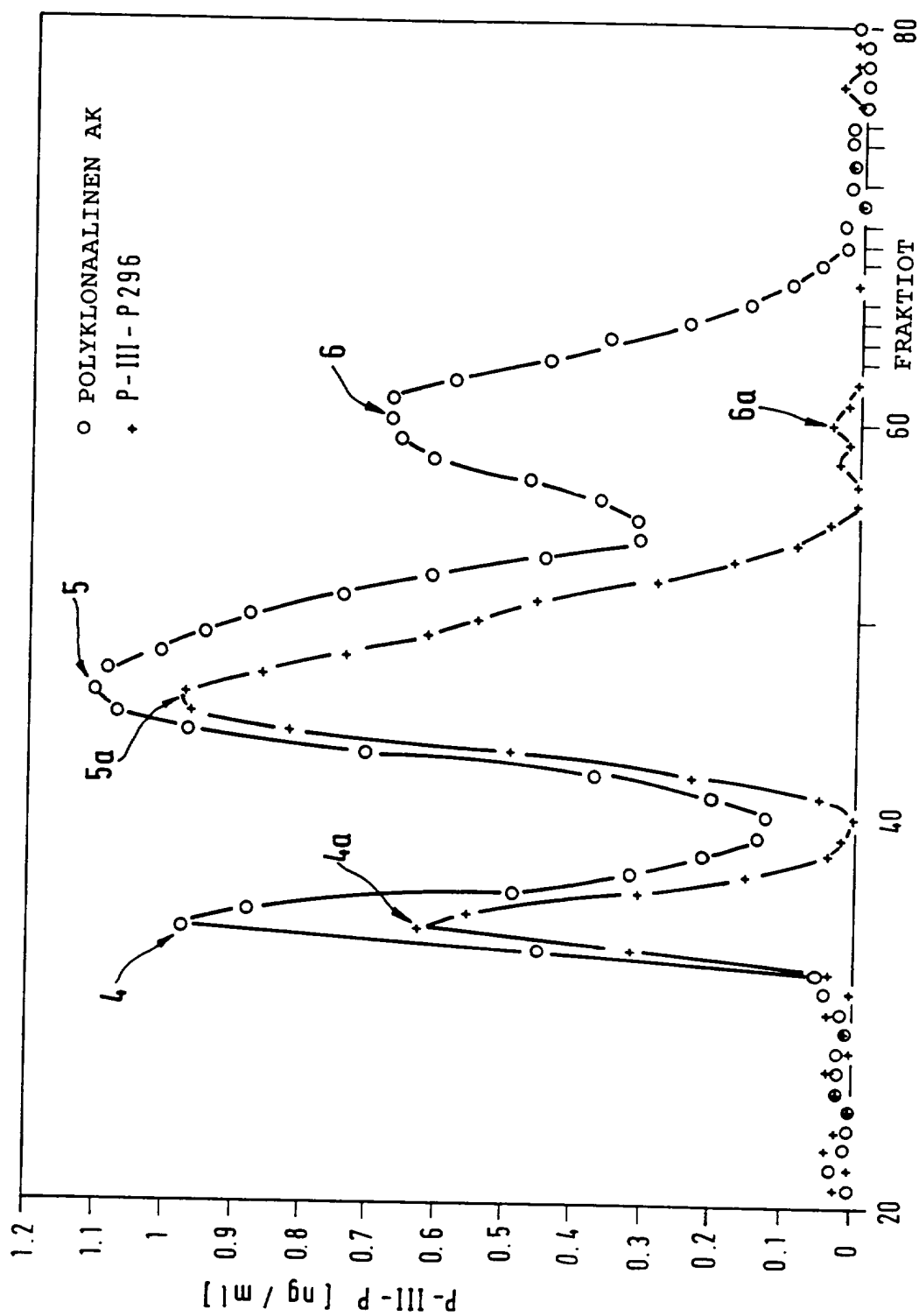


FIG. 3