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

(10) **DE 692 33 366 T2** 2005.05.19

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 511 116 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 33 366.5**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **92 401 185.1**
(96) Europäischer Anmeldetag: **24.04.1992**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.10.1992**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **16.06.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.05.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 14/47**
C07K 16/00, G01N 33/564

(30) Unionspriorität:

9104983	**26.04.1991**	**FR**
9111727	**24.09.1991**	**FR**

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

(73) Patentinhaber:
Biomerieux S.A., Marcy L'Etoile, FR

(74) Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert, 80539 München

(72) Erfinder:
Serre, Guy, F-31100 Toulouse, FR; Somme, Gerard, F-91440 Bures Sur Yvette, FR; Vincent, Christian, F-31660 Lauzerville, FR

(54) Bezeichnung: **Antigene, die von Polyarthritis Rheumatoide Antikörpern erkannt werden, ihre Herstellung und ihre Anwendungen**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von menschlichem Filaggrin und mit diesem verwandten Antigenen, zur Diagnose oder zur Behandlung von rheumatoider Polyarthritis (RP).

[0002] Die RP ist die häufigste der chronischen entzündlichen Rheumatismen. Sie betrifft ungefähr 2% der Bevölkerung der entwickelten Länder.

[0003] Die RP ist evolutiv, invalidisierend und stellt schwierige diagnostische Probleme in ihren Auftrittsformen, genau wie sie spezifische Behandlungen erfordert. Außerhalb von klinischen und radiologischen Zeichen verfügt der Rheumatologe zur Zeit nicht über andere als wenig spezifische biologische Tests für ihre Diagnostik. Die am meisten verwendeten unter diesen sind der Test von Waaler-Rose und der Latex-Test, welche den Rheumafaktor in sieben RP von zehn erfassen. Dennoch ist die Spezifität in diesen Tests sehr schlecht, da die Faktoren ja im Großteil von anderen Autoimunpathologien erfaßt werden und ebenso bei gesunden Individuen.

[0004] Die Gegenwart von gegen Zellbestandteilen gesteuerten Autoantikörpern ist das allgemeine Merkmal von Autoimunerkrankungen, wie der RP, Lupus erythematodis disseminatus, Sklerodermie oder Polymyositis. Unter den vielen Arten von in diesen Erkrankungen identifizierten Autoantikörpern, sind diejenigen, die spezifisch bei an RP erkrankten vorliegen und mit einem Ösophagusepithel-Antigen reagieren zum ersten Mal von B. J. J. Young et al. in Br. Med. J. 2: 97–99, (1979) beschrieben worden. Diese Autoantikörper sind zu ihrer Zeit als „Antikeratin-Antikörper" bezeichnet worden. Bis heute ist allgemein anerkannt, daß sie gegen die Cytokeratine gerichtet sind.

[0005] Diese spezifischen Autoantikörper der RP sind derzeit richtig gehend erfaßt und mittels indirekter Immunofluoreszenz (IIF) auf transversalen Kryoschnitten vom Ösophagus der Ratte titriert worden.

[0006] Die IIF-Techniken zeigen indessen Nachteile, die ihren Einsatz als Routinediagnostik der RP einschränken. Insbesondere erfordern sie den Einsatz von Kryoschnitten von Gewebe, was einen Zeitverlust impliziert und die Intervention von spezialisiertem Personal; insbesondere die Analyse und zuverlässige Interpretation der Ergebnisse darf von niemand anderem durchgeführt werden, als von Personen, die mit der Histologie vertraut sind.

[0007] Es ist daher besonders wünschenswert gereinigte Zubereitungen von Antigenen anzugeben, die von den für die RP spezifischen Autoantikörper wiedererkannt werden und in den klassischen Techniken der diagnostischen Immunochemie einsetzbar sind.

[0008] G. Serre et al. hat in Rev. Rhum. 53 (11): 607–614 (1986) gezeigt, daß ein Antigen durch seine Autoantikörper für bestimmte Säugetierepitheliummalpighikörner charakteristisch ist. Hauptsächlich im Stratum Corneum dieser Epithel vorliegend, wird es z. B. in der menschlichen Epidermis expremiert.

[0009] Allerdings ist es bis heute weder gelungen ein solches Antigen genau zu identifizieren noch es zu reinigen.

[0010] Die von den Erfindern durchgeführten Arbeiten auf dem Gebiet der Epidermis- und Malpighi-Differentiation, insbesondere die Herstellung von monoklonalen Antikörpern für die Definition von neuen Antigenen aus der Differenziation und das Studium der menschlichen Autoantikörper gegen dieselben Antigene, hat ihnen erlaubt zu zeigen, daß die anti-Stratum-Corneum-Antikörper vom Ösophagus der Ratte authentische Antikörper sind, die die Cytokeratine nicht erkennen, aber andere Antigene, die insbesondere im Ösophagusephitel von Nagetieren und der menschlichen Epidermis exprimiert werden.

[0011] Herausfordernde Arbeiten erlauben den Erfindern jetzt Antigene, die die spezifisch von den an RP erkrankten Patienten vorliegenden Autoantikörpern erkannten antigenen Determinanten aufweisen, aus dem Ösophagusepithel der Ratte und der menschlichen Epidermis zu extrahieren, zu reinigen und diese Antigene biochemisch zu charakterisieren.

[0012] Diese Antigene zeigen die nachfolgenden Eigenschaften:

- sie können aus der menschlichen Epidermis oder dem Ösophagusepithel der Ratte extrahiert werden.
- sie sind von proteinartiger Natur,
- eine Behandlung mit einer Nuklease verändert ihre Immunoreaktivität nicht,
- eine Behandlung mit Ethanol modifiziert ihre Immunoreaktivität nicht,
- eine Behandlung mit Trichloressigsäure (TCE) modifiziert ihre Immunoreaktivität nicht,
- sie sind wasserlöslich,
- sie werden spezifisch durch die Autoantikörper, die in an RP erkrankten Patienten vorliegen, erkannt.

[0013] Ein erstes Antigen, das spezifisch von dem in den an RP erkrankten vorliegenden Autoantikörpern erkannt wird, ist aus der menschlichen Epidermis extrahiert worden.

[0014] Dieses Antigen wird insbesondere durch die nachfolgenden Merkmale gekennzeichnet:

- Nach einer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter nativen Bedingungen trennen sich

mehrere Antigenproteine, die wie Standards (welches Globularproteine sind) wandern, deren Molkulargewichte ungefähr zwischen 40 und 400 kD liegen, wobei sich die am immunoreaktivsten Proteine in den Zonen zwischen ungefähr 80 und 120 kD befinden;
– nach einer Isoelektrofokalisation (IEF) dissoziieren diese in mehrere Antigenproteine, deren isoelektrischen Punkte (pHi) von 5,8 bis 7,4 variieren.
– nach einer zweidimensionalen Elektrophorese nach der Art einer IEF, gefolgt von einer Wanderung in einer PAGE in der Gegenwart von Dodecylsulfatnatrium (SDS), erscheint ein Antigenprotein mit einem mittleren Molekulargewicht von etwa 40 kD, dessen pHi von 5,8 bis 7,4 variiert.

[0015] Die Erfinder haben gleicherweise festgestellt, daß dieses Antigen immonulogische und biochemische Eigenschaften zeigt, die es mit dem menschlichen Filaggrin gemeinsam hat, und einem Proteolysefragment von Profilaggrin (letzteres ist eine Vorstufe Filaggrin) entspricht.

[0016] In der Folge dieser Feststellung haben die Erfinder die Immunreaktiviät von menschlichem Filaggrin und Profilaggrin mit den für die RP spezifischen Autoantikörpern getestet und haben eine ähnliche Reaktivität wie die der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Antigene hervorgehoben.

[0017] Das Filaggrin sind eine Familie von Proteinen, die bei verschiedenen Spezies auf dem Niveau des Keratinephitils identifiziert worden sind. Dieses sind sehr basische Proteine, die reich an Histidin sind. Sie leiten sich von der Dephosphorylierung und der Proteolyse einer Vorstufe ab, dem Profilaggrin, und diese durchläuft nachfolgend eine Reifung, in deren Verlauf die basischen Agininreste in neutrale Citrulinreste umgewandelt werden. Dieses Phänomen der Reifung ist zum Teil für einen Mangel an Homogenität von Filaggrinzubereitungen verantwortlich, die sich für das selbe Molekulargewicht in der Form von mehren isoelektrischen Varianten zeigen.

[0018] Die Vorstufe vom Filaggrin, das Profilaggrin, ist im wesentlichen aus wiederholten Domänen von Filaggrin gebildet; dies resultiert in einer begrenzten immonologischen Verwandtschaft dieser beiden Molküle (für eine Übersicht über die Filaggrine siehe DALE et al. Cellular and Molecular Biology of Intermediates Filaments, Seiten 393–412, GOLDMAN et STEIWERT Herausgeber Plenum Press (1990)).

[0019] Das Profilaggrin und das Filaggrin sind Extrakte aus der Epidermis, die durch Wirkung von Puffern mit erhöhter Ionenstärke und in Gegenwart von Harnstoff gewonnen werden. Allerdings ist das Filaggrin, einmal gereinigt, teilweise in Pufffern mit geringer Ionenstärke, bei neutralem PH löslich.

[0020] Ihre Ähnlichkeit zwischen dem menschlichen Filaggrin und einem durch die Autoantikörper von Stratum-Corneum der Klasse G, „Antikeratine" genannt und spezifisch für die RP, erkannten Antigen ist bis jetzt nicht vorgeschlagen worden. Die einzige Beziehung, die durch einige Autoren etabliert wurde, ist die Beobachtung einer Colokalisation zwischen dem Filaggrin oder dem Profilaggrin und dem perinuklearen Faktor (welches ein immunochemischer Marker der rheumatoiden Polyarthritis ist). Diese Autoren sind allerdings zu dem Schluß gekommen, daß der perinukleare Faktor von Filaggrin verschieden ist (HOET et al. Clin. Exp. Innunol. 84, 59–65 (1991)).

[0021] Die Erfinder haben auch ein zweites Antigen, das spezifisch von den Autoantikörpern erkannt wird, die bei an RP erkrankten Patienten vorliegen, aus dem Ösophagusepithel der Ratte extrahiert. Dieses Antigen weist die folgenden Eigenschaften auf:
– nach einer PAGE-SDS Elektrophorese trennt es sich in die nachfolgenden beiden Antigenproteine:
– ein erstes Protein mit einem mittleren Molekulargewicht von ungefähr 210 kD,
– ein zweites Protein mit einem mittleren Molekulargewicht von ungefähr 90 bis 130 kD,
– nach einer PAGE Elektrophorese unter nativen Bedingungen trennt es sich in die drei nachfolgenden Antigenproteine:
– ein erstes Protein, das mit der Geschwindigkeit von Pferdeferritin wandert (Molekulargewicht: 440 kD)
– ein zweites Protein, das mit der Geschwindigkeit von Rinderleberkatalase wandert (Molekulargewicht: 232 kD),
– ein drittes Protein, das mit einer Geschwindigkeit zwischen der von Rinderherzlacticodeshydrogenase und der boginem Serumalbumin wandert (jeweiliges Molekulargewicht: 140 kD und 67 kD).
– es sich nach einer zweidimensionalen Elektrophorese von der An einer IEF, gefolgt von einer Wanderung in PAGE-SDS, in drei Antigenproteine dissoziiert:
– ein erstes Protein mit einem mittleren Molekulargewicht von ungefähr 210 kD, dessen pHi von etwa 5,85 bis 6,85 variiert,
– ein zweites Protein mit einem mittleren Molekulargewicht von etwa 90 bis 130 kD, dessen pHi von etwa 5,85 bis 7,35 variiert,
– ein drittes Protein dessen mittleres Molekulargewicht von ungefähr 120 bis 67 kD variiert, während sein pHi von ungefähr 5 bis 7,5 variiert.
– nach einer sequentiellen Gelfiltrationschromatographie und hydrophober Interaktion und anschließender Analyse mit PAGE-SDS, trennt sich das Antigen in zwei Antigenproteinfraktionen mit relativ verschiedener Hydrophobizität:
– die hydrophobere Fraktion enthält das Protein mit einem mittleren Molekulargewicht von ungefähr 210 kD und das Protein mit einem mittleren Molekulargewicht von ungefähr 90 bis 130 kD,

– die weniger hydrophobe Fraktion enthält das Protein mit einem mittleren Molekulargewicht von ungefähr 120 bis 67 kD.

[0022] Die Erfinder haben darüber hinaus die nachfolgenden Feststellungen getroffen:

– Das Antigen aus dem Ösophagus der Ratte zeigt immunologische Kreuzreaktionen mit menschlichem Filaggrin (und, selbstverständlich, mit Profilaggrin) und mit aus der Epidermis der Ratte extrahiertem Filaggrin, wobei sich aber zeigt, daß diese Kreuzreaktionen nicht dieselben Epitope voraussetzen. Tatsächlich wird das aus der Epidermis der Ratte extrahierte Filaggrin nicht von den für die RP spezifischen Autoantikörpern erkannt; dies bedeutet, daß dies nicht die durch die Autoantikörper erkannten Epitope sind, die in die Kreuzreaktionen zwischen dem Antigen von dem Ösophagusepithel der Ratte und dem Epidermisfilaggrin der Ratte eintreten. Im Fall der Kreuzreaktionen zwischen dem Ösophagusepithelantigen der Ratte und dem menschlichen Filaggrin bedeutet das hingegen, das wenigstens ein Teil der Epitope von den für die RP spezifischen Autoantikörper erkannt werden. Es ist ebenso anzumerken, daß die von den Kreuzreaktionen betroffenen und von den für die RP spezifischen Autoantikörper erkannten Epitope keinen Teil der Epitope von menschlichem Filaggrin darstellen. Zum Beispiel der monoklonale Antikörper AKH1 (DALE et al. J. Invest. Dermatol 88, 306–313 (1987)), der ein Epitop des menschlichen Filaggrins erkennt, erkennt nicht das Antigen vom Ösophagusepithel der Ratte; andererseits, wenn der Antikörper AKH1 bei einer indirekten Immunofluoreszenz auf Kryoschnitten von menschlicher Epidermis verwendet wird, ist die beobachtete Markierung von der verschieden, die erhalten wird, wenn die anti-Stratum Corneum Autoantikörper verwendet werden, die spezifisch für die RP sind.

– Das menschliche Epidermisantigen, zeigt, was es betrifft, Kreuzreaktionen mit menschlichem Filaggrin und Profilaggrin oder greift in die Epitope ein, die von den Autoantikörpern, die spezifisch für die RP sind, erkannt werden, und ebenso in andere Epitope, wie sie von dem monoklonalen Antikörper AKH1 erkannt werden.

[0023] Sämtliche vorangehend beschriebenen Eiweißfraktionen, die grundlegend für die Antigene aus der menschlichen Epidermis und dem Ösophagus der Ratte sind, sind gereinigt worden und mit den Antikörpern getestet, die bei Patienten vorliegen, welche an RP erkrankt sind. Es zeigt sich, daß diese Proteinfraktionen isoliert die immunologischen Eigenschaften zeigen, die denen der Antigene äquivalent sind, aus denen sie stammen.

[0024] Die Erfindung umfaßt ebenso Antigenfraktionen aus der menschlichen Epidermis und dem Ösophagus der Ratte, die Epitope aufweisen, die spezifisch von den für die RP spezifischen Autoantikörper erkannt werden.

[0025] Im Sinne der vorliegenden Erfindung werden als Fraktion sämtliche Antigenzubereitungen angesehen, die durch für die RP spezifischen anti-Stratum Corneum Autoantikörper erkannt werden, und ausgehend von einem der vorstehend genannten Antigene mittels einer geeigneten Fraktionierungstechnik (Elektrophorese, Chromatographie, Elektrofokalisation, etc ...) erhalten werden. Dies umfaßt die ausgehend von Zubereitungen von menschlichem Filaggrin und Profilaggrin erhaltene Fraktionen sowie die genauer vorstehend beschriebenen Fraktionen, die ausgehend von wasserlöslichen Antigenen aus der menschlichen Epidermis und aus Ösophagusepithelzellen der Ratte erhalten wurden.

[0026] Die Erfindung betrifft folglich ebenso die drei nach einer zweidimensionalen Elektrophorese vom IEF-Typ, gefolgt von einer Wanderung in PAGE-SDS, hervorgerufenen Proteine aus dem Ösophagusepithel der Ratte.

[0027] Diese drei Proteine sind ebenso in den Proteinfraktionen herausgestellt, die nach einer sequentiellen Gelfiltrationschromatographie und hydrophoben Wechselwirkung und nachfolgender Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen von dem aus dem Ösophagusepithel der Ratte extrahiertem Antigen erhalten wurden.

[0028] Das erste dieser drei Proteine zeigt ein mittleres Molekulargewicht von ungefähr 210 kD und ungefähr von 5,85 bis 6,85 variierende pHi; das zweite zeigt ein mittleres Molekulargewicht zwischen 90 und 130 kD und ungefähr von 5,85 bis 7,35 variierende pHi; das dritte zeigt ein mittleres Molekulargewicht zwischen 67 und 120 kD und ungefähr von 5 bis 7,5 variierende pHi.

[0029] Die Erfindung betrifft auch das nach einer zweidimensionalen Elektrophorese vom IEF-Typ, gefolgt von einer Wanderung in PAGE-SDS, hervorgehobene Protein, von dem aus der menschlichen Epidermis extrahierten Antigen. Dieses Protein hat ein Molekulargewicht von ungefähr 40 kD und von ungefähr 5,8 bis 7,5 variierende pHi.

[0030] Die Arbeiten der Erfindung resultieren in dem Erhalt einer Reihe von neuen löslichen Antigenen, die spezifisch von Antikörpern der Klasse G erkannt werden, welche spezifisch für die RP sind, und im Hervorheben einer spezifischen Reaktion dieser Antikörper mit menschlichem Filaggrin.

[0031] Diese Arbeiten finden eine direkte Anwendung in der Diagnostik der RP. Folglich betrifft die Er-

findung ebenso:

– Antigenzusammensetzungen zur Diagnose der Gegenwart von Autoantikörpern in einer biologischen Probe eines an RP erkrankten Patienten, wobei die Zusammensetzungen dadurch gekennzeichnet sind, daß sie wenigstens ein Antigen enthalten, das aus der Gruppe gewählt ist, die gebildet wird von: einem aus Ösophagusepithelzellen der Ratte extrahiertem Antigen; einem aus der menschlichen Epidermis extrahiertem Antigen; ihren Fraktionen oder ihren Peptidfragmenten, wie sie vorstehend definiert sind;

– der Verwendung von Filaggrin, von Profilaggrin, ihren Fraktionen oder ihren Peptidfragmenten zur in vitro Diagnose von RP, insbesondere zur Herstellung von Antigenzusammensetzungen für die Diagnose der Gegenwart von Autoantikörpern in einer biologischen Probe eines an RP erkrankten Patienten.

[0032] Diese Zusammensetzungen erlauben die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes zwischen den erfindungsgemäßen Antigenen (Proteine, Proteinfraktionen und Peptidfragmente) und den in einer biologischen Probe, wie dem Serum einer an RP erkrankten Testperson, vorliegenden Autoantikörpern.

[0033] Die vorliegende Erfindung hat ein Verfahren zur Bestimmung von Autoantikörpern der Klasse G, die für RP in einer biologischen Flüssigkeit spezifisch sind, zum Gegenstand, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß es wenigstens eine Stufe umfaßt, in deren Verlauf die genannte biologische Flüssigkeit mit wenigstens einem Antigen in Kontakt gebracht wird, wobei das Antigen, die aus der Gruppe gewählt ist, gebildet wird von:

– menschlichem Filaggrin, menschlichem Profilaggrin;

– einem aus Ösophagusepithelzellen der Ratte extrahierten Antigen, wie vorstehend definiert;

– einem aus der menschlichen Epidermis extrahierten Antigen, wie vorstehend definiert;

– den Fraktionen oder den Peptidfragmenten, die aus den vorstehend genannten Antigenen stammen;

– wobei das Kontaktieren unter Bedingungen erfolgt, die die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes mit den gegebenenfalls vorliegenden, für die RP spezifischen Autoantikörper erlauben.

[0034] Das Antigen ist gegebenenfalls markiert oder mit einem Trägermolekül verbunden.

[0035] Am Ende dieses Schritts schreitet man zur Bestimmung des gebildeten immunologischen Komplexes in der biologischen Flüssigkeit mittels physikalischer oder chemischer Methoden fort, die an sich bekannt sind.

[0036] Das vorstehende diagnostische Verfahren kann dank einem Set oder Kit ausgeführt werden, wobei diese umfassen:

– wenigstens ein erfindungsgemäßes Antigen (Proteine, Fraktionen und Fragmente), gegebenenfalls markiert, oder ein Konjugat von diesem Antigen oder Protein mit einem Trägermolekül;

– Reagenzien zur Ausbildung eines für die immunologische Reaktion mit den möglicherweise in der biologischen Probe vorhandenen Autoantikörpern günstigen Milieu;

– ein oder mehrere Reagenzien zum Nachweis des gebildeten immunologischen Komplexes;

– gegebenenfalls Vergleichsproben, wie eine oder mehrere serumnegative und eine oder mehrere serumpositive Vergleichsproben.

[0037] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Test mittels Immun-Blot zum Nachweis von anti-Stratum Corneum Antikörpern der Klasse G, die spezifisch für die RP sind, bereitgestellt.

[0038] Ein Immun-Blotprotokoll, das ausgehend von einem murinen Ösophagusepithel-Antigenextrakt verwirklicht wurde, ist zum Erhalt einer besseren Auflösung der immunoreaktiven Banden und einer besseren Empfindlichkeit optimiert worden, dann sind drei verschiedene Konfigurationen, sei es mittels des Verfahrens zum Trennen der Antigenproteine (Elektrophorese unter nativen oder denaturierenden Bedingungen), sei es durch Verdünnung des analysierten Serums, auf dem der Diagnoseplan mit einer großen Serie von Sera, die für die rheumatologische Pathologie representativ sind, bewertet worden.

[0039] Unter den drei Bedingungen zeigt es sich, daß die diagnostische Empfindlichkeit des Tests um 50% für eine bei 95% liegende Spezifität oszilliert, wenn nur die Gegenwart oder Abwesenheit der Immunoreaktivität in Betracht gezogen wurde.

[0040] Im Gegenteil, das Antigenprotein wandert nach einer Trennung des Antigens unter nativen Bedingungen zwischen zwei Molmassenstandards von 140 kD und 67 kD, wird viel spezifischer von den Seren der an RP erkrankten Patienten erkannt, erlaubt den Nachweis dieser mit einer Sensibilität von 68% für eine Spezifität von 99%, und bietet sehr überlegene Leistung gegenüber der indirekten Immunofluoreszenz, die eine Sensibilität von 43% für eine Spezifität von 99% zeigt.

[0041] Ein paralleler, mit aus menschlicher Epidermis extrahiertem Antigen durchgeführter Ansatz erlaubte zu zeigen, daß das Protein von 40 kD, die einzig immunoreaktive Form in diesem Gewebe, erlaubte Diagnoseleistungen zu erhalten, die denen des murinen Antigenproteins, das zwischen zwei Molmassenstandards von 140 kD und 67 kD wanderte,

äquivalent waren.

[0042] Die Erfindung bezieht sich auch auf ein Verfahren zum Reinigen von Autoantikörpern, die spezifisch bei Patienten vorliegen, die an RP erkrankt sind, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß es wenigstens die nachfolgenden Schritte umfaßt:

– Kontaktieren einer biologischen Flüssigkeit eines an rheumatoider Polyarthritis erkrankten Patientin mit mindestens einem erfindungsgemäßen Antigen und/oder mit menschlichem Filaggrin oder Profilaggrin, oder mit ihren Fraktionen oder ihren Peptidfragmenten, wie sie in dem vorstehenden definiert sind, unter Bedingungen, die die Bildung von immunologischen Komplexen mit den genannten Antikörpern erlauben;
– Isolierung der genannten Komplexe aus dem Reaktionsmilieu;
– Trennen der Antikörper der immunologischen Komplexe.

[0043] Die Erfindung behandelt ebenso ein Verfahren zur Herstellung polyklonaler Antikörper, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß man als immunogen wenigstens ein erfindungsgemäßes Antigen (Proteine, Proteinfraktionen oder Peptidfragmente) verwendet.

[0044] Diese Antikörper können den bereinigten polyklonalen Antikörpern entsprechen oder monoklonalen Antikörpern, die ganz aus Hybridomzellen hergestellt sind.

[0045] Die Erfindung umfaßt ebenso ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, das dadurch gekennzeichnet ist, das menschliches Filaggring oder Prorilaggrin als Immunisierungsantigen verwendet wird, und dadurch, daß die Antikörper gesammelt werden, die das Antigen des Ösophagosepithels der Ratte ebenso erkennen. Diese Antikörper können gereinigten polyklonalen Antikörpern entsprechen oder monoklonalen Antikörpern, die mittels Hybridomzellen erzeugt wurden, die nach klassischen Verfahren der Zellfusion in aktivierten Milzzellen in vitro mittels dem Antigen hergestellt wurden oder aus einem gegen eines der erfindungsgemäßen Antigenproteine immunisierten Tier stammen und von einer Myolomazelllinie.

[0046] Es ist selbstverständlich, daß die Erfindung ebenso alle durch die obigen Verfahren erhaltenen Antikörper betrifft.

[0047] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von antiidiotypischen Antikörpern, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß es eine Verfahrensstufe aufweist, in deren Verlauf ein Tier mit einem erfindungsgemäß erhaltenen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper immunisiert wird.

[0048] Die erfindungsgemäß erhaltenen Antikörper sind insbesondere für Forschungszwecke einsetzbar, zum Studieren der mit der RP verbundenen immunologischen Mechanismen und bei der Schaffung von Behandlungen.

[0049] Sie können ebenso zum Lokalisieren und Charakerisieren von Antigenen verwendet werden, die ähnliche Merkmale zeigen, wie die der erfindungsgemäßen Antigene; insbesondere den eventuell in den Malphigiepithelen vorliegenden Antigenen und in den Gelenkgeweben von Säugetieren, wobei Säugetiere anderer Spezies als dem Mensch oder der Ratte umfassen.

[0050] Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung zeigen sich bei dem Studium der nachfolgenden Beispiele, die durch die beigefügten Figuren erläutert sind und wobei diese Beispiele nicht zur Reduktion des Umfangs der Ansprüche zu interpretieren sind.

Beispiel 1: Charakterisierung des aus dem Ösophagusepithel der Ratte extrahierten Antigens

1. Material und Verfahren

A – Extraktion der Epithelproteine

1) Herstellung der Ösophagosepithel durch chorioepitheliale Spaltung

[0051] Der Ösophagus der Ratte ist aus drei Hauptschichten gebildet, welche von außen nach innen sind: eine Bindeschicht (Adventice), eine Muskelschicht (Muskulus), eine Schicht, zusammengesetzt aus einem mit einem körnigen Malpignepithel bedeckten Chorium (Mukos).

[0052] Nach Beseitigung der Adventice und der Muskulus durch Sezieren wird das Epithelium mechanischem vom Chorium getrennt (chorio-epithelial Spaltung), wobei dies nach einem sukzessiven thermischen Schock bei 4°C, dann bei 57°C in flüssigem Milieu erfolgt (KH_2/K_2H-PO_4 8,5 mM; NaCl 150 mM, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 5 mM; Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 4 mM; pH 7,4). Die gespaltenen Epithel werden hydratisiert in einem minimalen Volumen PBS (KH_2/K_2H-PO_4 8,5 mM; NaCl 150 mM; pH 7,4) vor dem Unterwerfen unter eine histologische Kontrolle, die erlaubt die Abwesenheit von kontaminierenden Chorion zu verifizieren, konserviert.

2) Extraktion der Epithelproteine

a) Puffer und Extraktionssequenzen

[0053] Das erfindungsgemäße Antigen ist aus-

schließlich epithelial, nru aus dem Epithel, das extrahiert wurde.

[0054] Ausgehend von den gespalteten Epithelien wird die Extraktion der Epithelialproteine sukzessive mittels Feinzerkleinerung (broyage au potter) und nachfolgender Agitation bei 4°C verwirklicht.

[0055] Die an die sequenzielle Extraktion von Proteinen aus Epithelialgewebe und insbesondere der Epidermis angepassten klassischen Protokolle (W. W. Franke et al., J. Mol. Biol., 153: 933–959, 1981 T. T. Sun and H. Green, J. Biol. Chem. 253 (6): 2053–2060, 1978) sind zu allererst verwendet worden. Nach den Extraktionen in einem Schritt hat man anschließend getestet. Unterschiedliche Extraktionsmilieus, die Tris-HCl-Puffer mit zugefügten oder nicht zugefügten Salzen (KCl, NaCl) entsprechen, Detergenzien (Triton, Nonidet P40 [NP40]), Denaturierungsmittel (Harnstoff, SDS) und Reduktionsmittel (Betamercaptoethanol [2-ME]) wurden auf diese Weise getestet.

[0056] Im Verlauf der fraktionierten Extraktionen wurde das Antigen ausschließlich in der Fraktion gefunden, die einem Trispuffer von schwacher Ionenstärke entspricht oder einem Tris-Salz-Puffer (TBS) mit zugegebenem EDTA und Triton. Dies hat die Bestätigung erlaubt, daß das Antigen kein Cytokeratin ist, und zu zeigen, daß es in Abwesenheit von Harnstoff und Reduktionsmitteln extrahierbar ist, und daß es wasserlöslich ist.

[0057] Dennoch erschien im Vergleich der verschiedenen Extraktionstechniken die Intensität der Immunoreaktivität in der Gegenwart von NP40 überlegen. Ein aus TBS + Inhibitoren + NP40 bei 0,5% gebildetes Extraktionsmilieu erscheint somit als das Wirksamste.

[0058] Bei der Reinigung des Antigens überlagert sich die Absorptionsintensität von NP40 bei 280 nm mit der der Proteine, insbesondere bei der Gelfiltrationschromotographie. Ein TBS + Inhibitor-Puffer ohne NP40 kann zur Extraktion des Antigens vor den Reinigungsarbeiten verwendet werden.

b) Optimierung der physikalischen Extraktionsbedingungen

[0059] Um das Extraktionsverfahren zu optimieren, sind bestimmte physikalische Parameter auf systematische Weise untersucht worden. Es handelt sich dabei um die Temperatur, die Dauer, die Art der Zerkleinerung, die Art der Agitation und die Wirkung von enzymatischen Inhibitoren.

Zerkleinerung

[0060] Sie wurde bewirkt, sei es mit einer elektrischen Hochgeschwindigkeitseinrichtung (potter électrique), sei es auf sanftere Weise, mit einer mechanischen Zerkleinerungseinrichtung (potter manuel). Die Effizienz der Extraktion ist in beiden Fällen annähernd äquivalent. Die elektrische Zerkleinerung ist dennoch bevorzugt, weil sie die Zerkleinerung einer größeren Anzahl von Ösophagen erlaubt.

Behandlung mit Ultraschall

[0061] Die Optimierung der Extraktion durch Beschallen mit Ultraschall von variabler Dauer nach dem Zerkleinern wurde untersucht. Sie stellte sich als sehr schwach heraus. Die Beschallung mit Ultraschall ist daher nicht erforderlich.

Agitation

[0062] Eine sanfte Agitation und eine schnelle Agitation sind verglichen worden. Eine schnelle Agitation in Gegenwart eines Detergenz zieht die Bildung von Schaum nach sich, was eine starke Anreicherung des Mediums mit Sauerstoff bewirkt und eine Veränderung des Antigens ermöglicht. Tatsächlich ist die Qualität der Extraktion in den beiden Fällen identisch gewesen. Es ist jedoch an einer sanften Agitation festgehalten worden, um ein Maximum des Antigens zu erhalten.

Temperatur

[0063] Umgebungstemperatur und eine Temperatur von 4°C sind verglichen worden. Die besseren Resultate sind mit den bei 4°C durchgeführten Extraktionen erhalten worden.

Dauer

[0064] Extraktionen unter Agitation von 15 Minuten, 2 Stunden und 17 Stunden sind verglichen worden. Obwohl eine Verlängerung der Extraktionszeit die Menge des extrahierten Antigens leicht verbesserte, wurde eine Dauer von 15 Minuten festgehalten, um das Risiko der Veränderung des Antigens zu minimieren.

Inhibitoren

[0065] Die Schutzwirkung der nachfolgenden Inhibitoren auf das Antigen ist untersucht worden:
Inhibitor der bakteriellen Proliferation:
Natriumazid,
Inhibitor von lytischen Enzymen:
Proteasen (Aprotinin, PMSF), Phosphatasen (NaF, PCMB (Parachloromercuribenzoesäure)), Glykosidasen (Deoximanojirimyzin, Deoxijirimyzin).

[0066] Extraktionen ohne Inhibitoren sind insbesondere deshalb erfolgt, weil der Extrakt für die biochemische Charakterisierung des Antigens mittels Wir-

kung von unterschiedlichen Enzymen bestimmt war; es wurde keine Modifikation des Antigens in Abwesenheit eines Inhibitors festgestellt.

Optimiertes Extraktionsprotokoll

[0067] Das Studium der vorangehenden Parameter erlaubte das Festlegen des nachfolgenden, optimierten Extraktionsprotokolls:
Substrat: Ösophagosepithel der Ratte, erhalten durch chorioepitheliale Spaltung.
– Puffer: Tris-HCl 40 mM
NaCl 150 mM
EDTA 10 mM
pH 7,4
– Inhibitoren: Natriumazid 0,1%
PMSF 1 mM
Aprotinin 2 µg/ml
– Verhältnis Substrat/Puffer:
500 µl des Puffers pro Ösophagusepithel
– Bedingungen:
Zerkleinerung: Elektrische Zerkleinerung (potter élektrique), 15 Minuten
Zerkleinerungstemperatur: 4°C
Agitation nach der Zerkleinerung: 15 Minuten bei 4°C
– Gesamtproteinkonzentration des Extrakts:
5 bis 8 mg/ml
– Konservierung des Trockenextrakts:
–20 oder –40°Celsius

Zubereitung aus vollständiger Ösophagusschleimhaut

[0068] Mit dem Ziel der Vereinfachung des Extraktionsverfahrens wurde die Extraktion des Antigens aus vollständiger Ösophagusschleimhaut untersucht. Ein einfaches Sezieren der Schleimhaut ohne chorioepitheliale Spaltung ist durchgeführt worden. Die induzierte Proteinkontamination des so erhaltenen Extrakts wurde untersucht.

[0069] Parallele Extraktionen, sei es aus Schleimhäuten, sei es aus gespaltenen Epitheln sind durchgeführt worden.

[0070] Die Analyse der extrahierten Proteine mit PAGE-SDS zeigt, daß die Gegenwart des Choreons keine größere Proteinkontamination im Molmassenbereich des Antigens bewirkt. Nach Immun-Blot der durch Zerkleinern extrahierten epitheliochorialen Fraktion ist das Antigen genau nachweisbar.

c) Konzentration des Trockenextrakts

[0071] Das Antigen ist gering in dem Trockenextrakt enhalten (weniger als 1% der gesamten Proteine), weshalb sich ein Schritt der Konzentration der Extrakte als erforderlich erweist, vor allem, weil diese mittels miniaturisierter Elektrophorese von der An des Systems „Phastsystem Pharmacia®" analysiert werden müssen (Einlagerungen in der Größenordnung von Mikrolitern).

[0072] Unter den unterschiedlichen untersuchten Techniken der Konzentration ist an denen festgehalten worden, die auf der Konzentration der Extrakte mittels Präzipitation in 10% TCE beruhen. Diese Technik ist leicht auszführen und erzeugt keine Veränderung des Antigens, da ja die immunologische Antwort vollkommen mittels Immun-Blot konserviert wurde.

[0073] Auf dieselbe Weise induzierten Präzipitation mittels Ethanol oder Ammoniumsulfat sowie die gesteuerte Lyophylisation keine spürbare Veränderung des Antigens und sind somit vollkommen verwendbar.

B – Elektrophoresen

[0074] Wie die untersuchten Extraktionsmedien (wie vorangehend beschrieben), wurden die löslichen Proteine mittels PAGE isoliert und nachfolgend auf nitrozellulose elektrotransferiert.

1) Trennung mittels horizontaler IEF

– Gel: 9 × 15 cm, 4% Acrylamid, enthaltend Ampholine und einen pH-Gradienten von 3,5 bis 9,5 bildend.
– Eingelegte Probe: nach dem vorstehenden Protokoll hergestelltes Trockenextrakt, konzentriert mittels Präzipitation in 10% TCE und in Wasser wiederaufgenommen.

2) Eindimensionale Elektrophoresen

– Klassische vertikale Elektrophorese gemäß dem von Laemmli beschriebenen Verfahren (Nature, 227: 680,685, 1970).
– Gel: 10 × 10 cm, 7% Acrylamid.
– Wanderungspuffer: Tris 25 mM, Glycin 192 mM, SDS 1%, pH 8,3.
– Eingelegte Probe: lyphilisiertes und in Tris-HCL 10 mM pH 7,4, SDS 2%, 2ME 1%, Bromphenol blau 0,1%, Glycerol 10%, wiederaufgenommenes Trockenextrakt.
– Miniaturisierte horizontale Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen.
– Gel: 4 × 4 cm, 7,5% Acrylamid.
– Trispuffer 200 mM, Tricin 200 mM, SDS 0,55%, pH 8,1.
– Eingelegte Probe: Trockenextrakt, konzentriert mittels Präzipitation in 10% TCE und wiederaufgenommen in Tris-HCL 10 mM, pH 7,4, SDS 2%, 2-ME 1%, Bromphenolblau 0,1%.
– Miniaturisierte horizontale Elektrophorese unter nativen Bedinungen.
– Gel: 4 × 4 cm, Gradient von 8 bis 25% in Acryl-

amid.
– Wanderungspuffer: Tris 250 mM, L-Alanin 880 mM, pH 8,8.
– Eingelegte Probe: Trockenextrakt, konzentriert mittels Präzipitation in 10% TCE und wiederaufgenommen, sei es in Wasser, sei es in dem Puffer Tris-HCL 200 mM bei verschiedenen pH-Werten.

3) Zweidimensionale Elektrophoresen IEF/PAGE-SDS

– Erste Dimension: horizontale IEF.
– Gel: 4 × 4 cm, 4% Acrylamid, pH-Gradient 3,5 bis 9,5.
– Eingelagerte Probe: Trockenextrakt, konzentriert durch Präzipitation in Ethanol (4 Volumina) und wiederaufgenommen in Wasser.
– Zweite Dimension: denaturierende Elektrophorese wie vorangehend beschrieben.
– Eingelagerte Probe: IEF Gelspur, inkubiert in Tris 112 mM, Essigsäure 112 mM, SDS 2,5%, 2-ME 1%.

C – Immunodetektion

[0075] Die Immunodetektion des Antigens wird mit Hilfe von menschlichen Sera durchgeführt, die von an RP erkrankten Patienten stammen, in denen die anti-Stratum Corneum Antikörper aus dem Ösophagus der Ratte vorhergehend mittels semiquantitativer IIF titriert worden sind und einen Titer-Wert von 0 bis 8 ergaben: GIFOR-Parameter (G-Immunofloureszenz-Ösophagus der Ratte). Der Grenzwert, GIFOR = 2, der einer diagnostischen Spezifität für die RP über 99% entspricht, erlaubt die Sera der Erkrankten in zwei Gruppen einzuteilen: GIFOR+ und GIFOR– (C. Vincent et al., Ann. Rheum. Dis. 48: 712–722, 1989).

[0076] Aus den gewählten Sera kam der nachfolgende immunologische Parameter in Betracht: Der Titer der Epidermisantizyklokeratinautoantikörper der Klasse G, bestimmt mittels ELISA (GELISA) (G. Serre et al., J. Invest. Dermatol. 88: 21–27, 1987). Diese Autoantikörper reagieren im Immunotranfer mit den kontaminierenden menschlichen Cytokeratinen, die gegenbenenfalls in den Extrakten aufgrund der natürlichen Schuppenbildung des Laborpersonals vorliegen. Die verwendeten Sera sind zur gleichen Bildung von zwei Gruppen, GELISA+ und GELISA–, als Funktion eines erhöhten Titers (Absorbtion > 0,6) oder schwachen Titers (Absorbtion > 0,2) dieser natürlichen Antikörper gewählt worden. Insgesamt sind die nachfolgenden vier Untergruppen der Sera von RP verwendet worden:
– GIFOR+/GELISA+
– GIFOR+/GELISA–
– GIFOR–/GELISA+
– GIFOR–/GELISA+

[0077] Schließlich sind von normalen Individuen oder an nicht-rheumatoiden rheumatischen Erkrankungen leidenden Patienten stammende Vergleichssera sowie für menschliche Cytokeratine spezifische murine monoklonale Antikörper in die Tests mit einbezogen worden (G. Serre et al., Colloque INSERM, John Libbey Eurotext, Vol. 171: 524, 1988).

[0078] Nach einer PAGE der Proteine, Immun-Blot auf Nitruzellulosemembran und Inkubation mit menschlichen Sera oder munoklonalen Antikörpern wird ein zweiter Antikörper, der den Fragmenten F(ab)'2 des menschlichen Ziegen anti-IgG(Gamma) oder dem Fab der Schaf anti-IgG (H + L) der Maus entspricht und Peroxidase markiert ist, mit der Membran inkubiert und die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes wird durch Hervorheben der Peroxidaseaktivität mittels H_2O_2 und 4-Chlor-1-Naphtol aufgedeckt.

[0079] Unter diesen experimentellen Bedingungen ist das Antigen durch eine für die Sera von RP GIFOR+ spezifische Immunoreaktivität im Immun-Blot auffindbar. Die natürlichen Anticytokeratine übertragen sich nur, wenn das Antigen zuvor mittels PAGE getrennt wurde, durch Vorliegen von immunoreaktiven Banden um 65 bis 67 kD, die nur den GELISA+-Sera vorliegen und mehr oder weniger als Funktion ihres Titers intensiv sind und vollständig unabhängig von ihrem GIFOR-Wert.

D – Chromatographie

[0080] Die Antigenmoleküle sind nach sequentieller Gelfiltrationschromatographie/hydrophober Wechselwirkung in unterschiedliche Fraktionen getrennt worden. Diese Fraktionen wurden mittels PAGE-SDS und PAGE unter nativen Bedingungen analysiert.

E – Enzymatischer Aufschluß

1) Proteinsase K

[0081] Zwei Extrakte aus dem Ösophagusepithel der Rate in TBS/NP40 Puffer sind in 10% TCE präzipitiert worden, wobei die Proteine in einem Puffer Tris-HCL 50 nM pH 7,5 $CaCl_2$ 10 mM wiederaufgenommen wurden. Einem der Extrakte wird Proteinase K (während einer Stunde bei 37°C zur Eliminierung von anderen eventuell in der gewerblichen Zubereitung vorliegenden Hydrolasen vorinkubiert) zu einer Endkonzentration von 50 g/ml hinzugegeben. Die beiden Proben werden danach während einer Stunde bei 37°C inkubiert und dann im Immun-Blot nach einer Wanderung im PAGE unter nativen Bedingungen oder PAGE-SDS vergleichend analysiert.

2) Nuklease

[0082] Zwei Extrakte vom Ösophagusepithel der

Rate in einem TBS/NP40 Puffer werden in 10% TCE prezipitiert. Eine von beiden wird mit 2 U/µl Mikrokoknuklease (Hydrolysat der DNS und der RNS) in Tris-HCL 50 mM, pH 7,5, $CaCl_2$ 5 mM, hydrolisiert. Die zweite nicht behandlete Probe dient als Vergleich. Die beiden Zubereitungen werden während einer Stunde bei 37°C inkubiert, dann in einem Immun-Blot nach Wanderung in PAGE unter nativen Bedingungen oder in PAGE-SDS vergleichend analysiert.

F – Deglykosylierung

1) Oxidation mit Periodsäure

[0083] Das Protokoll von WOODWARD et COLL. (J. IMM. METH. 78: 143–153, 1985) wurde verwendet; dieses Protokoll erlaubt die Periodoxidation einer zuvor auf eine Nitrozellulosemembran überführte Probe, wobei die Periodoxidation von einer Immunodetektion gefolgt sein kann.

[0084] Ein Extrakt aus dem Ösophagusepithel der Ratte wird nach Wanderung in PAGE-SDS transferiert. Die Nitrozellulosemembran wird in mehrere Bahnen zerschnitten, die einer Periodoxidation (Inkubation in einem Natruimacteatpuffer 50 mM pH 4,4, Natriumperiodat 20 mM, während einer Stunde bei Verdunkelung und bei Umgebungstemperatur) unterworfen wird, gefolgt von einer Natriumborhydridreduktion ($NaBH_4$ 50 mM in PBS pH 7,4 während 30 Minuten bei Umgebungstemperatur). Die Vergleichsproben haben keine chemische Behandlung erfahren oder es ist nur die Reduktion eingeschlossen gewesen. Die Gesamtheit der Proben wurde danach einer Immunodetektion unterzogen.

2) Behandlung mit Trifluormethansulfonsäure (TFMS)

[0085] Der Einsatz von TFMS gemäß dem Verfahren von EDGE et Coll. (ANAL. BIOCHEM. 118: 131–137, 1981) erlaubt eine fast vollständige Deglykosylierung der Glykoproteine unter Konservierung Ihrer Peptidachse. Dieses Verfahren ist bei einem Vergleichsglykoprotein angewendet worden, dem bovinen Fetuin, und bei Extrakten aus dem Ösophagusepithel der Rate, die das Antigen enthalten. Die Extrakte sind gegen Wasser dialysiert worden, dann lyophilisiert. Ihre Behandlung erfolgte mittels Zugabe einer Mischung (66/33-V/V) von TFMS und Anisol (Schutzagens für die Peptidachse) und inkubieren unter Rühren nach Sättigung der Röhren mit Atmosphärenstickstoff. Das Referenzprotokoll ist unter Variation verschiedener Parameter optimiert worden:

– Anteil der Mischung TFMS/Anisol im Verhältnis zur Masse der behandelten Proteine: 33 bis 266 µl Mischung pro mg Gesamtprotein des Ösophagusxtrakts.
– Temperatur: 0,4°C, 4°C oder Umgebungstemperatur.
– Dauer der Inkubation: 1, 3 oder 24 Stunden.

[0086] In sämtlichen Fällen wird das Stoppen der Reaktion nach der Inkubation durch Zugabe von zwei Volumina von eiskaltem Ether und drei Volumina einer Mischung von Pyridin/Wasser (50/50-V/V) bewirkt. Das in der Etherphase lösliche Präzipitat von Pyrdintrifluourmethansulfonat wurde mit dieser enfernt. Nach einer neuen Extraktion mit eiskaltem Ether wurde die wässrige Phase gegen Wasser dialysiert. Die Proben sind anschließend lyophylisiert worden, mittels PAGE getrennt, transferiert und dann einer Immunodetektion unterzogen worden.

3) Behandlung mit dem Peptid N-Glycosidase F (PNGase F)

[0087] Die PNGase F, ebenso unter dem Namen Glycopeptidase F oder M-Glycanase vertrieben, hydrolisiert die zwischen dem Asparaginylrest eines Glycoproteins und. N, N'-diacetyl-chitobiose von der Struktur, wie sie sämtlichen N-gebundenen Olygosacchariden gemeinsam ist, existierende Amidbindung.

[0088] Das Fetuin enthält drei N-gebundene Oligosaccharidketten deren Entfernung mit der PNGase F eine leicht in PAGE-SDS erkennbare Verringerung der Molmasse nach sich zieht (S. HIRANI et al., ANAL: BIOCHEM. 162: 485–492, 1987).

[0089] Das bovine Fetuin (2 mg/ml) und ein lyophilisiertes Extrakt aus dem ösophagen Epithelium der Ratte (8 mg/ml Protein) werden während 5 Minuten bei 90°C mit 2% SDS und 0,05 M 2-ME denaturiert. Dann werden die Proteine in ein Reaktionsmedium der nachfolgenden Zusammensetzung gegeben:

– NP40 1,25% (Schutz des Enzyms gegenüber der denaturierenden Wirkung von SDS),
– Kaliumphosphat 166 mM pH 8 (Beibehaltung des für das Enzym optimalen pH-Werts),
– 1,10-orthoPhenantrolin 10 mM (Proteaseinhibitor) zu einer Endkonzentration von 10% in Methanol gelöst,
– PNGase F 0,3 U/µl.

[0090] In diesem Reaktionsmedium sind die auf SDS und 2-ME bezogenen Endkonzentrationen 0,166% und 16 mM. Die Inkubation erfolgt für 24 Stunden bei 37°C.

[0091] Die Vergleichsproben „Fetuin" und „Antigenextratkt", die ohne Enzym inkubiert worden sind, sind in das Protokoll eingeschlossen. Nach Hydrolyse und Konzentration mittels Präzipitation in TCE werden die Proben mittels PAGE getrennt, transferiert und einer Immunodetektion unterzogen.

G – Reaktivität mit unterschiedlichen Lectinen

[0092] Die Erfinder haben nach einer Bestätigung der Glycoproteinnatur des Antigens durch Nachweis bestimmter Zucker mittels an Peroxidase gekoppelter Lectine gesucht. Zwei Pflanzenlectine: Weizenkeimlectin (WGA) und das Concanavalin A (ConA) sind aufgrund ihrer unterschiedlichen Spezifitäten gewählt worden (I. J. GOLSTEIN et R. T. PORETZ, The Lectins: properties, functions and applications in biology and medicine)

– Das WGA erkennt die Reste von D-N-Acetylglucosamin mit den nachfolgenden Kreuzaffinitäten:
(1) GlcNAc << GlcNAcβ1-4GlcNAc << GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc und verbindet sich ebenso mit verminderter Affinität mit Sialinsäureresten.

– Con A verbindet sich mit den mittels Kreuzaffinität klassifizierten nachfolgenden Zuckkern:
(2) αGlcNAc < αGlc < αMan < Manα1-2Man < Manα1-2Manα1-2Man

[0093] Die Proteine der beiden Antigenextrakte, trocken oder gereinigt, werden nach eindimensionaler Wanderung in PAGE oder IEF/PAGE-SDS auf Nitrozellulose transferiert. Die Banden der Nitrozellulose werden mit Con A und WGA, an Peroxydase, in jeweiligen Minimalkonzentrationen von 20 und 15 g/ml inkubiert (J. C. S. CLEGG, ANAL. BIOCHEM 127: 389–394, 1982 und W. F. GLASS et al., ANAL. BIOCHEM 115: 219–224, 1981). Die Inkubation erfolgt in einem Puffer Tris-HCL 50 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MnCl_2$ 1 mM und Tween 0,1%, während einer Stunde bei 37°C und einer Nacht bei 4°C. Dieser vorangehend und folgend sind Stufen des Waschens in demselben Puffer. Verschiedenene ergänzende Sättigungsagenzien wie Gelatine oder mittels Behandlung mit Periodsäure oxidiertes bovines Serumalbumin erlauben allein aufgrund der Verwendung von Tween keine Amplifikation der erhaltenen Antwort. Nach dem letzten Waschen wird die Verbindung Lectin-Antigen durch Hervorheben der Peroxidaseaktivität mittels H_2O_2 und 4-Chlor-1-Naphtol wie bei den Immunodetektionen aufgedeckt.

II – Physiochemische Charakterisierung des Antigens

[0094] Die physiochemische Charakterisierung des Antigens wird ausgehend von Trockenextrakten des Ösophagusepithels der Ratte, dann ausgehend von gereinigten Antigenfraktionen bewirkt. In den beiden Fällen wurden die Proteine nach elektrophoretischer Trennung tranferiert und dann mittels Sera von an RP erkrankten Patienten einer Immunodetektion unterzogen.

A – Molmasse

[0095] Fig. 1 zeigt die Immun-Blotanalyse eines Extrakts vom Ösophagusepithel der Ratte, das mittels PAGE-SDS getrennt wurde. Das Trockenextrakt wird zehn mal mittels Präzipitation in 10% TCE konzentriert, in einem Laemmlipuffer wiederaufgenommen, mittels PAGE-SDS (6,5%) getrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit den Seren von RP GEFOR+ (Banden 1–12) und GIFOR– (Banden 13, 14), verdünnt auf 1/100, einer Immunodetektion unterzogen; „T_0" zeigt einen negativen Vergleich, nur mit sekundären Antikörpern inkubiert und „PM" repräsentiert die Molkulargewichtsmarke. Das Antigen zeigt sich in Form einer begrenzten immunoreaktiven Bande, die einem Protein von einem mittleren Molekulargewicht von 210 kD entspricht, und einer großen und ausgedehnten immunoreaktiven Zone, die einem Protein mit einer mittleren Molmasse zwischen 90 und 130 kD entspricht.

B – Isoelektrische Punkte

[0096] Das Trockenextrakt wird fünf mal mittels Präzipitation in 10% TCE konzentriert, in Wasser wiederaufgenommen, mittels IEF (pHi 3,5 bis 9,5) getrennt, transferiert, dann mit GIFOR+ und GIFOR– Seren von Patienten, die an RP erkrankt sind, einer Immunodetektion unterzogen. Die Antigenmoleküle zeigen eine sehr heterogene Verteilung, wobei die Proteine aus dem Trockenextrakt spezifisch von dem Großteil des GIFOR+ Serums erkannt werden und sich auf ein Bündel feiner Banden verteilen, deren isoelektrische Punkte von 5,2 bis 7,5 variieren.

C – Merkmale der Wanderung unter nativen Bedingungen

[0097] Fig. 2 zeigt den Immun-Blot eines Extrakts vom Ösophagusepithel der Ratte, der im sauren Milieu wiederaufgenommen und mittels PAGE unter nativen Bedingungen getrennt wurde. Das zehn mal mittels Präzipitation in 10% TCE konzentrierte Trockenextrakt wird in Wasser wiederaufgenommen (pH niedriger als 4), mittels PAGE unter nativen Bedingungen (8 bis 25%) getrennt, transferiert, dann mit den Sera von RP GIFOR+ (Banden 1 bis 4), verdünnt auf 1/100, einer Immunodetektion unterzogen; „T_0" gibt einen negativen Vergleich wieder, der nur mit einem sekundären Antikörper inkubiert wurde. Unter den Bedingungen der Wiederaufnahme der Probe in einem sauren pH zeigt der mit vier Sera von an RP erkrankten Patienten drei immunoreaktive Zonen, die jeweils entsprechen:

– Einem ersten Protein, das mit der Geschwindigkeit von Pferdeferritin wandert (Molekulargewicht: 440 kD)

– Einem zweiten Protein, das mit der Geschwindigkeit von Rinderleberkatalase wandert (Molekulargewicht: 232 kD), einem dritten Protein, das mit einer Geschwindigkeit zwischen der von Rinderherzlacticodehydrogenase und der von bovinem Serumalbumin wandert (jeweiliges Molekularge-

wicht: 140 kD und 67 kD),

wobei diese mit variabler Affinität gemäß den Sera erkannt werden.

D – Zweidimensionale Elektrophorese

IEF/PAGE-SDS

[0098] Diese Technik, die IEF in der ersten Dimension und PAGE-SDS in der zweiten Dimension kombiniert erlaubt die gleichzeitige Bestimmung der isoelektrischen Punkte und der Molmassen der unterschiedlichen Antigenmoleküle, was ihre große Heterogenität in der Ladung bestätigt und ihre große Heterogenität in der Masse zeigt.

[0099] Fig. 3 zeigt den Immun-Blot eines Extrakts vom Ösophagusepithel der Ratte, das mittels zweidimensionaler Elektrophorese (IEF/PAGE-SDS) getrennt wurde. Das 20 mal mit Präzipitation in Ethanol dann Wiederaufnahme in Wasser konzentrierte Extrakt wird mittels IEF (phi 5 bis 8), dann mittels PAGE-SDS (7,5%) getrennt, transferiert, dann mit zwei Sera von an PR erkrankten Patienten GIFOR+ (1,2), verdünnt auf 1/100, einer Immunodetektion unterzogen. Die Immunoreaktive Zone von 90 bis 130 kD zeigt die von 5,85 bis 7,35 variierenden phi, die der Bande von 210 kD variieren von 5,8 bis 6,85. Eine dritte immunreaktive Population in der Form eines „Kommas" wandert von 120 bis 67 kD während deren phi sich auf kontinuierliche Weise zwischen 5 und 7,5 aufteilen. Die Antigenmoleküle von Molmassen unter 90 kD, klar und deutlich nach einer zweidimensionalen Elektrophorese detektiert, erscheint nicht bei einer eindimensionalen Elektrophorese, außer mit Seren von erhöhtem Titer, in der Form einer Ausweitung der Immunoreaktivität in Richtung der Zonen mit geringem Molekulargewicht. Die größte Menge von in IEF/PAGE-SDS eingelagertem Antigen erlaubt eine bessere Empfindlichkeit der Immunodetektion, was die offensichtliche Diskordanz erklärt.

E – Merkmale der Chromatographischen Trennung

[0100] Fig. 4 zeigt die chromatographische Trennung einer hydrophoben Wechselwirkung einer vorgereinigen Antigenlösung eines Trockenextrakts mittels Gelfiltrationschromatographie über Superose 12 (das Elutionsprofil wurde durch Messen der Absorbtion bei 280 nm verfolgt). Die auf diese Weise vorgereinigten immunoreaktiven Fraktionen werden über Phenylsuperose (Spur 2 = Gleichgewichtspuffer: Phosphat 50 mMol, $(NH_4)_2SO_4$ 1,7 Mol, pH 7; Elutionspuffer: Phosphat 50 mMol, pH 7; Injektionsvolumen: 3,6 ml; Durchfluß: 5 ml/min; DO 280 nm Maßstab (Spur 1): 0,05.

[0101] Die Elutionsprofile und die Untersuchung mittels Immun-Blot der verschiedenen Antigenfraktionen haben sich im Verlauf von mehreren Reinigungen als sehr Reproduzierbar herausgestellt. Die Aufteilung der Antigenmoleküle in unterschiedliche Fraktionen kann daher dargestellt werden.

[0102] Fig. 5 zeigt die Herstellung von Immunoreaktivitätsprofilen von mittels sequenzieller Gelfiltrationschromatographie/hydrophober Wechselwirkung gereinigten Antigenfraktionen, die nach PAGE-SDS (1) oder PAGE unter nativen Bedingungen (2) erhalten wurde. Der Unterschied der Intensität der immunoreaktiven Banden oder Zonen reflektiert den relativen Gehalt an Antigenproteinen jeder Fraktion (A–H).

[0103] Bei einer denaturierenden Elektrophorese sind die Bande bei 210 kD (Fraktion F, G und H), die große, schlecht begrenzte Bande von 90 bis 130 kD (Fraktionen D, E, F, G und H) und eine Bande von 67 bis 90 kD (Fraktionen C, D und E) visualisiert worden.

[0104] Bei einer Elektrophorese unter nativen Bedingungen ist die feine Bande bei 440 kD (Fraktionen F, G und H), die Bande bei 230 kD (Fraktionen C, D, E, F, G und H) und die große Bande zwischen den Verlgeichsproben von 140 kD und 67 kD (Fraktionen B, C, D und E) wieder erkannt worden.

[0105] Der Vergleich der mit PAGE-SDS analysiertem Antigenmoleküle in den verschiedenen gereinigten Fraktionen (Fig. 5) und den nach zweidimensionaler Elektrophorese (IEF/PAGE-SDS) in einem Trockenextratk identifiziertem Molküle, wie in Fig. 3 gezeigt, informiert über deren jeweilige Hydrophobizität:

– Die Bande bei 210 kD, deren pHi von 5,85 bis 6,85 variieren, wird in den am Ende der Elution erhaltenen Fraktionen (Fraktionen F, G und H) gefunden, sie ist daher sehr hydrophob.

– Die diffuse Zone von 90 bis 130 kD, deren pHi sich von 5,85 bis 7,35 befinden, zeigt dasselbe Elutionsprofil, wie die Bande bei 210 kD (Fraktionen E, F, G und H) und daher dieselbe Hydrophobizität.

– Die Population in Form eines „Kommas" hingegen, die stärker gespreizte pHi von 5 bis 7,5 zeigt, wird hauptsächlich zu Beginn der Elution gefunden (Fraktionen B, C, D, und E,) und zeigt daher einen weniger hydrophoben Charakter als die beiden vorangehenden Moleküle.

III – Biochemische Charakterisierung des Antigens

A – Die Antigenmoleküle sind von Eiweißnatur

[0106] Fig. 6 zeigt die Immun-Blotanalyse der Proteine eines mit Proteinase K digerierten (b) oder nicht digerierten (a) Antigenextrakt, getrennt mittels PAGE unter nativen Bedingungen (8 bis 25%), transferiert, dann mit drei Sera von an RP erkrankten Patienten GIFOR+ (Banden 1 bis 3) und einem Serum von einem an RP erkrankten Patienten GIFOR– (Bande 4)

durchgeführten Immunodetektion; T_0 zeigt eine negative Vergleichsprobe, die nur mit einem sekundären Antikörper inkubiert wurde.

[0107] Die Ponceaurot gefärbten Nitrozellulosebanden, die den behandelten Proben entsprechen, zeigen den Gesamtaufschluß der Proteine des Extrakts. Die Immunodetektion nach PAGE unter nativen Bedingungen zeigt, daß die spezifische Immunoreaktivität der Sera GIFOR+ verschwindet, wenn die Probe zuvor mittels Proteinase K digeriert wurde. Die Immunodetektion nach Transfer der mit PAGE-SDS getrennten Proben hat dieses Resultat bestätigt.

[0108] Die Proteinnatur der die Antigenitität tragende Moleküle ist bestätigt worden, wobei die Erfinder Bestimmungen durchgeführt haben, ob es sich um Homo- oder Heteroproteine handelt, wobei die Assoziationen und/oder Substitutionen des Antigens im Stande sind einen Unterschied des isoelektrischen Punkts und der Molmasse festzustellung und welches die biochemische Natur von dem oder den erkannten Epitopen sind.

B – Die Antigenproteine sind nicht mit den Nukleinsäuren assoziiert

[0109] Eine mögliche Assoziation des Antigens mit Nukleinsäuren ist untersucht worden. Fig. 7 zeigt (1) die Analyse eines Extrakts vom Ösophagusepithel der Ratte, behandelt (b) oder nicht (a) mit Mikrokoknuklease, dann mittels Gelelektrophorese mit 1% Agarose analysiert, gefolgt von einer Färbung mit Ethidiumbromid, wobei „M" ein Marker der Größe von Basen in Kilopaaren ist.

[0110] Nach Trennung der Proben mittels Elektrophorese mit 1% Agarosegel beweist die Abwesenheit von Nukleinsäuren in der behandelten Probe die Wirksamkeit des enzymatischen Aufschlusses.

[0111] Fig. 7 zeigt (2) die Analsyse mittels Immun-Blot nach PAGE unter nativen Bedingungen (8 bis 25%), durchgeführt mit drei Sera von Patienten, die an RP erkrankt sind, GIFOR+ (Banden 1 bis 3) und einem Serum von RP GIFOR– (Bande 4); T_0 zeigt eine negative Vergleichsprobe, die nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurde.

[0112] Die Immunodetektion mit PAGE unter nativen Bedingungen zeigt die Unempfindlichkeit der Antigenproteine gegenüber einer Behandlung mittels Nuklease vom Gesichtspunkt ihrer Immunoreaktivität mit den Sera von RP Patienten, wobei deren Molmasse belegt, daß sie nicht mit Nukleinsäuren assoziiert sind.

C – Sind die Antigenproteine Glykoproteine

[0113] Glykoproteine zeigen häufig eine große Heterogenität deisoelektrischen Punkte und einen unbeständigen Satz der Fixierung von SDS, was ihre Auflösung in PAGE-SDS mangelhaft ausbildet. Die Antigenproteine zeigen ebenso diese Merkmale, wobei die Erfinder ihre mögliche Substitution durch Glzcidreste untersucht haben. Bis jetzt sind Techniken verwendet worden, sei es zur Veränderung der eventuell von der Peptidachse getragenen Zuckermoleküle, sei es zum Befreien des Proteinteils von seinen Glykanresten.

1) Zerstörung möglicher Glucidepitope mittels Periodsäure

[0114] Fig. 8 zeigt die Immunodetektion eines Extrakts vom Ösophagosepithel der Ratte, welche, nach Trennen mittels PAGE-SDS (7,5%) und Transfer:

- während 1 h 30 Minuten in einem PBS-Puffer inkubiert wurde (Vergleich „Inkubation": Bande a),
- während 1 h in Natriumacetatpuffer inkubiert wurde, dann während 30 Minuten mit Natriumborhydrid reduziert wurde (Vergleich „Reduktion": Bande b),
- mit Periodsäure in Natriumacetatpuffer während 1 h oxidiert wurde, dann während 30 Minuten mit Natriumborhydrid reduziert („essai": Bande c), drei Sera RP GIFOR+ (Banden 1 bis 3), zwei Sera RP GIFOR– (Banden 4, 5) und zwei Kontrollsera (Banden 6, 7) wurden verwendet; „T_0" zeigt eine negative Vergleichsprobe, die nur mit einem sekundären Antikörper inkubiert wurde.

[0115] Die Behandlung mit Periodsäure hat nicht im geringsten die Proteine modifiziert, die spezifisch von den Sera der an RP erkrankten Patienten erkannt werden. Drei Interpretationen des Ergebnisses sind möglich:

- die Antigenproteine sind Glykoproteine aber die gegenüber einer Periodoxidation empfindlichen Zucker, die sie tragen, sind nicht in das oder die Epitope involviert, die hauptsächlich von den für die RP spezifischen Autoantikörper erkannt werden.
- die Antigenproteine sind Glykoproteine aber die Zucker, die sie tragen, sind aufgrund ihrer Natur und/oder ihrer Art der Verkettung unempfindlich gegenüber einer Periodoxidation (Periodsäure spaltet die Bindung zwischen zwei vicinalen Kohlenstoffatomen, die ursprünglich jeweils eine Alkoholfunktion oder das eine eine Alkoholfunktion und das andere eine Säure- oder Ketonfunktion oder eine Funktion eines primären oder sekundären Amins trägt).
- die Antigenproteine sind keine Glykoproteine.

[0116] Um zwischen den drei Möglichkeiten zu entscheiden, haben die Erfinder ein Verfahren der vollständigen Deglykosylierung eingesetzt und dann die Veränderungen der Masse oder der Immunoreaktivi-

tät der Antigenproteine zu ermitteln gesucht.

2) Deglykosylierung

[0117] Zwei prinzipielle Arten von Bindung erlauben die Assoziation eines Oligosacharids mit einer Peptidachse: die O-glykosidische Bindung, die die Verbindung eines Oligosacharids mit einem Serin- oder Treoninrests (und selten Hydroxylysin) durch Vermittlung von einem N-acetylierten Galaktosamin erlaubt und die N-glykosidische Bindung, die ein Oligosacharid an einen Asparaginrest über die Verbindung mit einem N-acetylierten Glukosamin anschließt.

[0118] Zum Deglykosylieren der Glykoproteine können zwei Arten von Behandlung angewendet werden:

– aspezifische Behandlungen, die die Entfernung sämtlicher Arten von Glycidradikalen erlauben, die an das Protein über eine N- oder eine O-glykosidische Bindung gebunden sind. Das ist zum Beispiel bei der chemischen Behandlung mittels Trifluormethansulfonsäure (TFMS) der Fall;
– spezifische Behandlungen des einen oder des anderen Bindungstyps. Das ist der Fall der β-Eliminierung mittels sogar für O-glykosidische Bindungen und einer bestimmten Anzahl enzymatischer Hydrolysen die mehr oder weniger spezifisch für die chemische Natur des N-gebundenen Zuckers für die N-glykosidischen Bindungen sind.

a) Aspezifische Behandlung mit TFMS

[0119] Die Analyse mittels Immun-Blot nach PAGE-SDS (7,5%) eines mit TFMS behandelten Antigenextrakts und eines in Wasser inkubierten Extrakts zeigt, daß die Antigenproteine eine leichte Verringerung der Molmasse in Bezug auf die Vergleichskurve zeigen. So gering diese Differenz von ungefähr 10 bis 20 kD auch ist, sie wird für sämtliche Bedingungen der Behandlung beobachtet und in zwei verschiedenen Experimenten gefunden. Die Immun-Blotanalyse nach IEF der Proteine des Extrakts vom ösophagen Epithel der Ratte, behandelt mit TFMS, zeigt, daß die spezifische Immunoreaktivität der Sera von an RP erkrankten Patienten auf die Vergleichsproben sich auf eine Zone des pHi von ungefähr 5,2 bis 7,5 verteilt.

[0120] Nach Behandlung mit TFMS zeigten die mit den Seren der an RP erkrankten Patienten immunodetektierten Proteine pHi Werte, die basischer waren und zwischen 6 und 8 liegen.

[0121] Diese Veränderung des pHi und der Molmasse der Antigenproteine begünstigt eine Glykansubstitution der Moleküle. Dennoch suggeriert die Persistenz einer schlechten Definition in PAGE-SDS und eine große Palette an pHi in IEF, das die Antigenproteine auch von anderen, nicht glykosidischen Radikalen substituiert sein können und/oder, das die beobachteten Effekte aufgrund der Spaltung einer besonders fragilen Peptidbindung sein können.

[0122] Allerdings ist die Konservation der Immunoreaktivität nach der Behandlung mit TFMS ein starkes Argument für die nicht glycidische Natur von dem oder den von den für die RP spezifischen Antikörpern erkannten Epitope.

b) Spezifische Behandlung mit PNGase F

[0123] Um die mit TFMS erhaltenen Resultate zu bestätigen, haben die Erfinder Deglykosylierungsexperimente mit dem Enzym PNGase F unternommen, das spezifisch die N-gebundenen Zucker entfernt.

[0124] Die Deklykosilierung mit mit PGNase F wurde an einem Antigentrockenextrakt nach Dialyse gegen Wasser und Lyophilisation durchgeführt. Die Analyse dieses Extrakts mittels Immunodetektion in PAGE-SDS und Transfer zeigte keinen Unterschied zwischen den Vergleichsantigen und dem mit PNGase F behandelten Antigen. Zwei Interpretationen dieses Resultats sind möglich.

[0125] Das Antigen ist nicht mit N-Oligosacchariden substituiert.

[0126] Die an den Asparaginresten verzweigten Oligosaccharide des Proteins haben eine originale chemische Struktur, die deren Spaltung durch PNGase F verhindert.

[0127] Dennoch erlaubt eine einzelne eindimensionale Analyse nicht die klare Bestätigung der Unempfindlichkeit gegen PNGase F der Antigenproteine, da diese sich ja teilweise überlagen, wie es die Analyse mittels zweidimensionaler Elekrtophorese zeigt.

3) Detektion der Zucker durch Lectine

[0128] Die mögliche Reaktivität des Antigens mit Weizenkeimlectin (WGA.) oder Concanavalin A (ConA) wurde mittels „Affinodetektion" auf Nitrozellulose untersucht und mit für RP Sera spezifischen Immunodetektionsprofilen verglichen.

[0129] Die Proteine des antigenen Torockenextrakts vom Ösophagus der Ratte erkannt nach PAGE-SDS oder PAGE unter nativen Bedingungen durch ein Serum eines an RP erkrankten Patienten waren verschieden von den Proteinen, die durch Lectine erkannt wurden. Dennoch suggerieren die gemeinsamen Reaktivitätszonen, insbesondere auf dem Niveau des Proteins von 210 kD in PAGE-SDS, das das WGA und das ConA einen Teil des Antigens erkennen. Die mittels Gelfiltrationschromatographie gereinigten Antigenfraktionen wurden unter den selben Bedingungen analysiert. Dieses Experiment hat bestätigt, daß die Glycoproteine vom selben Molekular-

gewicht wie bestimmte Antigenproteine von ConA erkannt wurden und das das Reaktivitätsprofil von WGA sich dem eines an RP erkrankten Patienten anzunähern scheint.

[0130] Die Affinität der Lektine gegenüber den Antigenproteinen aus dem Ösophagus der Ratte wurde durch Analyse nach IEF/PAGE-SDS des antigenen Trockenextrakts bestätigt.

[0131] Fig. 9 zeigt die Detektion der Proteine eines antigenen Trockenextrakts nach zweidimensionaler Elektrophorese (IEF, isoelektrischer Punkt 5 bis 8/PAGE-SDS 7,5%) und Transfer auf Nitrozellulose mit:
in (1): einem Serum eines an RP erkranktem Patienten, GIFOR–,
in (2, 3): Sera von an RP erkrankten Patienten, GIFOR+,
in (4): ConA,
in (5): WGA,
um die Reaktivität zu verstärken wurden drei Einlagen des Antigenextrakts auf dem IEF Gel bewirkt. Eine Fraktion des Antigens (Bande bei 210 kD und immunoreaktive Zone zwischen 90 und 130 kD) eingelagert an der Seite der Anode und dort präzipitiert, erzeugte eine Artefaktreaktivität in der Zone von sauren pHi-Werten.

[0132] Diese Untersuchung hat erlaubt zu zeigen, daß die von ConA erkannten Moleküle vom Antigen verschieden sind, daß WGA sich aber spezifisch mit den Antigenproteinen von 90 bis 130 kD und 210 kD verbindet. Die immunoreaktiven Proteine in der Form des „Kommas" verteilen sich von 120 kD bis 67 kD mit pHi-Werten von 5 bis 7,5 zeigen im Gegensatz dazu keine Reaktivität gegenüber dem WGA.

Beispiel 2 – Charakterisierung des aus menschlicher Epidermis extrahiertem Antigen

I – Material und Verfahren

A – Patienten und Sera

[0133] Die vorliegende Untersuchung hat ausgehend von 64 Sera von Patienten, die an verschiedenen, im klinischen und biologischen Plan genau charakterisierten rheumatischen Krankheiten erkrankt sind. Unter den 64 Sera stammen 45 von Patienten, die an einer RP erkrant sind, welche nach den Kriterien der „American Rheumatism Association" definiert sind. 32 Sera stammen von Gesunden Probanden, Männer und Frauen, und sind zur Kontrolle verwendet worden.

[0134] Zwei monokonale Antikörper (mAK), der eine spezifisch für menschliche Cytokeratine, genannt F12-19 (Anticytokeratin Ref. 220–81, Dept. Biosoft CLONATEC), der andere spezifisch für menschliches Filaggrin, genannt AKH-1 (Ref. Katalog BT-576, Biomedical Technologies Inc.), sind verwendet worden.

B – Extraktion von Epidermisproteinen

[0135] Nach plastischer Brust- und Bauchchirurgie oder nach Beschneidung gesammelte Hautfragmente sind bei –80°C konserviert worden. Die Epidermis wurde mechanisch von der Lederhaut nach dem von Kassis und Sondergaard beschreibenen Verfahren (ARCH. DERMATOL. RES. 273: 301–306, 1982) mit einer thermischen Behandlung bei 4°C, dann bei 57°C in einem Puffer PBS (KH_2/KH_2H-PO_4 8,5 mM, NaCl 150 mM); enthaltend 5 mM EDTA und 0,5 mM PMSF, dann mechanisch in einem Puffer Tris-HCL 40 mM pH 7,4; NaCl 150 mM, EDTA 10 mM; NP40 0,5%, nachfolgend Puffer A genannt, getrennt.

[0136] Nach 15 minütigem Zentrifugieren bei 12000 g wurde der Überstand von dem die Epidermiscytokeratine enthaltenden Satz getrennt.

[0137] Außerdem wurden andere Extraktionen nach dem selben Protokoll aber in einem Puffer Tris-HCL 20 mM pH 7,4; PMSF 0,5 mM, nachfolgend Puffer B genannt, durchgeführt.

[0138] Die verschiedenen Fraktionen sind bei –20°C konserviert worden.

C – Elektrophorese

[0139] Die Proteine der verschiedenen Fraktionen sind mittels IEF im Gleichgewicht oder vor dem Gleichgewicht (NepHGE) analysiert worden oder mittels PAGE-SDS oder PAGE unter nativen Bedingungen. Zweidimensionale Elektrophoresen sind enbenso durchgeführt worden.

[0140] Die Proteine sind teils mittels vier Volumina Ethanol oder mittels TCE bei 15% Endkonzentration präzipitiert worden, um ihre Konzentration zu erhöhen.

D – Immundetektion

[0141] Die Proteine sind nach dem von TOWBIN et al. beschreibenem Verfahren (PNAS 76: 4350–4354, 1979) auf Nitrozellulosemembranen tranferiert worden. Die Sera sind nach Inkubation der Nitrozellulosebanden in PBS, Tween-20 0,05%, auf 1/10 bis 1/100 verdünnt, verwendet worden. Die Inkubation in Gegenwart der Sera ist während einer Stunde bei 37°C fortgesetzt worden, dann 12 Stunden bei 4°C.

[0142] Die monoklonalen Antikörper AKH-1 (verdünnt auf 1/100) oder F12-19 (verdünnt auf 1/500) sind während 2 Stunden bei 37°C inkubiert worden. Nach dem Waschen sind die Nitrozellulosebanden mit sekundären Antikörpern (menschliches oder murines anti-IgG, peroxidasemarkiert) zu Tage gebracht

worden.

E – Enzymatische Behandlungen

[0143] Das konzentrierte Epidermisextrakt (80 g/l) wurde mittels Proteinase K (1 mg/ml, 30 Minuten, 37°C in Gegenwart von 1% SDS) oder mit Mikrokoknuklease (100 U/ml, 30 Minuten, 37°C in einem Puffer Tris-HCl 30 mM, $CaCl_2$ 5 mM, pH 8) behandelt.

F – Immunpäzipitation

[0144] Das auf Protein A-Sepharose vorabsorbierte Epidermisextrakt wurde während zwei Stunden bei 37°C in Gegenwart der Antikörper AKH-1 oder F12-19 und NaCl, 1 M Entkonzentration, inkubiert.

[0145] Die gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe sind dann mittels Protein A-Sepharose aufgenommen worden und dann mitels Immun-Blot nach PAGE-SDS analysiert worden.

G – Reinigung der Cytokeratine

[0146] Die ureolöslichen Cytokeratine sind ausgehend von Brustepidermis nach dem von T. T. SUN et H. GREEN (J. Biol. Chem. 252: 2053–2060, 1978) beschreibenen Verfahren gereinigt worden.

H – Reinigung des Humanfilaggrins

[0147] Das Filaggrin wurde aus Brusthaut nach dem von LYNLEY et DALE (B. B. A 774: 28–35, 1983) beschreibenen Verfahren mit den nachfolgenden Modifikationen extrahiert: das Epidermisextrakt in 6 M Harnstoff, hergestellt in Abwesenheit eines Reduktionsmittels, wurde mittels HPLC mit einem Anionenaustauscherharz gereinigt. Die nicht zurückgehaltenen Rationischen Proteine wurden mit 4 Volumina Aceton präzipitiert, in einem kleinen Volumen Puffer, enthaltend 1,5% SDS und 2,5% 2-ME, wieder aufgelöst und oben auf ein präparatives PAGE-SDS-Gel von 10 cm Höhe aufgebracht. Dieses Gel wurde dann auf eine Membran vom Typ Immobilon(R)-PVDF transferiert, daß von der Firma MILLIPORE vertrieben wird. Die dem Filaggrin entsprechende Zone wurde mittels Immunodetektion mit dem Antikörper AKH-1 gefunden und ausgeschnitten; das Filaggrin wurde dann mit 0,3 ml/cm^2 eines Elutionspuffers (Tris-HCL 50 mM pH 8,8; SDS 2%; Triton X-100 1%) eluiert und mittels Präzipitation konzentriert.

I – Reinigung des Antigens

[0148] 20 cm^2 Brustepidermis wurde mit einem elektrischen Zerkleinerer in dem Puffer A zerkleinert. Das Homogenisat wurde während 15 Minuten bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand mit TCE (15% Endkonzentration) präzipitiert. Das Präzipitat wurde in einem kleinen Volumen Tris-HCL 30 mM pH 8 m $CaCl_2$ 5 mM wieder aufgelöst; die lösliche Fraktion wurde mittels Zentrifugieren geklärt, es wurden 1,5% SDS und 2,5% ME zugegeben, und oben auf ein präparatives SDS-Gel von 10 cm Höhe aufgebracht. Das Antigen wurde dann mittels eluieren wie zuvor für das Filaggrin beschrieben gereinigt, wobei die den Antigen entsprechende Zone mittels Immunodetektion mit einem RP-Serum gefunden wurde.

II – Resultate

A – physicochemische und biochemische Charakterisierung des Antigens

[0149] Um das durch die RP-Sera erkannte Antigen zu charakterisieren, wurde ein Extrakt der Brustepidermis mittels Homogenisieren derselben in Puffer A in Gegenwart eines nichtionischen Detergenz (NP40) hergestellt. Dieser lösliche Extrakt wurde mittels Immunodetektion nach PAGE und Transfer der Proteine auf Nitrozellulose analysiert.

[0150] Fig. 10 zeigt die Immun-Blotanalyse des vorhergehenden NP40 Extrakts mit den RP-Sera und den Kontrollsera. Das NP40 Extrakt (8 mg/ml) wurde mittels TCE präzipitiert, in einem Puffer Tris-$CaCl_2$ aufgenommen und 7 mal konzentriert, dann mittels Immun-Blot nach PAGE-SDS (Gradient 8–25%) analysiert. Die Sera waren auf 1/10 in PBS-Tween 20 bei 0,05% verdünnt. Die Sera 1 und 3 stammen von Patienten, die an malignem Myelom erkrankt sind, das Serum 2 stammt von einem Patienten, der an dem SHARP-Syndrom erkrankt ist, Serum 4 stammt von einem Patienten der an Arthrose erkrankt ist, Serum 5 stammt von einem Patienten, der an Polymyositis erkrankt ist, Serum 6 stammt von einem Patienten, der am PAGET-Syndrom erkrankt ist, die Sera 7 bis 21 stammen von Patienten, die an RP erkrankt sind, und die Sera 22 bis 38 stammen von gesunden Probanden; „T^0" ist eine negative Vergleichsprobe, die nur mit dem markierten menschlichen anti-Ig Antikörper inkubiert wurde.

[0151] Der größte Teil der Sera von Patienten, die an RP erkrankt waren (80%), wurden von einem Protein erkannt, das bei der PAGE-SDS ein Molekulargewicht von ungefähr 40 kD zeigte. Seine Wanderung wurde durch Fortlassen des Reduktionsmittels (2-ME) in dem Probenpuffer ficht verändert, was darauf hinweist, daß das Molekül wahrscheinlich keine Disulfidbrücke enthält. Im Gegenteil, 89% der Sera von Patienten, die an einer nichtrheumatischen Rheumakrankheit erkrankt sind und jedes der Kontrollsera wurden durch dieses Antigen nicht erkannt. Ein Protein von 68 kD wurde nicht spezifisch von einem großen Anteil von Sera detektiert, die zu sämtlichen untersuchten Gruppen gehörten und somit sehr wahrscheinlich zu den natürlichen Antikörpern.

[0152] Fig. 11 zeigt die Immun-Blotanalyse des vor-

hergehenden NP40 Antigenextrakts, behandelt oder nicht mit einer Nuklease (1) oder einer Protease (2). In (1) wurde das NP40 Extrakt der Brustepidermis mittels TCE präzipitiert, wiederaufgenommen in einen Puffer Tris-$CaCl_2$, dann mit (+) oder ohne (–) Mikrokalnuklease (100 U/ml) während 30 Minuten bei 37°C behandelt. In (2) wurde ein zu dem vorhergehenden identischer NP40 Extrakt von menschlicher Epidermis mit TCE präzipitiert, dann wiederaufgenommen in 1% SDS und ohne (–) oder mit (+) 10 mg/ml Proteinase K während 10 Minuten bei 37°C behandelt. In allen Fällen wurden die Proteine mit PAGE-SDS (8–25%) getrennt, transferiert, dann mit den Kontrollsera (a) und den Sera der an RP erkrankten Patienten (b), verdünnt auf 1/100, einer Immunodetektion unterzogen. Das Verschwinden der immoreaktiven Region nach einer Behandlung des Extrakts mit Proteinase K bestätigt die Proteinnatur des Trägermoleküls von dem oder den durch die Antikörper erkannten Epitope, während diese Region nach einem Aufschluß der Nukleinsäuren mittels Mikrokoknuklease nicht verändert war.

[0153] Fig. 12 zeigt die Analyse des Antigens mittels Elektrophorese unter nativen Bedingungen; diese Analyse bestand aus dem Präzipitieren des NP40 Extrakts der menschlichen Epidermis mittels Ethanol, dann Durchführen einer Immunodetektion nach PAGE unter nativen Bedingungen (8–25%) und Transfer auf Nitrozellulose mit den Sera der an RP erkrankten Patienten (Banden 1–4 und 8–9) und den Vergleichssera (Banden 4–7), verdünnt auf 1/100. Das menschliche Antigen trennt sich in mehrere Antigenproteine, deren Wanderung ähnlich der der Vergleichsporben sind, deren Molekulargewichte im Bereich zwischen 80 und 400 kD liegen, wobei sich die immunoreaktiveren Proteine in den Zonen ansammeln, die zwischen 80 und 120 kD liegen.

[0154] Fig. 13 zeigt die Analyse des Antigens mittels IEF. Die Proteine des NP40 Extrakts der Brustepidermis sind mit Ethanol präzipitiert worden, mit IEF (pHi 3 bis 9) getrennt, auf Nitrozellulose tranferiert, dann mit den Sera von Patienten, die an RP erkrankt sind (Banden 5–12), und Vergleichsseren (Banden 1–4), verdünnt auf 1/100, einer Immunodetektion unterzogen. Das menschliche Antigen zeigt eine sehr heterogene Verteilung des pHi, die von 5,8 bis 7,4 variiert. Diese Heterogenität des pHi wurde mittels zweidimensionaler Elektrophorese (IEF PAGE-SDS) bestätigt. Das spezifisch von dem Sera der Patienten, die an RP erkrankt sind, erkannte Protein, nach Transfer von einem solchen Gel, zeigt ein charakteristisches Bild in Form eines „Kommas", wobei die Molekulargewichte nach und nach abnehmen, wenn der pHi basischer wird.

[0155] Fig. 14 zeigt die Analyse des Antigens in einem zweidimensionalen IEF PAGE-SDS Gel; die Proteine des NP40 Extrakts der Brustepidermis wurden mittels Ethanol präzipitiert, mittels IEF (pHi 5 bis 8) gefolgt von PAGE-SDS (12,5%) getrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem Serum von Patienten, die an RP erkant sind, und einem Kontrollserum einer Immunodetektion unterzogen.

[0156] Die deutliche Heterogenität des Anitgens, in der Masse wie beim pHi-Wert, zeigt wahrscheinlich die Gegenwart modifizierter Isoformen; sie suggeriert, daß sie glycosyliert und/oder phosphoryliert sind. Dennoch hat eine Behandlung mit dem Peptid N-Glycosidase-F weder seine Wanderung noch seine Immunoreaktivität nach PAGE-SDS verändert.

B – Wasserlöslichkeit des Antigens

[0157] 5 cm^2 der Brustepidermis wurden mechanisch in dem Puffer A oder dem Puffer B zerkleinert. Die Homogenisate wurden dann 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert und eine gleiche Menge der löslichen Proteine der beiden Überstände wurden mit Ethanol präzipitiert, dann mittels PAGE unter nativen Bedingungen (8–25%) getrennt, auf Nitrozellulose transferiert, dann mit den Sera von Patienten, die an RP erkrankt sind, und den Kontrollseren einer Immunodetektion unterzogen. Diese Untersuchung weist darauf hin, daß das Antigen nicht nur in Gegenwart eines Detergenz (Puffer A) extrahiert wird, sondern ebenso in seiner Abwesenheit (Puffer B). Außerdem wird das Antigen immer hauptsächlich in den löslichen Fraktionen gefunden und zeigt in den Rückständen eine sehr geringe Menge. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß das menschliche Antigen, wie das aus dem Ösophagus der Ratte, ein sehr wasserlösliches Molekül ist.

C – Expression des Antigens in unterschiedlichen anatomischen Gebieten der Epidermis

[0158] Die Analyse der Proteine eines NP40 Extrakts von Bauchepidermis und von Vorhautepidermis mittels Immun-Blot weist darauf hin, daß das mit RP in Verbindung stehende Antigen in der menschlichen Epidermis unabhängig vom Geschlecht und anatomischen Gebiet (Brust, Bauch oder Vorhaut) vorliegt, sowie vom Alter (Kinder und Erwachsene). Das Antigen ist histologisch in dem Stratum Corneum lokalisiert, wobei es legitim ist zu denken, daß seine Verteilung von der Dicke desselben abhängt, die entsprechend dem anatomischen Gebiet variiert.

D – Die Identifikation des Antigens

[0159] Das durch die Sera der an RP Erkrankten ist kein Cytokeratin der menschlichen Epidermis.

[0160] Fig. 15 zeigt:

(a): einen NP40 Extrakt von Brustepidermis, der einer Immunodetektion unterzogen wurde, nach PAGE-SDS (8–25%) und Transfer auf Nitrozellu-

lose, mit einem Serum eines an RP erkrankten Patienten, vorinkubiert zum einen Teil mit dem Extraktionspuffer (Bande 1), mit dem Extrakt selbst (Bande 2) und mit einer mit Epidermiscytokeratinen angereicherten unlöslichen Fraktion (Bande 3).
(b): die unlöslichen Cytokeratine, die einer Immunodetektion unterzogen worden sind, nach PAGE-SDS (8–25%) und Transfer, mit dem mAK anti-Cytokeratin F12-19 vorinkubiert, mit dem Extraktionspuffer (Bande 1), mit dem Epidermisextrakt (Bande 2), mit einer an Cytokeratinen angereicherten unlöslichen Fraktion (Bande 3) oder mit den ureolöslichen Cytokeratinen (Bande 4).
c): die Proteine des Epidermisextrakts (Bande 5), die mit Cytokeratinen angereicherte Fraktion (Bande 6) und die reinen ureolöslichen Cytokeratine (Bande 7), wurden getrennt mittels PAGE-SDS (8–25%), transferiert und mit dem mAK Anti-Cytokeratin F12-19 einer Immunodetektion unterzogen.

[0161] Die Immunoreaktivität der Sera von Patienten, die an RP erkrankt sind, wurde nicht durch eine Vorinkubation derselben mit den Epidermiscytokeratinen (angereichert oder gereinigt) inhibiert, folglich sind sie in Gegenwart des wasserlöslichen Extrakts der Haut verschwunden. Gleicherweise hat der monoklonale Antikörper F12-19 im Immun-Blot kein Protein des extrahierten Antigens erkannt.

[0162] Die charakteristische Form des Antigens im zweidimensionalen Gel und sein Molekulargewicht in PAGE-SDS sind denen des Filagrins benachbart, ein Protein, das in dem Stratum granulosum im Verlauf der Differenziation der Epidermis erscheint (SARRET et al., Path. Biol. 37: 297–303, 1989). Die Erfinder haben daher versucht zu bestimmen, ob das Filagrin und das erfindungsgemäße Antigen identisch sind, und ob die Sera der an RP erkrankten Antifilaggrin Autoantikörper enthält.

[0163] Fig. 16 zeigt eine Immun-Blotanalyse von Proteinen eines Extrakts von Brustepidermis, getrennt mit (A) PAGE-SDS (12,5%), (B) PAGE unter nativen Bedingungen und (C) IEF (pHi 3 bis 9), dann auf Nitrozellulose transferiert und mit den Seren von an RP erkrankten Patienten einer Immunodetektion unterzogen (Banden 1, 3, 6, 7 und 8), mAK Antifilaggrin AKH-1 (Bande 2), ein Kontroll-mAK (Bande 4) und ein Kontrollserum (Bande 5). Diese Proteine wurden getrennt in Triplica (D) mittels NEpHGE, gefolgt von PAGE-SDS (8–25%), dann auf Nitrozellulose transferiert und mit Ponceaurot gefärbt (a) oder mit monoklonalen Antikörpern AKH-1 einer Immunodetektion unterzogen (b), und mit einem an RP erkrankten Patienten (c). Das Antigen ist an seiner charakteristischen Form als „Komma" erkennbar.

[0164] Der monoklonale Antikörper gegen menschliches Filagrin, AKH-1, erkennt im Immun-Blot menschliches Epidermisprotein spezifisch, das in Gegenwart von NP40 löslich ist und dieselben Wanderungsmerkmale unter denaturierenden oder nativen Bedingungen der Elektrophorese zeigt, wie das Antigen der RP. Nach IEF und zweidimensionalem Gel zeigen das Antigen und das im Immun-Blot mittels AKH-1 erkannte Protein ein identisches Bild.

[0165] Die Erfinder haben dann versucht zu bestimmen, ob der monoklonale Antikörper AKH-1 das Antigen aus dem Epidermisextrakt in NP40 immunopräzipitieren kann.

[0166] Fig. 17 zeigt die Vegleichsanalyse von Proteinen eines NP40 Extrakts der Epidermis, voradsorbiert auf Protein A-Sepharose, wobei die Proteine mittels PAGE-SDS (12,5%) vor der Immunopräzipitation mit dem mAK AKH-1 (wiedergegeben mit „Gesamt" in Fig. 17) oder nach Immunopräzipitation mit dem mAK AKH-1 (wiedergegeben durch „IP AKH-1" in Fig. 17), oder mit dem Kontroll-mAK G36 (wiedergegeben durch „IP G36" in Fig. 17) getrennt worden. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose wurden diese Proteine mit den Antikörpern AKH1-, G36, einem Serum eines Patienten, der an RP erkrankt ist (RP), einem Kontrollserum (CO) oder nur mit den sekundären Maus anti-Ig (T_0S) und menschlichem anti-Ig (T_0h) einer Immunodetektion unterzogen. Die in den Überständen vorliegenden Proteine der mit G36 immunopräzipitierten Fraktionen (wiedergegeben durch „Surn G36" in Fig. 17) und AKH-1 (wiedergegeben durch „Surn AKH-1" in Fig. 17) wurden auf dieselbe Weise nach Präzipitation mit TCE analysiert.

[0167] Die Ergebnisse zeigen, daß AKH-1 ein Epidermisprotein desselben Molekulargewichts wie des Antigens von RP immunopräzipitiert, wobei dieses Molekül woanders spezifisch im Immun-Blot durch die Sera von Patienten, die an RP erkrankt sind, erkannt wurde. Diese Immunopräzipitation wurde in Gegenwart von NaCl 1 M durchgeführt, was eine Co-Immunopräzipitation aufgrund einer Assoziation zwischen den beiden Proteinen (Filagrin und Antigen) wenig wahrscheinlich macht. Um zu verifizieren, daß die durch AKH-1 und den Sera von Patienten, die an RP erkrankt sind, erkannten Proteine des Extrakts dieselben sind, wurden die Überstände einer Immunopräzipitation mittels anti-Filaggrin mAK nachfolgend durch Immun-Blot mit einem Serum von Patienten, die an RP erkrankt sind, analysiert. Fig. 17 zeigt, daß der Extrakt des Antigens und des Filaggrins durch anti-Filaggrin mAK abgebaut wurde (teilweise oder vollständig). Hingegen haben die Sera von Patienten, die an RP erkrankt sind, das Antigen nicht immunopräzipitiert. Dieses negative Resultat kann in einer geringen Affinität der Autoantikörper zum Antigen gegründet sein, in einer zu geringen Menge von Autoantikörpern in dem Serum oder durch eine Nichterkennung des Antigens durch diese

in seiner nativen Form. Diese letzte Hypothese ist wenig wahrscheinlich, da das Antigen ja auf Nitrozellulose nach Elektrophorese unter nativen Bedingungen mittels Immunodetektion nachweisbar ist.

[0168] Um zu bestätigen, daß das Filaggrin und das Antigen der RP wenigstens ein vom mAK AKH-1 erkanntes, gemeinsames Epitop besitzen, wurde das Antigen durch Eluieren einer Transfermembran gereinigt. Fig. 18 zeigt die Analyse mittels PAGE-SDS und Immun-Blot der Proteine der verschiedenen Fraktionen im Verlauf der Reinigung. Die gesamten Proteine eines Extrakts von menschlicher Epidermis (Bande 1), die löslichen Proteine nach Präzipitation des Extrakts mit TCE (Bande 2) und die der endgültig gereinigte Antigenfraktion (Bande 3) wurden mittels PAGE-SDS (12,5%) getrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Amidoschwarz (Amido) gefärbt oder mit einem Serum vom Patienten, die an RP erkrankt sind (RP) einem Kontrollserumn (CO), einem anti-Filaggrin mAK (AKH-1) und einem Kontroll-mAK (G36) einer Immunodetektion unterzogen worden.

[0169] Die nach Präzipitation in TCE löslichen Hauptproteine erscheinen in Form eines Dublets mit einem Molekulargewicht (PM) von ungefähr 40 kD. Dieses Dublet ist die wesentliche immunoreaktive Bande, die von einem Serum von Patienten, die an RP erkrankt sind, erkannt wird. Dieses Protein ist dann von einem präparativen PAGE-SDS Gel per Transfer und nachfolgender Elution gereinigt worden. Das Antigen der RP ist nach PAGE-SDS durch den anti-Filaggrin mAK AKH-1 spezifisch in einer Immunodetektion nachgewiesen worden.

[0170] Zum Verifizieren, ob die Seren der Patienten, die an RP erkrankt sind, menschliches Filaggrin ebenso erkennen und diese dem Antigen doch begrenzt ähneln, haben die Erfinder das Filaggrin nach dem von LINLEY et DALE (BBA 744: 28–35m 1983) beschriebenen Verfahren gereinigt. Fig. 19 zeigt die Analyse des gereinigten menschlichen Filaggrins mittels PAGE-SDS (12,5%), transferiert auf Nitrozellulose und mit den Sera von Patienten, die an RP erkrankt sind (Banden 1–4), einem Kontrollserum (Bande 5), einem mAK (Bande 6) und dem mAK AKH-1 (Bande 7) einer Immundetektion unterzogen worden sind, oder mit Ponceaurot gefärbt (Bande 8). Fig. 19 zeigt, daß die Sera von Patienten, die an RP erkrankt sind, das menschliche Filaggrin spezifisch erkennen.

Patentansprüche

1. Wasserlösliches Antigen, welches durch Autoantikörper erkannt wird, die spezifisch in an rheumatoider Polyarthritis (RP) erkrankten Patienten vorliegen, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Antigen antigene Kreuzreaktionen mit menschlichem Filaggrin oder Profilaggrin zeigt und dass es ausgewählt ist aus:

a) einem vom Ösophagusepithel der Ratte erhältlichen Eiweißartigen mit folgenden Eigenschaften:
– das Antigen trennt sich nach einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophrese in zwei Antigenfraktionen;
i) eine Fraktion mit einem mittleren Molekulargewicht von ungefähr 210 kD;
ii) eine Fraktion mit einem mittleren Molekulargewicht von ungefähr 90 bis ungefähr 130 kD;
– das Antigen trennt sich nach einer Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen in drei Antigenfraktionen:
iii) eine Fraktion, die mit der Geschwindigkeit von Pferdeferritin wandert (Molekulargewicht: 440 kD);
iv) eine Fraktion, die mit der Geschwindigkeit von Rinderleberkatalase wandert (Molekulargewicht: 232 kD);
v) eine Fraktion, die mit einer Geschwindigkeit zwischen der von Rinderherzlacticodehydrogenase und der von bovinem Serumalbumin wandert (jeweiliges Molekulargewicht: 140 kD und 67 kD);
– das Antigen trennt sich nach einer zweidimensionalen Elektrophorese mittels isoelektrischer Fokussierung, gefolgt von einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in drei Antigenfraktionen:
vi) eine Fraktion, deren mittleres Molekulargewicht ungefähr 210 kD ist und deren pHi von ungefähr 5,85 bis ungefähr 6,85 ist;
vii) eine Fraktion, deren mittleres Molekulargewicht von ungefähr 130 bis ungefähr 90 kD ist und dessen pHi von ungefähr 5,85 bis ungefähr 7,35 ist;
viii) eine Fraktion, deren mittleres Molekulargewicht von ungefähr 120 bis ungefähr 67 kD ist und deren pHi von ungefähr 5 bis ungefähr 7,5 ist;
b) einer beliebigen der Fraktionen i) bis viii) des oben definierten Antigens a);
c) einem aus der menschlichen Epidermis erhältlichen Eiweisantigen, welches nach einer zweidimensionalen Elektrophorese mittels isoelektrischer Fokussierung, gefolgt von einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ein mittleres Molekulargewicht von ungefähr 40 kD zeigt und dessen pHi von ungefähr 5,8 bis ungefähr 7,4 ist.

2. Verwendung eines Antigens ausgewählt aus:
– einem Antigen nach Anspruch 1;
– menschlichem Filaggrin oder Profilaggrin;
zur in vitro Diagnose von rheumatoider Polyarthritis.

3. Verfahren zur in vitro Diagnose von rheumatoider Polyarthritis in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, dass es wenigstens einen der folgenden Verfahrensschritte aufweist:
Kontaktieren der biologischen Probe mit wenigstens einem Antigen nach Anspruch 1 oder einer Zubereitung von menschlichem Filaggrin oder Profilaggrin, wobei das Filaggrin oder Profilaggrin optional markiert ist, oder ferner deren Konjugat mit einem Trägermolekül, unter Bedingungen, welche die Bildung eines immunologischen Komplexes mit den Autoantikörpern erlauben, die für eine eventuell in der Probe

vorliegende RP spezifisch sind;
Nachweis des genannten immunologischen Komplexes.

4. Set zur in vitro Diagnose von rheumatoider Polyarthritis in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, dass das Set umfasst:
wenigstens ein Antigen nach Anspruch 1 oder wenigstens eine Zubereitung von, optional markiertem, Filaggrin oder Profilaggrin, oder von Konjugaten, mit einem Trägermolekül;
Reagenzien zur Ausbildung eines für die immunologische Reaktion mit den möglicherweise in der biologischen Probe vorhandenen Autoantikörpern günstigen Milieus;
ein oder mehrere Reagenzien zum Nachweis des gebildeten immunologischen Komplexes;
ggf. Vergleichsproben, welche serumnegativ und/oder serumpositiv sind.

5. Verfahren zur Reinigung von Autoantikörpern, welche spezifisch bei an rheumatoider Polyarthritis erkrankten Patienten vorliegen, dadurch gekennzeichnet, dass es wenigstens die folgenden Verfahrensschritte aufweist:
Kontaktieren einer biologischen Flüssigkeit eines an rheumatoider Polyarthritis erkrankten Patienten mit wenigstens einem Antigen nach Anspruch 1 oder mit menschlichem Filaggrin oder Profilaggrin unter Bedingungen, welche die Bildung von immunologischen Komplexen mit den in der biologischen Flüssigkeit vorliegenden Autoantikörpern erlauben,
Isolierung der genannten Komplexe aus dem Reaktionsmilieu und/oder Trennung der Autoantikörper der genannten immunologischen Komplexe.

6. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, dass man als Immunogen wenigstens ein Antigen nach Anspruch 1 verwendet.

7. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, dass man als Immunisierungsantigen menschliches Filaggrin oder Profilaggrin verwendet und dass die wiedererkannten Antikörper gesammelt werden, die gleichermaßen ein Antigen des Ösophagusepithels der Ratte erkennen, wie in Anspruch 1 definiert ist.

8. Verfahren zur Herstellung von antiiodotypischen Antikörpern, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, dass es einen Schritt umfasst, im Verlauf dessen ein Tier mit einem nach einem Verfahren gemäß Anspruch 7 erhaltenen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper immunisiert wird.

9. Zubereitung von polyklonalen Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einem Verfahren nach Anspruch 6 erhältlich ist.

10. Antikörperzubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einem Verfahren nach Anspruch 7 erhältlich ist.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1



FIG. 2

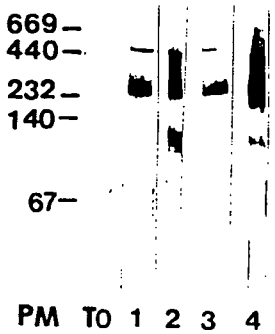


FIG. 3

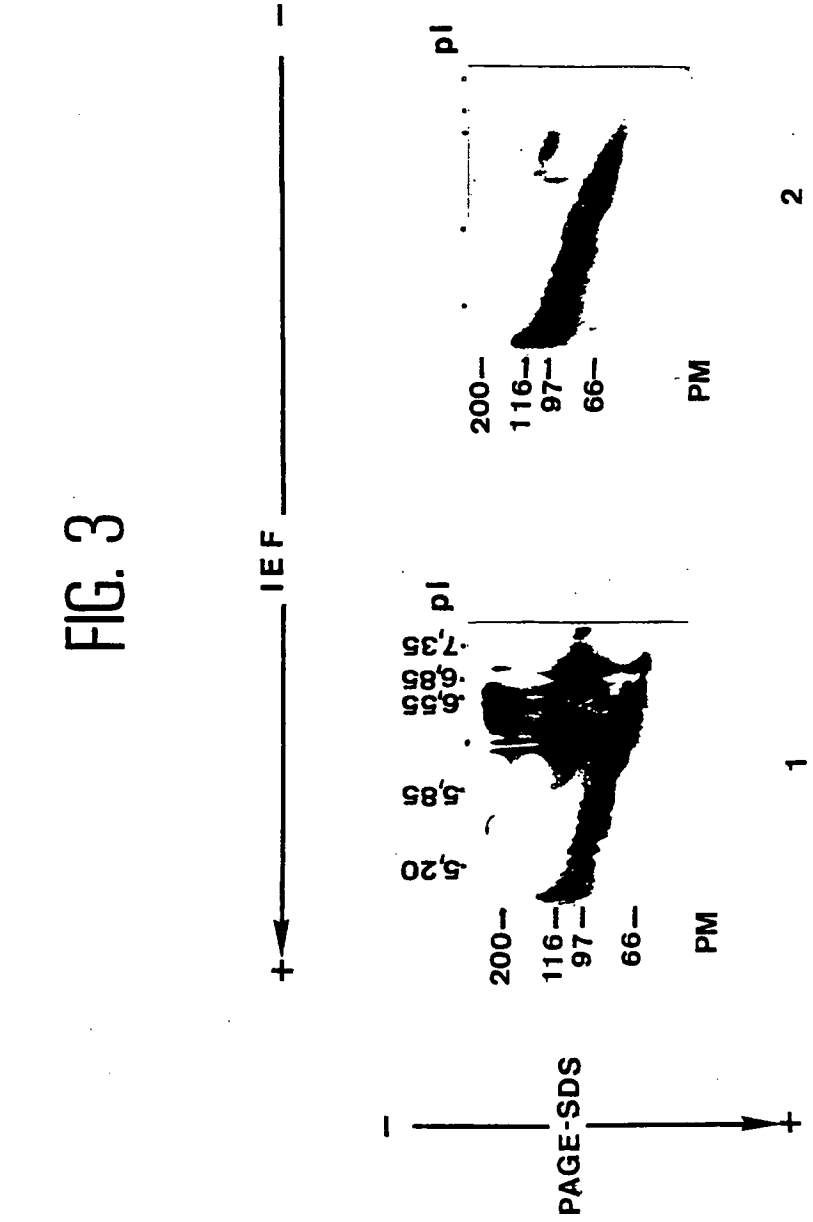


FIG. 4

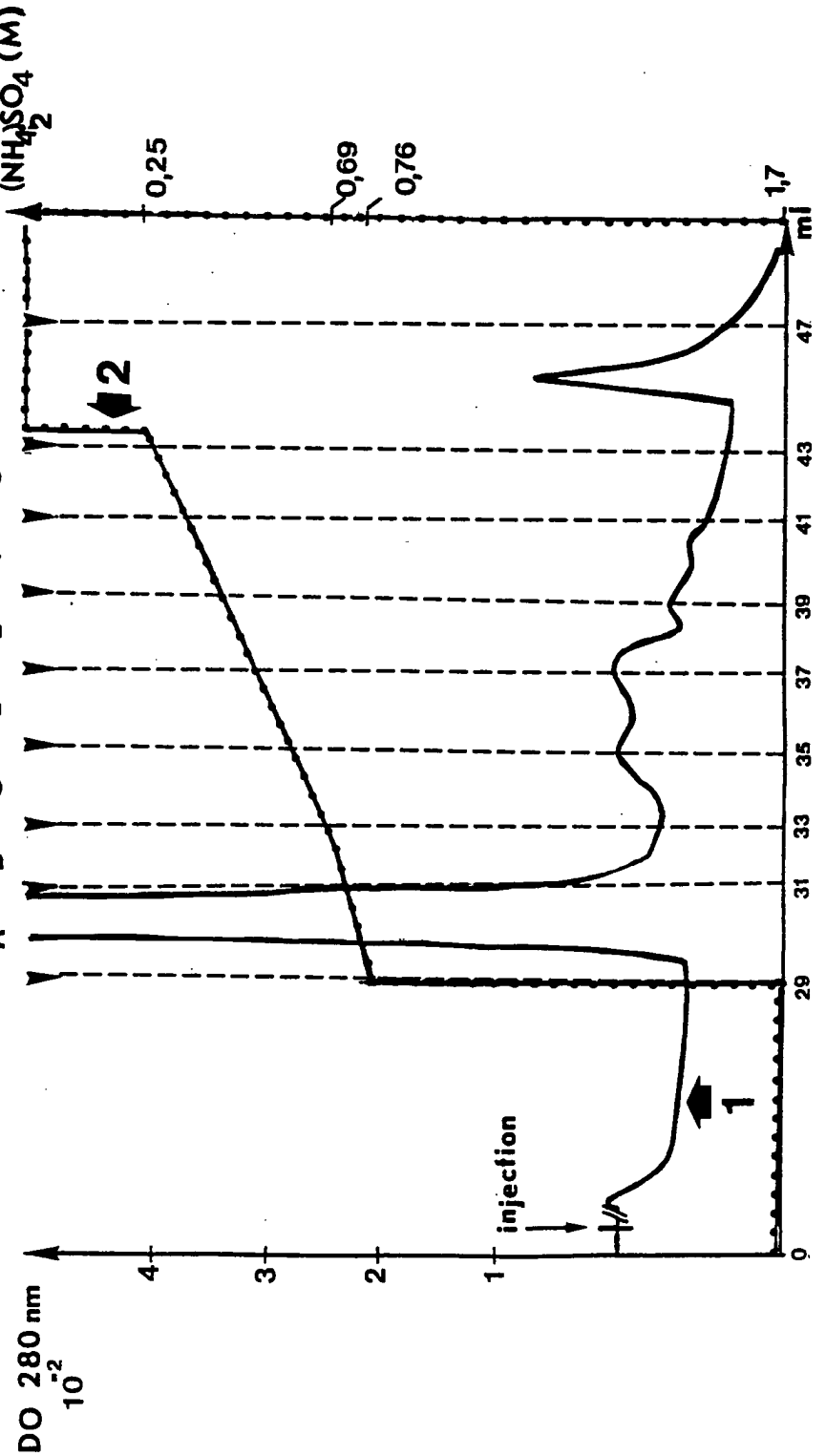

$(NH_4)_2SO_4$ (M)
0,25
0,69
0,76
1,7
ml
47
43
41
39
37
35
33
31
29
0
A
B
C
D
E
F
G
H
2
1
injection
DO 280 nm
10^{-2}
4
3
2
1

FIG. 5

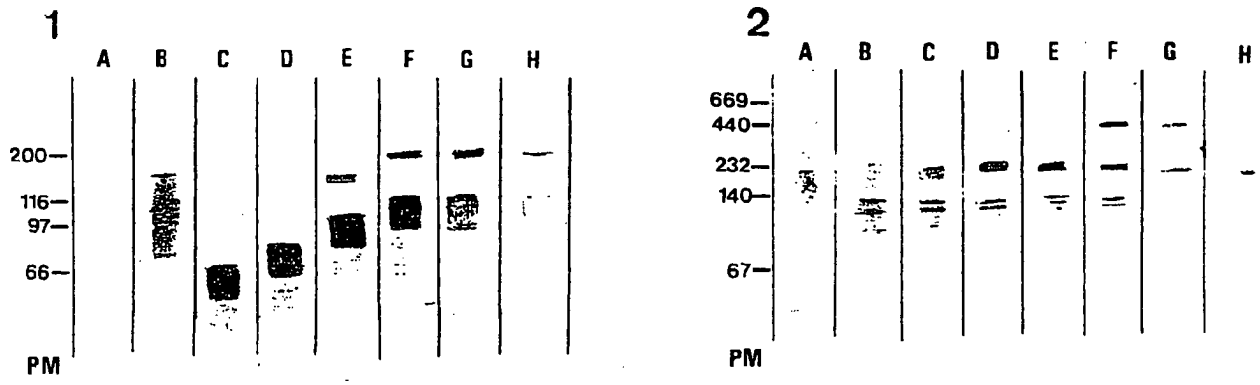
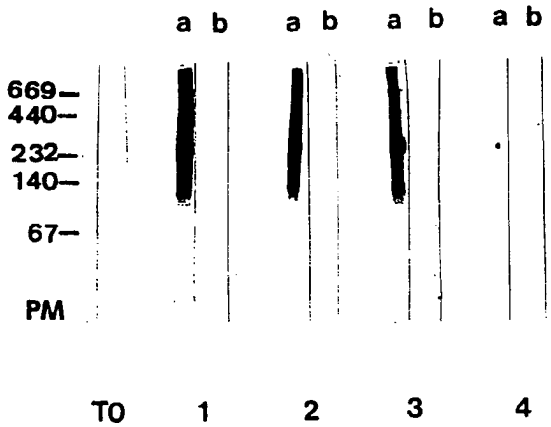

1
A B C D E F G H
200
116
97
66
PM
2
A B C D E F G H
669
440
232
140
67
PM

FIG. 6


a b a b a b a b
669
440
232
140
67
PM
TO 1 2 3 4

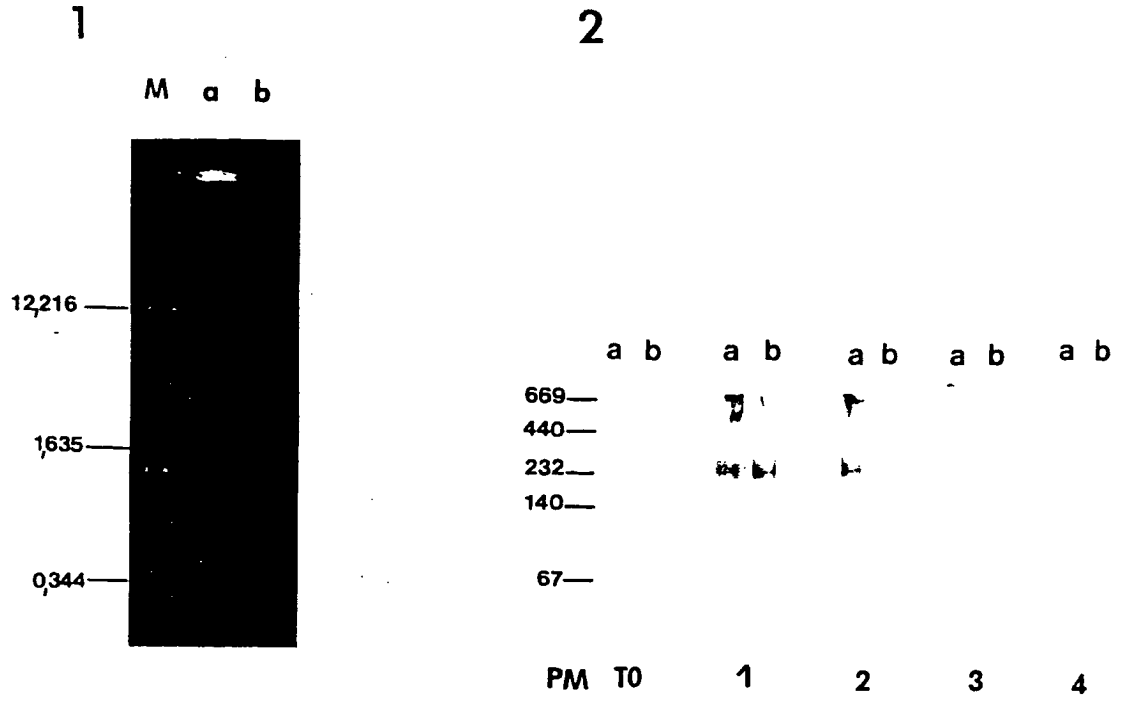

1
M a b
12,216
1,635
0,344
2
a b a b a b a b a b
669
440
232
140
67
PM T0 1 2 3 4

FIG. 7

FIG. 8

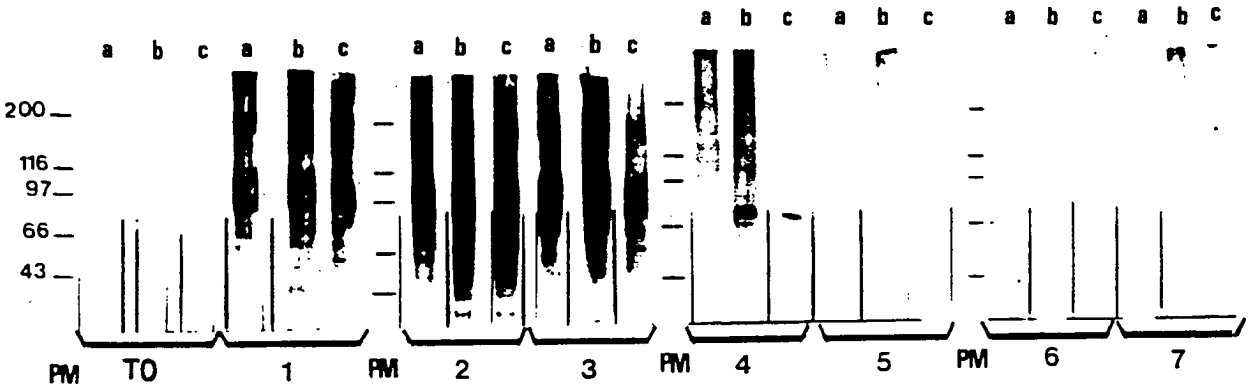

a b c a b c a b c a b c a b c a b c a b c a b c a b c
200
116
97
66
43
PM T0 1 PM 2 3 PM 4 5 PM 6 7

FIG. 9

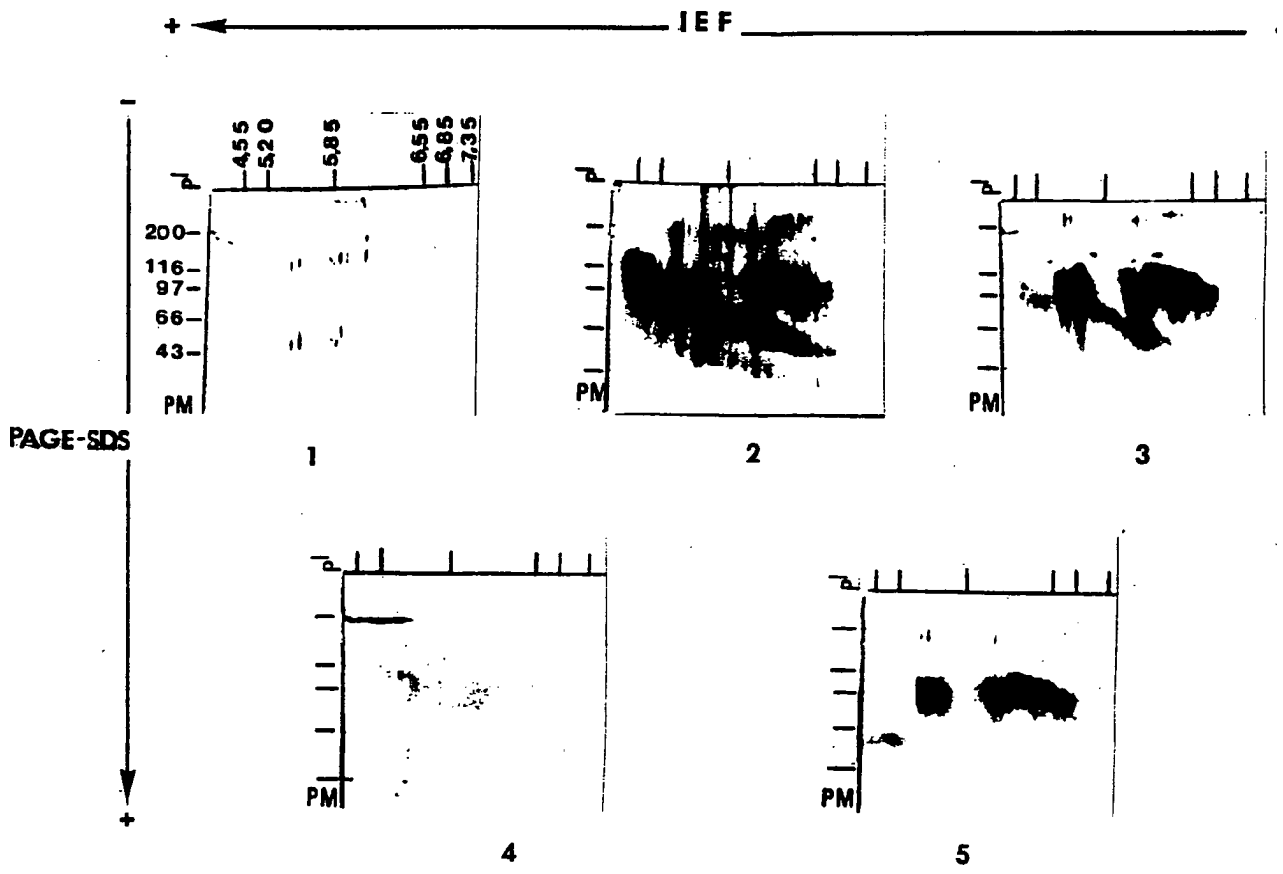
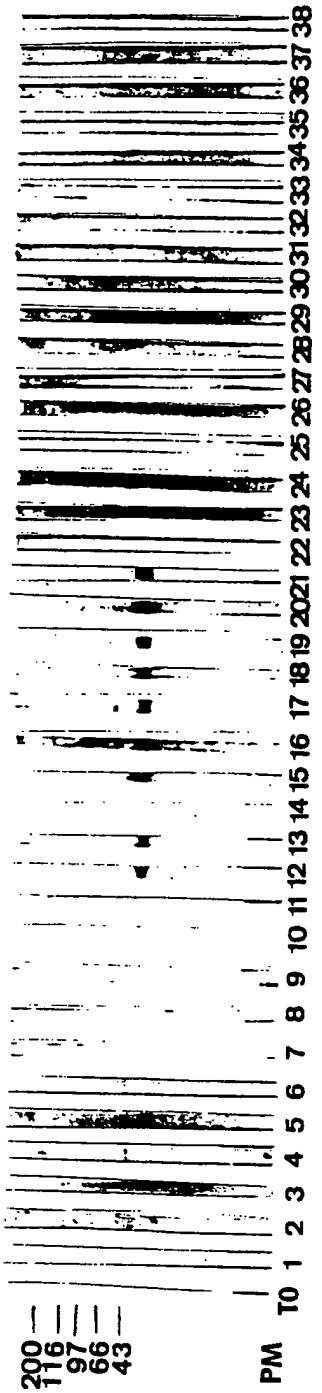


FIG. 10


200
116
97
66
43
PM
T0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38

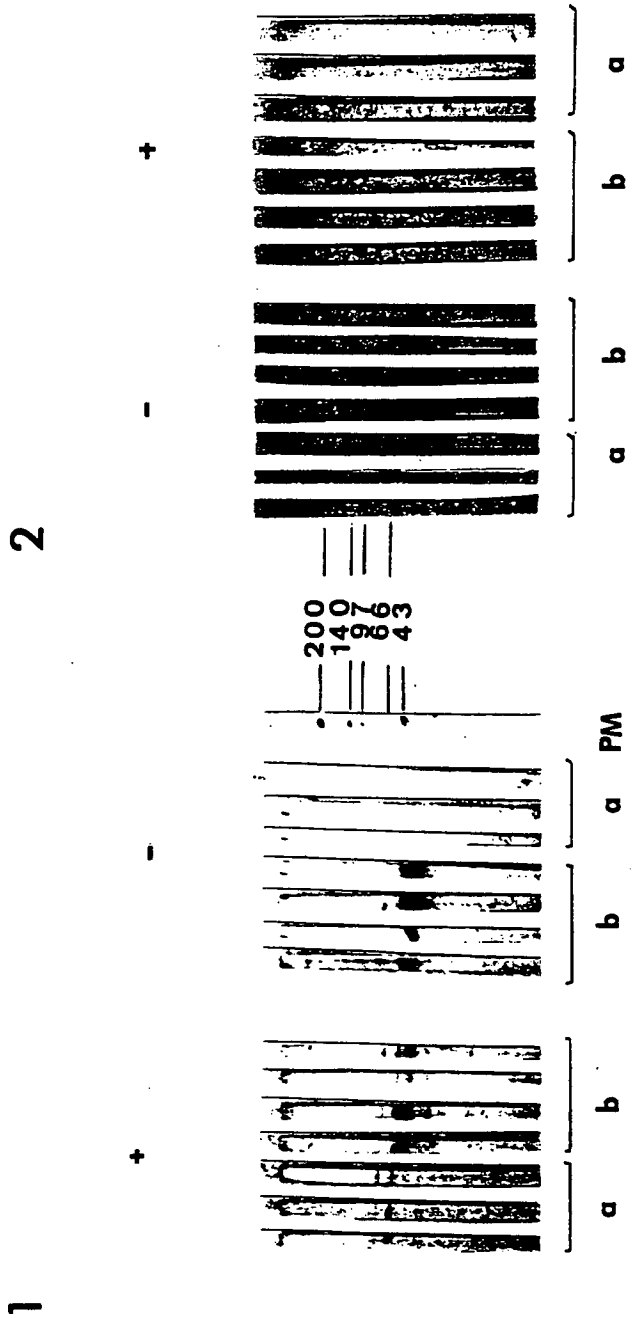


FIG. 11

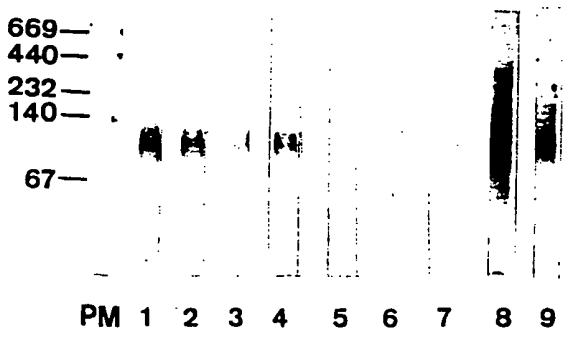


FIG. 12

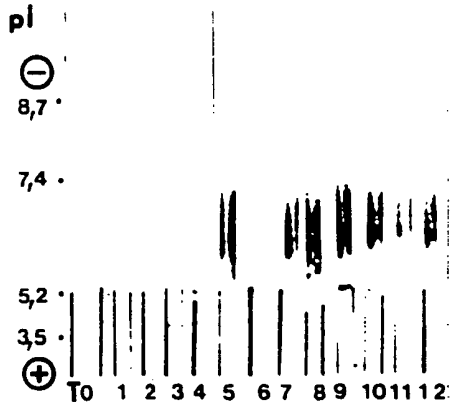


FIG. 13

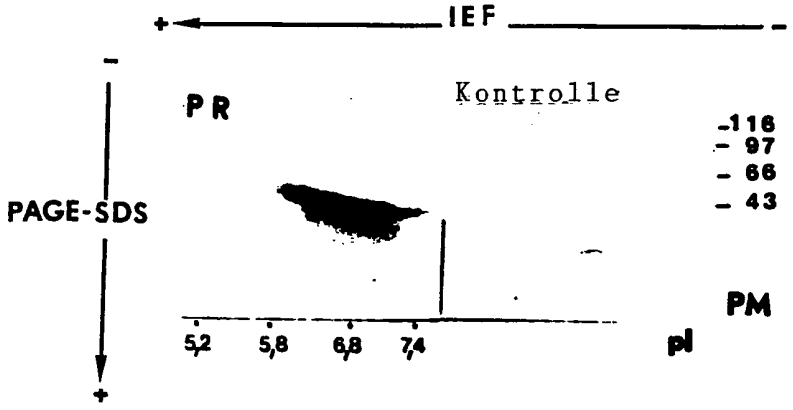


FIG. 14

FIG. 15

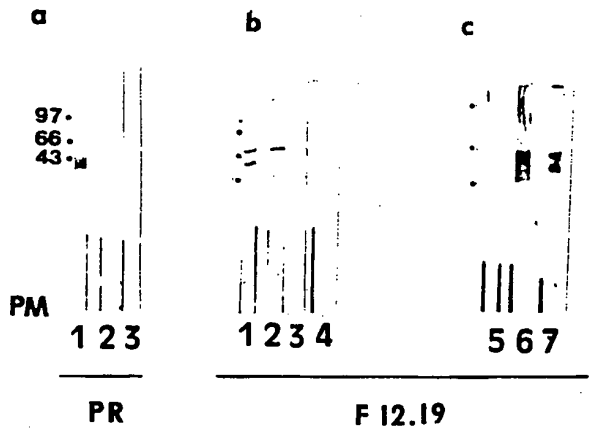

a
b
c
97.
66.
43.
PM
1 2 3
1 2 3 4
5 6 7
Serum
PR
F 12.19

FIG. 16

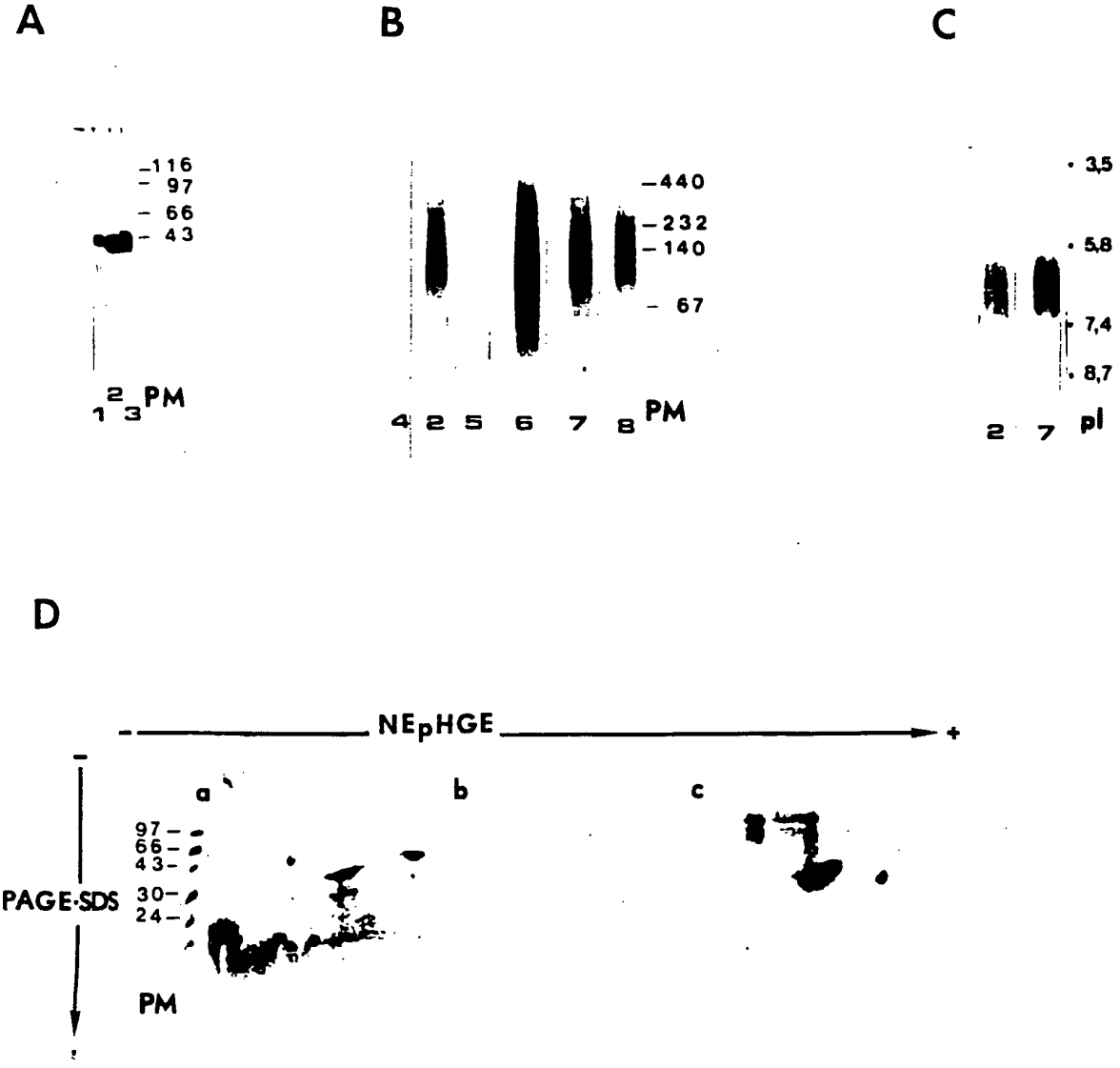

A
B
C
116
97
66
43
1 2 3 PM
440
232
140
67
4 2 5 6 7 8 PM
3,5
5,8
7,4
8,7
2 7 pI
D
NEpHGE
a
b
c
97
66
43
30
24
PAGE-SDS
PM

FIG. 17

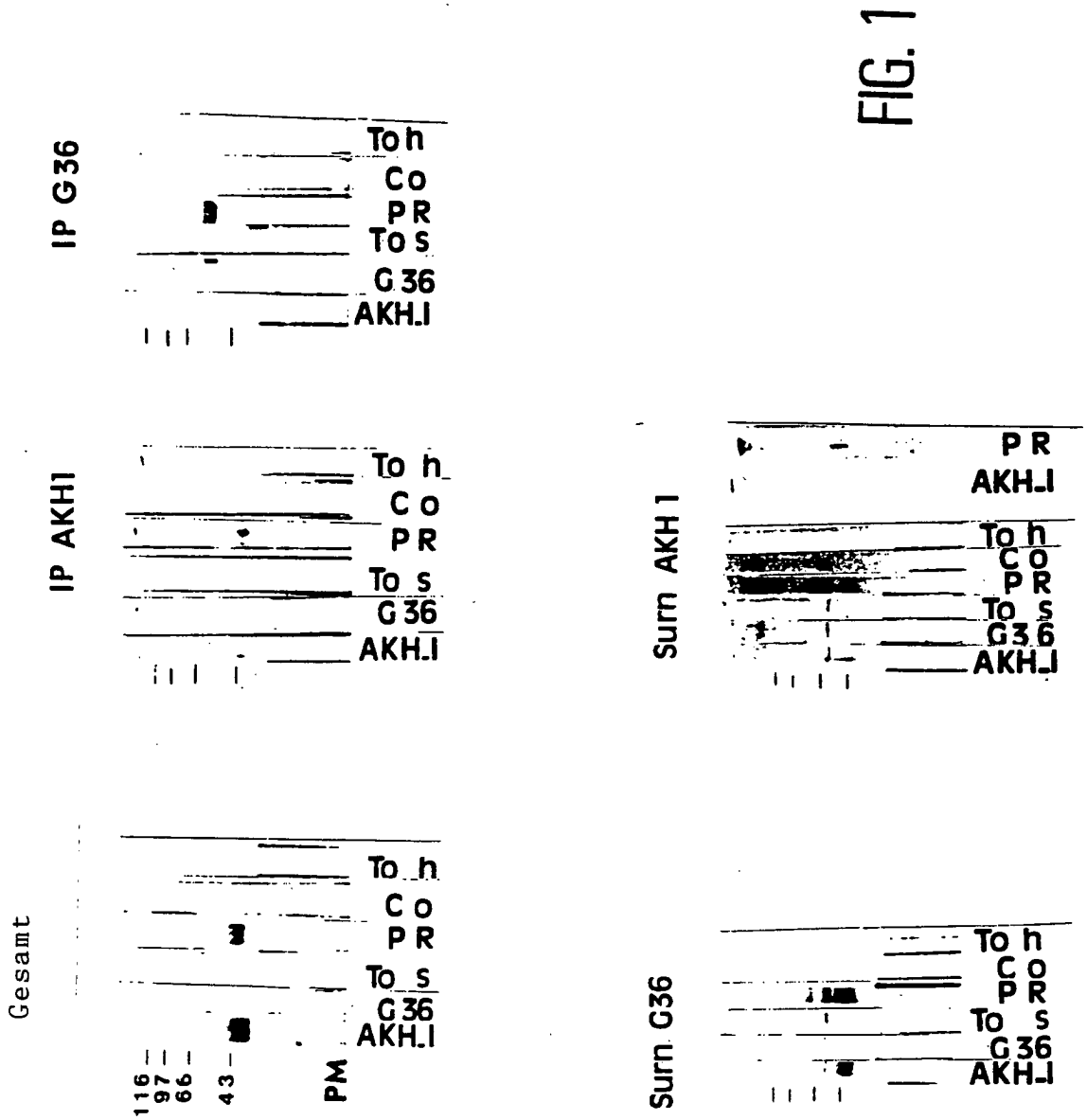

IP G36
To h
Co
PR
To s
G 36
AKH_I
IP AKH1
To h
Co
PR
To s
G 36
AKH_I
Gesamt
To h
Co
PR
To s
G36
AKH_I
116
97
66
43
PM
Sum AKH 1
PR
AKH_I
To h
Co
PR
To s
G36
AKH_I
Sum G36
To h
Co
PR
To s
G36
AKH_I

FIG. 18

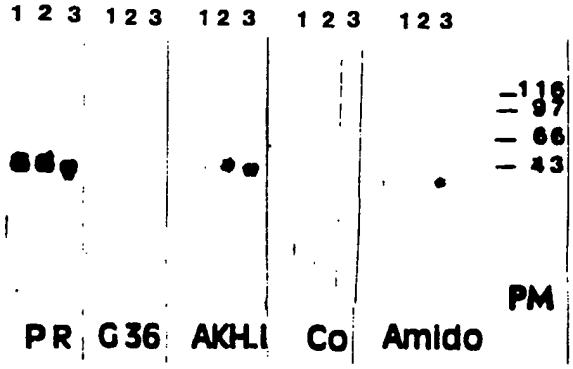
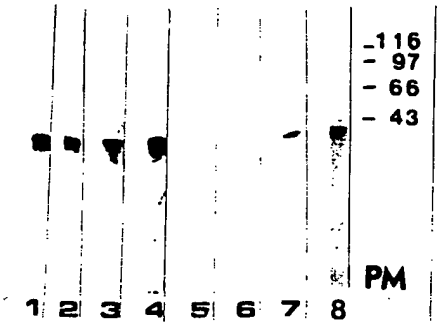

1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3
116
97
66
43
PM
PR G36 AKH-1 Co Amido

FIG. 19


116
97
66
43
PM
1 2 3 4 5 6 7 8