



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 12 513 T2** 2007.12.06

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 513 878 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 12 513.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR03/01888**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 748 180.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/000884**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.06.2003**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **31.12.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.03.2005**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **14.03.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.12.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/775** (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0207542 19.06.2002 FR

(73) Patentinhaber:

Genfit, Loos, FR

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR**

(72) Erfinder:

**NAJIB, Jamila, 40000 Marrakech, MA; MAJD,
Zouher, F-59320 Ennetieres en Weppes, FR**

(54) Bezeichnung: **ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS VOM APO-B48 UND APO-B100**

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

Einleitung und Stand der Technik

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen und Verfahren zur Analyse oder dem Bestimmen von Apolipoprotein B48 und Apolipoprotein B100 in Proben. Sie betrifft insbesondere ein Verfahren, das das Nachweisen und differentielle quantitative Bestimmen von Apolipoprotein B48 („Apo B48“) und Apolipoprotein B100 („Apo B100“) gestattet. Diese Erfindung betrifft gleichermaßen synthetische Produkte von Apo B100, die entsprechenden Antikörper, sie umfassende Kits und ihre Verwendung zum Nachweisen, quantitativen Bestimmen und/oder Verfolgen der Mengen von Apo B48 und/oder Apo B100 im zeitlichen Verlauf in einer biologischen Probe. Die nachstehend beschriebenen Produkte, Materialien und Kits können gleichermaßen zum differentiellen Modulieren des Apo-B48- und/oder Apo-B100-Spiegels oder ihrer Aktivität in vitro oder in vivo und zum Regulieren des Lipidstoffwechsels bei einem Patienten verwendet werden.

[0002] Erhöhte Triglyceridmengen im Plasma und das Fortbestehen von Chylomikronen in Lebensmitteldiäten sind Faktoren, die die Risiken eines Auftretens von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die derzeit für die meisten Todesfälle in der Welt verantwortlich sind (Hokanson and Austin 1996), erhöhen. Eine erhöhte Plasmalipidmenge korreliert mit dem Spiegel der Lipoproteine Apo B, die als atherogen gelten.

[0003] Die Apolipoproteine B sind heterogen. Die Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL: Very Low Density Lipoprotein) und die Lipoproteine niedriger Dichte (LDL: Low Density Lipoprotein) enthalten eine Isoform, die ein scheinbares Molekulargewicht von ungefähr 549 000 Da besitzt und die nach einem Zentilen-Nomenklatursystem mit der Abkürzung B100 bezeichnet wird, wohingegen die in Chylomikronen (den mehrheitlichen postprandialen Lipoproteinen) mehrheitlich vorliegende Isoform ein scheinbares Molekulargewicht von 246 000 Da besitzt und durch die Abkürzung B48 nach derselben Nomenklatur bezeichnet wird. Apo B48 ist eine verkürzte Form von Apo B100 und wird durch eine posttranskriptionelle Modifikation der für Apo B100 kodierenden Messenger-RNA produziert. Diese Modifikation transformiert das Kodon 2153 (CCA, das für ein Glutamin kodiert) in ein Stopkodon (Davidson, Anant et al. 1995).

[0004] Apo B48 und Apo B100 sind Schlüsselproteine im Lipoproteinmetabolismus bei Säugern. Apo B100 ist zum Aufbau von VLDL (Havel 1995) in der menschlichen Leber erforderlich (Kane 1983) und spielt auch eine Rolle bei der Zellaufnahme und dem Katabolismus von LDL. Von ihm ist gezeigt worden, dass es am LDL-Rezeptor-Pfad (Goldstein and Brown 1977) beteiligt ist. Apo B48 ist zum Aufbau von Chylomikronen im Darm (Young 1990) (Kane 1983) erforderlich und ist durch restliche“ (d. h. übrig gebliebene) Chylomikronteilchen gekennzeichnet, die als zusätzliche Risikofaktoren für das Auftreten von Koronarerkrankungen angesehen werden (Simons, Dwyer et al. 1987).

[0005] Derzeit verfügt man über sehr wenige Informationen über die atherogene Natur von Chylomikronteilchen, die aus dem Darm stammendes Apo B48 enthalten, und Teilchen, die aus der Leber stammendes Apo B100 enthalten. Es erweist sich daher als besonders wichtig, ein Verfahren zu entwickeln, das das Nachweisen und/oder differentielle quantitative Bestimmen von Apo B48 und Apo B100 gestattet, um insbesondere ihre jeweiligen Auswirkungen untersuchen und Deregulierungen oder Dysfunktionen bei Patienten aufzeigen zu können.

[0006] Aus verschiedenen Gründen ist es ziemlich schwierig, eine Messung der differenziellen Plasmakonzentration von Apo B48 und Apo B100 durchzuführen. Erstens ist die Aminosäuresequenz von Apo B48 mit der N-terminalen Region von Apo B100 (das 48 % von Apo B100 darstellt) identisch. Zweitens liegt Apo B48 im Gegensatz zu Apo B100 im Plasma in sehr geringer Konzentration vor. Drittens schwankt die Expression von Apo-B-Epitopen dem Lipidgehalt der Teilchen entsprechend.

[0007] Verfahren auf der Grundlage immunologischer Verfahren, die die quantitative Bestimmung von Apo B48 gestatten, sind im Stand der Technik beschrieben worden. Insbesondere das Verfahren von Uchida et al. (Uchida, Kurano et al. 1998) macht zum quantitativen Bestimmen von Apo B48 von einem ELISA-Test (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) Gebrauch. Die mit diesem Verfahren erhaltene Genauigkeit und der Durchsatz sind jedoch ziemlich gering, daher auch die Notwendigkeit, eine Reinigung der Antikörper und ihre Markierung vorzunehmen. Weiterhin ist der verwendete monoklonale Antikörper gegen die C-terminale Region des humanen Apo B48 gerichtet. Dieser Antikörper wird dank der differenziellen Konformation von Apo B48 in Apo B100 enthaltenden Teilchen erhalten, was entsprechend der Lipidzusammensetzung der Lipidteilchen zu Antikörpern mit unterschiedlicher Spezifität und Affinität führen kann.

[0008] Andere Dokumente beschreiben eine quantitative Bestimmung von Apo B48 mittels nicht-immunchemischer Techniken wie etwa Kapillarelektrophorese (Proctor and Mamo 1997), an einem HPLC-System durchgeführte Flüssigkeitschromatographie (Hidaka, Kojima et al.) (Wagner, Nustede et al.) oder SDS-PAGE (Karpe and Hamsten 1994) (Smith, Proctor et al. 1997). Diese Verfahren zeigen verschiedene Nachteile: sie weisen einen niedrigen Durchsatz auf und erfordern zum Verbessern der Genauigkeit der Ergebnisse Schritte der Vorbereitung der Lipoproteine und der Delipidierung. Diese Techniken sind außerdem ferner viel weniger empfindlich als immunchemische Verfahren.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt eine neue Strategie zum Herstellen für Apo B100 spezifischer synthetischer Peptide und neue Verfahren bereit, die das Nachweisen und differentielle quantitative Bestimmen von Apo B100 und Apo B48 gestatten. Die differentielle quantitative Bestimmung wird typischerweise durch die Bestimmung des gesamten Apo B (Apo B100 und Apo B48) in einer Probe, vorzugsweise mittels eines polyklonalen Anti-Apo-B-Antikörpers durchgeführt. Apo B100 wird anschließend mittels eines spezifischen Anti-Apo-B100-Antikörpers aus der Probe abgereichert, um so Apo B48 direkt und spezifisch quantitativ zu bestimmen.

[0010] Die vorliegende Erfindung beschreibt genauer neue Verfahren zur Herstellung für Apo B100 spezifischer Antikörper mittels für Apo B100 spezifischer synthetischer Peptide. Die Erfindung beschreibt ferner derartige Antikörper, sie enthaltende Kits und ihre Verwendung zum Nachweisen, quantitativen Bestimmen, Reinigen und/oder Verfolgen der Mengen an Apo B100 und Apo B48 im Serum oder Plasma. Diese Antikörper bieten ferner einen neuen Weg zum Modulieren der Aktivität von Apo B in vitro oder in vivo und zum Regulieren des Lipidstoffwechsels in einem Patienten.

[0011] Ein erster besonderer Gegenstand der Erfindung betrifft ein im wesentlichen reines, synthetisches, für Apo B100 spezifisches Peptid, das die Sequenz SEQ ID NO: 1 oder die Sequenz SEQ ID NO: 2 umfasst, oder ein immunogenes Fragment oder ein Derivat dieses Peptids.

[0012] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Anti-Apo-B100-Antikörpern, das einen Schritt der Immunisierung mit Hilfe eines hierin vorstehend beschriebenen, für Apo B100 spezifischen, synthetischen Peptids umfaßt. Die Erfindung umfaßt ferner sowohl gemäß diesem Verfahren hergestellte Antikörper als auch allgemeiner Antikörper, die sowohl ein wie etwa ein hierin vorstehend beschriebenes Peptid als auch Fragmente oder Derivate derartiger Antikörper binden kann.

[0013] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis oder der Bestimmung von Apo B100 und Apo B48 in biologischen Proben (insbesondere in hergestellten Lipidteilchen oder in Plasma- oder Serumproben) mit Hilfe eines wie etwa hierin vorstehend definierten Antikörpers (einschließlich eines Fragments oder Derivats davon).

[0014] Ein weiterer dieser Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis des Vorliegens, einer Prädisposition oder eines Risikos der Entwicklung einer Störung, die mit dem Lipidstoffwechsel bei einem Patienten in Verbindung steht, das den Nachweis von Apo B100 und Apo B48 in vitro in einer Probe des Patienten mit Hilfe eines wie etwa hierin vorstehend definierten Antikörpers (einschließlich eines Fragments oder eines Derivats davon) umfaßt. Das Verfahren ist insbesondere zum Nachweis des Vorliegens, einer Prädisposition oder eines Risikos der Entwicklung von Arteriosklerose oder einer Herz-Kreislauf-Erkrankung wie etwa zum Beispiel einer Koronarerkrankung geeignet.

[0015] In dieser Hinsicht betrifft ein spezieller Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zum Nachweis und/oder Verfolgen der Bildung, der Entwicklung oder des Fortschritts von Arteriosklerose bei einem Patienten, das den Nachweis der Menge oder des Spiegels von Apo B100 und/oder Apo B48 in vitro in einer Probe des Patienten mit Hilfe eines wie etwa hierin vorstehend beschriebenen Antikörpers (einschließlich eines Fragments oder eines Derivats davon) umfaßt.

[0016] Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis oder Verfolgen der zellulären Aufnahme an Triglyceriden und LDL reicher Lipoproteine, das den Nachweis Apo B enthaltender Teilchen in vitro mit Hilfe eines wie etwa hierin vorstehend definierten Antikörpers (einschließlich eines Fragments oder eines Derivats davon) umfaßt.

[0017] Der Patient ist im allgemeinen ein Säuger, bevorzugt ein Mensch, noch bevorzugter ein Patient, der

ein Risiko des Entwickelns von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die mit einer Lipidstoffwechselstörung im Zusammenhang stehen, wie etwa einer Koronarerkrankung aufweist oder außerdem ein Patient, der eine derartige Erkrankung aufweist.

[0018] Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, die einen wie etwa hierin vorstehend definierten Antikörper (einschließlich eines Fragments oder eines Derivats davon) und einen Exzipienten oder ein Vehiculum, die pharmazeutisch annehmbar sind, umfaßt.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0019] Wie hierin vorstehend angegeben betrifft ein Aspekt der vorliegenden Erfindung ein im Wesentlichen reines, synthetisches, für Apo B100 spezifisches Peptid, das die Sequenz SEQ ID NO: 1 oder die Sequenz SEQ ID NO: 2 umfaßt, oder ein immunogenes Fragment oder ein Derivat dieses Peptids. Unter „für Apo B100 spezifisches, synthetisches Peptid“ werden alle künstlich synthetisierten Peptide verstanden, die einen Teil des nativen Apo-B100-Proteins nachahmen und Regionen oder Epitope umfassen, die für dieses Protein spezifisch sind und bei anderen Proteinen im wesentlichen abwesend sind. Es handelt sich insbesondere um Peptide, die die Sequenz einer Region von Apo B100 umfassen, die bei anderen Formen von Apo B, insbesondere bei Apo B48 abwesend sind. Der Ausdruck „im wesentlichen rein“ zeigt an, daß das Peptid im wesentlichen frei von in Apo B48 vorhandenen Aminosäuresequenzen und/oder verunreinigenden Proteinen ist, die wie etwa insbesondere Apo A1 normalerweise in Lipidteilchen vorliegen oder mit Apo B verbunden sind. Der Ausdruck „synthetisch“ zeigt an, daß das Peptid kein auf natürliche Weise erhaltenes Molekül ist, sondern daß es dank eines künstlichen Verfahrens (z. B. chemische Synthese, Aufbau und dergleichen), insbesondere wie in den Beispielen beschrieben hergestellt worden ist. In diesem Zusammenhang ist das für Apo B100 spezifische, synthetische Peptid der Erfindung vorzugsweise im wesentlich unglykosyliert.

[0020] Die Erfindung zeigt nun, daß für Apo B100 spezifische, synthetische Peptide hergestellt und zum Erzeugen Anti-Apo-B100-spezifischer Antikörper verwendet werden können. Die Erfindung zeigt weiter, daß derartige Antikörper spezifisch an Apo B100 binden können, das entweder auf natürliche Weise oder in Form eines löslichen Antigens oder in Lipidteilchen eingeschlossen erhalten wurde. Die Erfindung zeigt ferner, daß derartige Antikörper an unterschiedliche, Apo B100 enthaltende Lipidteilchen (IDL (Intermediary Density Lipoprotein), VLDL und LDL) binden können und Immunfällungseigenschaften zeigen. Diese synthetischen, für Apo B100 spezifischen Peptide und ihre entsprechenden Antikörper stellen somit neue, besonders vorteilhafte Produkte zum Nachweisen von Apo B100 und differentiellen quantitativen Bestimmen von Apo B100 und Apo B48 dar.

[0021] Genauer umfaßt ein bevorzugtes synthetisches, für Apo B100 spezifisches Peptid der Erfindung die etwa hierin nachstehend beschriebene Sequenz SEQ ID NO: 1 oder ein immunogenes Fragment oder ein Derivat des Peptids.

SEQ ID NO: 1

KAASGTTGTY	QEWKDKAQN	L
ASFGGLKDNV	FDGLVRVTQK	FHMKVKHLID
SLIDFLNFPR	FQFPGKPGIY	TREELSTMFI
REVGTVLSQV	YSKVHNGSEI	L

[0022] Dieses Peptid entspricht den Resten 4105 bis 4215 der Sequenz des humanen reifen Apo B.

[0023] Gemäß einer Abwandlung der Erfindung umfaßt ein bevorzugtes synthetisches, für Apo B100 spezifisches Peptid der Erfindung die etwa hierin nachstehend beschriebene Sequenz SEQ ID NO: 2 wie oder ein immunogenes Fragment oder ein Derivat des Peptids.

AFTDLHLRYQ	KDKKGISTSA	ASPAVGTVGM
DMEDEDDFSK	WNFYYSQSS	PDKKLTIFKT
ELRVRESDEE	TQIKVNWEEE	AASGLTSLK
DNVPKATGVL	YDYVNKYH	

[0024] Dieses Peptid entspricht den Resten 3955 bis 4062 der Sequenz des humanen reifen Apo B.

[0025] Die Peptide der Erfindung umfassen weniger als 200 Aminosäuren, bevorzugter weniger als 180 Aminosäuren.

[0026] Wie in den Beispielen veranschaulicht können die Peptide der Erfindung (die die Sequenz SEQ ID NO: 1 oder die Sequenz SEQ ID NO: 2 umfassen) auf besonders vorteilhafte Weise durch Festphasensynthese, genauer unter Benützen der Boc/Bzl-Strategie (Merrifield 1963) hergestellt werden.

[0027] Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung betrifft ein für Apo B spezifisches, synthetisches Peptid, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es für Apo B100 spezifische Epitope umfaßt und dadurch, daß es frei von für Apo B48 spezifischen Epitopen ist und dadurch, daß es die Sequenz SEQ ID NO: 1 oder die Sequenz SEQ ID NO: 2 umfaßt.

[0028] Die Peptide können löslich, gereinigt oder mit einem Trägermolekül wie etwa KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) oder Serumalbumin zum Beispiel oder außerdem jedem anderen inerten (z. B. synthetischen) Molekül wie etwa einer Kugel usw. komplexiert sein. Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung sind die Peptide an ein Trägermolekül gekuppelt. Dies ist insbesondere der Fall, wenn sie zum Herstellen von Antikörpern verwendet werden. Das Kuppeln kann gemäß herkömmlichen, dem Fachmann bekannten Verfahren durchgeführt werden (Vaitukaitis, Robbins et al. 1971) (Bassiri 1979).

[0029] Die Peptide können ferner mit einem heterologen Polypeptidmolekül wie etwa zum Beispiel einem biologisch aktiven Molekül konjugiert oder gekuppelt sein. Die heterologe Natur bezeichnet jedes Peptid, das nicht aus einem humanen Apo-B-Molekül stammt.

[0030] Ein besonderer Gegenstand der Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie ein synthetisches Peptid umfaßt, das die Sequenz SEQ ID NO: 1 oder die SEQUENZ SEQ ID NO: 2 umfaßt und dadurch, daß es frei von einem anderen Apolipoprotein ist.

[0031] Die Peptide können bei Verfahren zum Durchmustern von Verbindungen, die die Apo-B-Aktivität modulieren, Titrationsverfahren, als Kontrollen, Standards oder zum Eichen analytischer Verfahren verwendet werden. Sie können ferner zum Modulieren der Apo-B100-Aktivität, vorteilhafterweise auf eine spezifische Weise verwendet werden. Sie sind ferner zum Herstellen von Anti-Apo-B100-Antikörpern besonders nützlich.

[0032] In dieser Hinsicht betrifft ein weiterer Gegenstand der Erfindung jeden Antikörper, der an ein wie etwa hierin vorstehend definiertes Peptid, insbesondere auf spezifische Weise binden kann. Vorzugsweise weisen die erfindungsgemäßen Antikörper die Fähigkeit zum Fällen von Apo B100 (Immunfällungen) auf. Der Antikörper kann polyklonal oder monoklonal sein. Wenn die Antikörper monoklonal sind, liegen sie vorzugsweise in Form eines Gemisches monoklonaler Antikörper vor. Außerdem schließt der Ausdruck Antikörper auch alle Antikörperfragmente und -derivate, insbesondere die Fragmente und Derivate dieser monoklonalen oder polyklonalen Antikörper ein, die im wesentlichen dieselbe antigene Spezifität aufweisen. Die letzten umfassen Antikörperfragmente (z. B. Fab, F(ab')₂, CDRs usw.), humanisierte Antikörper, polyfunktionelle Antikörper, einkettige Antikörper (ScFv) usw. Die Antikörper der Erfindung können mit Hilfe herkömmlicher Verfahren, die die Immunisierung eines Tieres und die Isolierung seines Serums (polyklonal) oder von Milzzellen (um durch Fusion mit geeigneten Zelllinien Hybridome herzustellen) umfassen, hergestellt werden.

[0033] Verfahren zum Herstellen polyklonaler Antikörper aus verschiedenen Tierarten einschließlich Nagern (Maus, Ratte usw.), Primaten, Pferden, Schweinen, Schafen, Kaninchen, Geflügel usw. werden zum Beispiel durch Vaitukaitis et al. (Vaitukaitis, Robbins et al. 1971) beschrieben. Das Antigen wird mit einem Adjuvans (z. B. Freundsches Adjuvans) vereinigt und einem Tier typischerweise durch subkutane Injektion verabfolgt. Wiederholte Injektionen können durchgeführt werden. Blutproben (Immunserum) werden gesammelt und die Immunglobuline werden abgetrennt.

[0034] Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper aus unterschiedlichen Tierarten finden sich zum Beispiel bei Harlow et al. (Harlow 1988) oder bei Kohler et al. (Kohler and Milstein 1975). Diese Verfahren umfassen die Immunisierung eines Tieres mit einem Antigen, gefolgt von der Isolierung von Milzzellen, die anschließend mit immortalisierten Zellen wie etwa Myelomzellen fusioniert werden. Die sich ergebenden Hybridome produzieren monoklonale Antikörper und können durch Grenzverdünnungen selektioniert werden, um einzelne Klone zu isolieren. Die Antikörper können auch durch Selektion kombinatorischer Immunglobulinbibliotheken wie etwa den zum Beispiel bei Ward et al. (Ward, Gussow et al. 1989) offenbarten hergestellt werden.

[0035] Bevorzugte Antikörper der Erfindung werden durch Immunisierung eines nicht-humanen Tieres mit Hilfe eines wie etwa hierin vorstehend beschriebenen, im wesentlichen reinen, synthetischen, für Apo B100 spezifischen Peptids, das vorzugsweise die Sequenz SEQ ID NO: 1 oder die Sequenz SEQ ID NO: 2 umfaßt, oder eines immunogenen Fragments oder eines Derivats dieses Peptids, z. B. eines wenigstens ein Epitop umfassenden Unterfragments oder eines Gemisches immunogener Fragmente oder Derivate der SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2 (Oligopeptide) und Isolieren der Antikörper oder der Antikörper produzierenden Zellen hergestellt.

[0036] Die Fragmente Fab oder F(ab')₂ können durch Verdau mit Hilfe einer Protease gemäß herkömmlichen Techniken hergestellt werden. Die humanisierten Antikörper können gemäß einem zum Beispiel bei Riechmann et al. (Riechmann 1988) (Jones 1986) beschriebenen Verfahren hergestellt werden.

[0037] Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung spezifischer Anti-Apo-B100-Antikörper, das die Verabfolgung (z. B. Injektion) eines Peptids mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder eines immunogenen Fragments oder eines Derivats dieses Peptids wie etwa hierin vorstehend beschrieben an ein nicht-humanes Tier und das Isolieren der Antikörper oder der Antikörper produzierenden Zellen umfaßt.

[0038] Das Verfahren gestattet vorteilhafterweise die Herstellung spezifischer und immunfällender Antikörper. Die Spezifität kann durch das Demonstrieren der Abwesenheit einer Kreuzreaktion mit anderen, Apo B48 umfassenden, im Blutkreislauf befindlichen Proteinen gezeigt werden. Allgemeiner zeigt die Spezifität an, daß die Antikörper an Apo B100 mit einer jedem anderen Antigen überlegenen Affinität binden können. Wie in den Beispielen veranschaulicht sind die polyklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung immunfällend und können so zum Nachweisen von Apo B100 oder zum differentiellen Bestimmen von Apo B100 und Apo B48 mit hoher Wirksamkeit verwendet werden.

[0039] Die Antikörper können an heterologe Fragmente wie etwa Toxine, Marker, Arzneimittel oder jedes andere therapeutische Mittel kovalent oder nicht kovalent, entweder direkt oder über Kupplungsmittel gekuppelt sein. Die Marker können aus Radiomarkern, Enzymen, fluoreszierenden Mitteln, magnetischen Teilchen usw. ausgewählt werden. Bevorzugte Toxine sind zum Beispiel das Diphtherietoxin, Botulinustoxin usw. Arzneimittel oder therapeutische Mittel werden insbesondere aus Lymphokinen, Antibiotika, Anti-sense-Sequenzen, Wachstumsfaktoren usw. ausgewählt. Das Durchführen der Kupplung von Antikörpern und derartiger heterologer Fragmente erlaubende Verfahren werden zum Beispiel im US-Patent 4 277 149 und im US-Patent 3 996 345 veranschaulicht.

[0040] Die Antikörper der Erfindung besitzen zahlreiche Anwendungen einschließlich der Therapie, Prophylaxe, Diagnose, Reinigung, des Nachweises usw.

[0041] Sie können in vitro als Durchmusterungsmittel oder zum Reinigen von Antigenen aus verschiedenen Proben einschließlich verschiedener biologischer Proben (z. B. Blutproben) verwendet werden. Sie können ferner zum Nachweisen oder quantitativen Bestimmen des Vorhandenseins oder der Menge von Apo B100 oder indirekt von Apo B48 in Apo B enthaltenden Lipidteilchen, die im Blut einer aus einem Patienten gesammelten Probe, typischerweise einer aus einem Säuger stammenden Blutprobe oder bevorzugt einem Menschen enthalten ist.

[0042] Diesbezüglich betrifft ein weiterer Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zum Nachweis oder der quantitativen Bestimmung von Apo B100 im Blut einer biologischen Probe, das das In-Kontakt-Bringen der Probe mit einem wie etwa hierin vorstehend definierten Antikörper (einschließlich Fragmenten oder Derivaten davon) und den Nachweis der Anwesenheit von Antigen-Antikörper-Immunkomplexen.

[0043] Die quantitative Bestimmung wird typischerweise auf differentielle Weise, das heißt durch Bestimmen

des gesamten Apo B (Apo B100 und Apo B48) in einer Probe, die anschließend mit Hilfe eines spezifischen Anti-Apo-B100-Antikörpers an Apo B100 abgereichert wird, was das direkte und spezifische Bestimmen von Apo B48 erlaubt. Die Apo-B100-Konzentration wird durch die Differenz zwischen der Gesamt-Apo-B-Messung und der von Apo B48 erhalten. Dieses Verfahren gestattet somit die Bestimmung des Apo-B100- und Apo-B48-Spiegels in einer Probe durch Bestimmung der (relativen) Mengen der Immunkomplexe in der Probe (vor oder nach dem Isolieren des Apo B100) und deren Vergleichen mit Standardbedingungen oder zum Beispiel einer Eichkurve.

[0044] Ein bevorzugtes Verfahren zum Nachweis oder der differentiellen Bestimmung umfaßt somit vorteilhafterweise die folgenden Stufen:

- a. Bestimmung der Gesamtmenge von Apo B in einer Probe mit einem Anti-Apo-B-Gesamt-Antikörper,
- b. Eliminierung von Apo B100 oder von Lipidteilchen, die Apo B100 enthalten, aus der Probe mit Hilfe eines wie etwa hierin vorstehend beschriebenen spezifischen Anti-Apo-B100-Antikörpers und
- c. Bestimmung der Menge von Apo B48 in der Probe, die in der Stufe (b) erhalten worden ist, oder in Lipidteilchen, die kein Apo B100 in dieser Probe enthalten, mit einem Anti-Apo-B-Gesamt-Antikörper.

[0045] Die in (a) und (c) erhaltenen Mengen erlauben durch Abziehen das Bestimmen der Mengen an Apo B100 (oder der Apo B100 enthaltenden Lipidteilchen) in der Probe.

[0046] Die verwendeten Antikörper können polyklonal, monoklonal oder Fragmente oder Derivate davon, allein, modifiziert und/oder im Gemisch sein. Sie können insbesondere in löslicher Form oder an Trägern, insbesondere Kugeln, Plättchen, Säulen usw. immobilisiert verwendet werden.

[0047] Der Anti-Apo-B-Gesamt-Antikörper setzt sich vorteilhafterweise aus einem Gemisch monoklonaler oder einem polyklonalen zusammen, um so einen Nachweis oder eine vollständige quantitative Bestimmung des Antigens in seinen verschiedenen Formen sicherzustellen. Weiterhin kann der in den Schritten a) und c) verwendete Antikörper identisch oder verschieden sein. Im allgemeinen ist es derselbe Antikörper.

[0048] Typischerweise wird ein polyklonaler Anti-Apo-B-Gesamt-Antikörper verwendet. Der Polyklonale Anti-Apo-B-Gesamt-Antikörper kann durch jede dem Fachmann bekannte Technik, insbesondere durch Immunisierung mittels Gesamt-Apo-B100 erhalten werden. Derartige Antikörper werden insbesondere in den Veröffentlichungen von Li (Li, Wu et al. 1997) und Levinson (Levinson and Wagner 1993) beschrieben.

[0049] Vorteilhafterweise werden während der Stufe b) zum selektiven Eliminieren des in der Probe vorhandenen Apo B100 ein oder mehr erfindungsgemäße spezifische Anti-Apo-B100-Antikörper verwendet, deren Fixierung auf Apo B100 die Fällung des Komplexes auslöst. Als nicht begrenzende Beispiele ist es daher möglich, entweder polyklonale Antikörper, ein Gemisch monoklonaler Antikörper oder so modifizierte (polyklonale oder monoklonale) Antikörper zu verwenden, daß die Fällung der Apo-B100-Antikörper-Immunkomplexe ausgelöst wird.

[0050] Bei einer ersten Ausführung sind die in der Stufe b) verwendeten spezifischen Anti-Apo-B100-Antikörper polyklonale Antikörper, die die immunfällende Eigenschaft besitzen.

[0051] Bei einer weiteren Ausführung ist es ferner möglich, ein Gemisch spezifischer monoklonaler Anti-Apo-B-Antikörper oder modifizierter monoklonaler Antikörper (die zum Beispiel an Latex oder andere Teilchen gebunden sind) zu verwenden, um so die Fällung der Apo-B-Antikörper-Immunkomplexe auszulösen.

[0052] Eine weitere Art und Weise zum Eliminieren der Apo B100 enthaltenden Lipoproteine besteht im Fixieren spezifischer Anti-Apo-B100-Antikörper an A- oder G-Proteine oder an andere chemische Moleküle (chemische Polymere oder Harze wie etwa Polyurethan, aktivierte Sepharose usw.). Diese Komplexe können an magnetische Kugeln gebunden sein, was die Eliminierung von Apo B100 durch Anwendung eines Magnetfelds (z. B. magnetische Fällung oder Trennung) gestattet.

[0053] Das erfindungsgemäße Analysenverfahren (und genauer der Nachweis oder die quantitative Bestimmung von Antigen-Antikörper-Immunkomplexen) kann mit Hilfe herkömmlicher Techniken wie etwa ELISA-Verfahren (direkte oder kompetitive Immunbestimmung), RIA (Radio Immuno Assay), EIA (Electro immuno assay, auch Electro immuno diffusion genannt), Turbidimetrie oder jedes andere immunologische Verfahren durchgeführt werden. Ein besonders bevorzugtes Verfahren der Erfindung betrifft jedoch ein nephelometrisches Analysenverfahren. Tatsächlich sind die Antikörper wie hierin vorstehend angegeben spezifisch und können Apo B100 in einer Probe immunfällen, was es auf diese Weise gestattet, Apo B48 mit einem polyklonalen An-

ti-Apo-B-Gesamt-Antikörper (oder einer Mischung monoklonaler Antikörper oder einem zum Auslösen der Fällung von Apo-B-Antikörper-Immunkomplexen modifizierten monoklonalen Antikörper) differentiell zu bestimmen.

[0054] Bei dem nephelometrischen Analysenverfahren wird die Intensität des durch die Teilchen in Suspension emittierten Lichts mit Hilfe eines Analysators gemessen. Die Teilchen werden während der Immunfällungsreaktion gebildet, die in einem die Polymerbildung stimulierenden Puffermedium erfolgt, wenn ein spezifischer Antikörper mit einem spezifischen Antigen in Kontakt gebracht wird. Der ein Antigen und einen für das Antigen spezifischen Antikörper umfassende Komplex bildet sich in einer Höhe, die zuerst allmählich zunimmt, dann rasch zunimmt und schließlich einen Spitzenwert erreicht, der der Konzentration der Antigene proportional ist. Das Analysenverfahren beruht auf der Messung der maximalen Änderung der Intensität der Lichtintensität, die mit der Antigenkonzentration in Beziehung gesetzt wird (und darin umgerechnet werden kann). Typischerweise wird das nephelometrische Analysenverfahren mit Hilfe immunchemischer Beckman-Systeme (IMMAGE, Beckman Coulter, Foster City, CA, USA) durchgeführt, die die Ergebnisse in einer alphanetrischen Tabelle darstellen. Das nephelometrische Verfahren der Erfindung ist besonders vorteilhaft bei der Messung, wo es rasch und reproduzierbar ist und den Erhalt eines hohen Durchsatzes gestattet. Tatsächlich benötigt dieses Verfahren nur einige Sekunden zum Analysieren jeder Probe, während die Verfahren des Standes der Technik zum Vergleich einen ganzen Tag erfordern. Weiterhin kann die Technik gemäß der Erfindung leicht automatisiert werden. Außerdem ist der Variationskoeffizient für den Apo-B-Nachweis (ungeachtet einer Isoform) nur 4 % bei dem Verfahren der Erfindung im Gegensatz zu 10 % beim Stand der Technik.

[0055] Ein besonderer Gegenstand der Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur differentiellen quantitativen Bestimmung von Apo B48 und von Apo B100 in den in einer biologischen Probe vorhandenen Lipidteilchen, das das In-Kontakt-Bringen der Probe (oder einer Verdünnung davon) mit einem wie etwa hierin vorstehend beschriebenen Antikörper (einschließlich der Fragmente oder der Derivate davon) umfaßt. Kurz gesagt wird in einem ersten Schritt eine biologische Probe mit einem Anti-Apo-B-Gesamt-Antikörper in einem immunnephelometrischen System untersucht, was so das quantitative Bestimmen des gesamten umlaufenden Apo B gestattet. In einem zweiten Schritt wird die biologische Probe durch In-Kontakt-Bringen dieser Probe mit einem spezifischen Anti-Apo-B100-Antikörper (der vorzugsweise durch die Verwendung von Peptiden mit der SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 2 hergestellt wurde) an dem Apo B100 darin abgereichert. Schließlich wird die Apo-B48-Menge der an dem Apo B100 darin abgereicherten Probe durch den Anti-Apo-B-Gesamt-Antikörper auf dieselbe Weise wie die rohe Probe bestimmt. Die Apo-B100-Menge kann so einfach als Differenz zwischen der Gesamtmenge an Apo B und der Menge an Apo B48 erhalten werden. Typischerweise werden die verschiedenen Verdünnungen der biologischen Probe und/oder der Anti-Apo-B-Gesamt- und/oder Anti-Apo-B100-Antikörper im Hinblick auf das Entfernen von Proteinen, die kein Immunglobulin sind, und/oder Konzentrieren des Antikörpers vor dem In-Kontakt-Bringen mit der Probe einer Behandlung unterzogen. Die Behandlung umfaßt typischerweise das In-Kontakt-Bringen der Antikörper mit Polyethylenglykol (PEG) wie etwa zum Beispiel bei Ritchie et al. (Ritchie 1972) beschrieben. Typischerweise werden bei diesem Analysenverfahren 0,5 bis 1 µg spezifische Antikörper verwendet, obschon der Fachmann unterschiedliche Mengen verwenden kann, ohne von der vorliegenden Erfindung bedeutend abzuweichen.

[0056] Bei einem nephelometrischen Analysenverfahren werden im allgemeinen polyklonale Antikörper verwendet.

[0057] Das Analysenverfahren kann an unterschiedlichen biologischen Proben einschließlich insbesondere Blut, Plasma, Serum, interstitieller Flüssigkeit, Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit, Zellkulturüberstand usw. durchgeführt werden. Die Probe kann von einem Patienten (z. B. einem menschlichen Patienten) genommen werden und direkt zum Ausführen des Analysenverfahrens verwendet werden. Wahlweise kann die Probe verdünnt und/oder gelagert (zum Beispiel in gefrorener Form) werden, um später untersucht zu werden. Die Erfindung gestattet auch mittels der Anti-Apo-B-Gesamt- und spezifischen Anti-Apo-B100-Antikörper die Messung der Konzentration des in den Lipidteilchen enthaltenen Apo B48 und Apo B100 mit hoher Wirksamkeit, Sicherheit und hohem Durchsatz.

[0058] Der Nachweis kann unter verschiedenen Versuchsbedingungen, klinischen und/oder diagnostischen Bedingungen durchgeführt werden. Insbesondere kann das Verfahren zum Nachweisen einer Prädisposition bestimmter Individuen zum Entwickeln mit dem Lipidstoffwechsel im Zusammenhang stehender Störungen verwendet werden.

[0059] Ein besonderer Gegenstand der Erfindung betrifft somit ein Verfahren zum Nachweis des Vorliegens, einer Prädisposition oder eines Risikos der Entwicklung einer Störung, die mit dem Lipidstoffwechsel bei einem

Patienten im Zusammenhang steht, wobei das Verfahren den Nachweis in vitro oder die quantitative Bestimmung in vitro (oder ex vivo) in einer dem Patienten entnommenen Probe Apo B48 und Apo B100 umfassender Lipidteilchen mit Hilfe eines wie etwa hierin vorstehend definierten Antikörpers (einschließlich der Fragmente oder der Derivate davon) umfaßt. Erhöhte Apo-B48- und/oder Apo-B100-Spiegel (verglichen mit einem Mittelwert bei normalen Individuen) sind für dieses erhöhte Risiko des Entwickelns von Störungen des Lipidstoffwechsels kennzeichnend. Das Verfahren ist zum Nachweis des Vorliegens, einer Prädisposition oder eines Risikos des Entwickelns von Arteriosklerose oder einer Herz-Kreislauf-Erkrankung wie etwa zum Beispiel einer Koronarerkrankung besonders geeignet.

[0060] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis oder Verfolgen des zellulären Einfangs von LDL und Lipoproteinen, die reich an Triglyceriden sind, bei einem Patienten, das den In-vitro-Nachweis der Gehalte an Apo B48 und/oder Apo B100, die in den Lipidteilchen enthalten sind, mit Hilfe eines wie etwa hierin vorstehend definierten Antikörpers (einschließlich der Fragmente oder der Derivate davon) umfaßt.

[0061] Die erfindungsgemäßen Antikörper können ferner zum Durchmustern (Selektionieren) von Verbindungen oder Diäten verwendet werden, die die Konzentration von Apo B48 und/oder Apo B100 im Serum oder Plasma modulieren können. Typischerweise umfaßt das Verfahren die Verabfolgung einer Verbindung oder Diät an ein Tier oder an einen Patienten und das Isolieren einer aus dem Tier oder dem Patienten stammenden biologischen Probe, gefolgt vom Nachweis des Vorliegens und/oder der Bestimmung der Mengen an Apo B48 und Apo B100 in dieser Probe mit Hilfe eines wie etwa des hierin vorstehend definierten Antikörpers (einschließlich Fragmenten oder Derivaten davon).

[0062] Wie hierin nachstehend angegeben können diese Verfahren an verschiedenen Proben (typischerweise Plasma oder Serum) und durch ELISA, RIA, EIA, Turbidimetrie usw. oder bevorzugt mittels einer nephelometrischen Analyse durchgeführt werden.

[0063] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung umfaßt die Verwendung eines erfindungsgemäßen Antikörpers zur Herstellung einer Zusammensetzung, die für die selektive In-vivo-Regulierung der Aktivität von Apo B100 bei einem Individuum bestimmt ist. Zum Beispiel zum Hemmen der Aufnahme Apo B100 enthaltender Lipoproteine (über den LDL-Rezeptor) durch Leberzellen oder periphere Zellen, um so die Zufuhr von Lipiden dorthin zu modifizieren oder den intrazellulären Aufbau und die Sekretion von Lipoproteinen (da Apo B100 für einen derartigen Aufbau benötigt wird) zu hemmen und dadurch die Produktion sogenannter atherogener Lipoproteine zu verringern.

[0064] Insbesondere versteht man unter der Apo-B100-Aktivität seine Rolle beim Aufbau und der Sekretion von Lipoproteinen im Plasma (VLDL) und seine Rolle beim Einfangen von Lipoproteinen durch periphere Zellen.

[0065] Die Erfindung umfaßt außerdem eine pharmazeutische Zusammensetzung, die einen wie etwa hierin vorstehend beschriebenen Antikörper und gegebenenfalls einen pharmazeutisch annehmbaren Exzipienten oder ein Vehiculum umfaßt. Der Exzipient kann jede Lösung, Suspension, Gel, Pulver usw. sein, das mit einer pharmazeutischen Verwendung verträglich ist. Isotone Lösungen, Puffer, Kochsalzlösungen usw., die gegebenenfalls mit Stabilisatoren wie etwa Proteinen oder anderen Molekülen hohen Molekulargewichts kombiniert sind, können zum Beispiel angeführt werden.

[0066] Diese Erfindung betrifft ferner einen Kit, der ein Peptid oder einen wie etwa hierin vorstehend beschriebenen Antikörper umfaßt. Das Kit kann zum Nachweisen oder quantitativen Bestimmen von Apo B48 und/oder Apo B100 in irgendeiner Probe verwendet werden.

[0067] Andere Aspekte und Vorteile der Erfindung werden in den folgenden Beispielen beschrieben, die zu Anschauungszwecken bestimmt sind und den Erfindungsumfang nicht einschränken.

Erklärung der Zeichnungen

[0068] [Fig. 1](#) Spezifität des Anti-Apo-B100-Antikörpers. A: SDS-PAGE; B Immuno Blot, Bahn 1 und 2: Chylomikronen aus HTG-Patienten. Bahn 3: VLDL aus normolipiden Individuen.

[0069] [Fig. 2](#) Nephelometrisches Analysenverfahren von Apo B: Eichkurve

Beispiele

1. Synthese von Apo B100

[0070] Die synthetischen, für Apo B100 spezifischen Peptide wurden mit Hilfe eines in der Festphase (Merri-field 1963) an einem automatischen Synthesegerät Modell ABI 431 (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA) unter Anwenden einer Boc/Bzl-Strategie auf 0,5 mMol PAM-Ala-Harz durchgeführt. Jede Aminosäure wurde mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid/Hydroxybenzotriazol zweimal gekuppelt, ohne „abgesättigt“ zu sein. Die Rohprodukte wurden anschließend durch HPLC in Umkehrphase an einer Säule Vydac 18 (Interchim, Montluçon, Frankreich) gereinigt, die einen von 0 bis 100 % Puffer B (Puffer A: 0,05 % TFA in H₂O und Puffer B: 0,05 % TFA mit 60 % CH₃CN in H₂O) verlaufenden linearen Gradienten gereinigt und analysiert. Die Molmassen wurden anschließend mit Hilfe eines Massenspektrometers API (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA), das mit einem einfachen Quadrupol und einer Elektrospray-Ionenquelle (nebulizer-assisted electrospray) (Sciex, Toronto, Kanada) ausgestattet war, analysiert.

[0071] Die Aminosäureanalyse wurde mit Hilfe eines Aminosäureanalysators Beckman 6300 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) nach 24 Stunden Hydrolyse bei 110 °C mit Hilfe einer 0,25 % Phenol enthaltenden 6N HCl-Lösung durchgeführt.

2. Immunisierungen

[0072] Ein gegen Gesamt-Apo-B gerichtetes Antiserum wurde gemäß der durch Fievet et al. (Fievet 1984) beschriebenen Technik hergestellt. Kurz gesagt wurden LDL, deren Dichte zwischen 1,030 und 1,053 lag (und daher nur Apo B100 enthielten), durch Ultrazentrifugation hergestellt und anschließend in Ziegen injiziert, um so ein Anti-Apo-B-Gesamt-Immunserum herzustellen, das alle Formen von Apo B erkennt. Das für Apo B100 spezifische Antiserum wurde ebenfalls in Ziegen im wesentlichen gemäß der durch Vaitukaitis et al. (Vaitukaitis, Robbins et al. 1971) beschriebenen Vorschrift hergestellt. Das Peptid (SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 2), das als Antigen diente, wurde in komplettem Freundschens Adjuvans emulgiert und zu 0,5 mg Peptid je Injektion bei den ersten beiden Injektionen, gefolgt im Abstand von zwei Wochen von Booster-Injektionen unter Verwenden desselben Adjuvans, aber nur 0,25 mg Peptid subkutan in Ziegen injiziert.

3. Isolierung für Gesamt-Apo-B und Apo B100 spezifischer Immunglobuline (IgG)

[0073] Die IgG wurden mit Hilfe einer von Ritchie et al. (Ritchie 1972) abgeänderten Vorschrift hergestellt. Die Proteine, die keine Immunglobuline waren, wurden aus dem Immunserum entfernt, und die IgG wurden dialysiert und eingengt.

[0074] Die Antikörper können zwischen 2 und 8 °C, wenn sie zum Beispiel innerhalb einer Wache verwendet werden, oder gefroren bei -20 °C zur längerfristigen Verwendung bis zu einem Monat gelagert werden. Die Immunglobuline enthalten Natriumazid.

4. Antikörperspezifität

[0075] Ein analytischer Immunoblot von Chylomikronen und VLDL wurde zum Demonstrieren der Spezifität der Anti-Apo-B100-Antikörper ausgeführt. Wie [Fig. 1](#) zeigt wurde mit Apo B48 oder den anderen Proteinen der Chylomikronen keine Kreuzreaktion beobachtet. Was VLDL betrifft erkannte der Anti-Apo-B100-Antikörper nur das bei 550 kDa gelegene Protein, das der Molmasse von Apo B100 entspricht. Diese Ergebnisse zeigen, daß der gegen das Peptid mit der SEQ ID NO: 1 gerichtete Antikörper Apo B100 spezifisch erkennt.

5. Immunnephelometrisches Analysenverfahren

5.1 Zu dem nephelometrischen Analysenverfahren verwendete Reagenzien und Materialien

TABELLE 1

	Bezeichnung	Referenz
Anti-Apo-B-Immunglobuline	1 x 6,5 ml (300 Tests)	Laboransatz
Anti-Apo-B100-Immunglobuline	1 x 5 ml (100 Tests)	Laboransatz
Standard	3 x 0,5 ml (900 Tests)	Dade-Behring Teile-Nr. OUPG07
Kontrolle	3 x 0,5 ml (500 Tests)	Dade-Behring Nr. OUPH07
Puffer 1	4 x 120 ml (4 x 330 Tests)	Beckman Coulter Teile-Nr. 447650
IMAGE UDR Patrone	10 (10 x 300 Tests)	Beckman Coulter Teile-Nr. 447250
Mikroröhrchen	1000	Beckman Coulter Teile-Nr. 448162

[0076] Standard: Der Apo-B-Standard stammte aus einem Humanserum, das mit Hilfe eines Elektroimmundiffusionsverfahrens (EIA) geeicht und auf HIV- und Hepatitisviren getestet wurde. Dieser Standard muß mit der üblichen Vorsicht gehandhabt werden, um jegliche Kontamination zu vermeiden. Der Apo-B-Standard wies eine Konzentration von 100 mg/dl auf.

[0077] Herstellung: Zum Erstellen einer Eichkurve muß der Standard wie folgt in Puffer 1 verdünnt werden.

TABELLE 2

Punkte	Konzentration (mg/dl)
1	0,156
2	0,312
3	0,6250
4	1,25
5	3,33
6	5
7	10
8	15
9	20

[0078] Lagerung und Stabilität: Der Apo-B-Standard kann bei -20 °C aufbewahrt und gelagert werden. Die Stabilität wird mit Hilfe von EDTA und Natriumazid erreicht. Die Zubereitung kann gefroren und getrocknet werden.

[0079] Probenherstellung: Zur Analyse werden frische Proben empfohlen. Seren müssen durch eingeführte und in klinischen Laboratorien angewendete Verfahren gesammelt werden. Nötigenfalls kann das Serum bis

zu einer Woche zwischen 2 und 8 °C gelagert werden. Gefroren gelagerte Proben können über einen längeren Zeitraum verwendet werden; gefrorene Proben sind bis zu einem Jahr stabil.

[0080] Herstellung von Proben ohne Apo-B100-Teilchen: Einem Reagenzglas fügt man in folgender Reihenfolge 40 µl Anti-Apo-B100-Antikörper, 40 µl Serum und 40 µl Puffer 1 zu. Es wird gerührt und anschließend inkubiert man zehn Minuten bei Raumtemperatur, dann führt man zehn Minuten eine Zentrifugation bei 3500 Upm aus und anschließend entfernt man den Überstand, der analysiert wird. Die Endkonzentration an Apo B48 in den an Apo B100 enthaltenden Lipidteilchen abgereicherten Proben wurde entsprechend der Verdünnung des Überstands korrigiert.

5.2 Vorschrift:

- Programmieren eines definierten Reagenzes mit den in dem die Handhabung des immunchemischen Systems IMAGE beschreibenden Handbuch aufgeführten Parametern,
- Überführen des die Antikörper enthaltenden Reagenzes in das Abteil A der Patrone,
- Eingabe des Standardwerts (der aktuelle Apo-B-Standardwert ist 1 mg/dl) in eine Parametertabelle entsprechend dem in Tabelle 2 dargestellten Verdünnungsschema,
- Verwenden von Puffer 1 als Probenverdünnungsmittel.

5.3 Zusammenfassung:

Chemische Bezeichnung: Apo B	Einheit: mg/dl
Ansatz Nr.: siehe Patrone	Vorschrift: nicht-kompetitive Nephelometrie
Seriennummer des Reagenzes: siehe Patrone	Ablauf des Reagenzes: vom Anwender zu definieren
Proben- oder Verdünnungsvolumen: 20 µl	Faktor: 3
Reagenzpuffer: 200 µl	Verdünnung: 1/1
Volumen des Reagenzabteils: 20 µl	Verdünnung der Probe: 1/15* 1/1**
Volumen des Abteils B: 0 µl	Reaktionsdauer: 2 Minuten

* nach der Eichung festzulegen

** nach der Messung des Apo B48 festzulegen

5.4 Ergebnisse

[0081] Eichkurve ([Fig. 2](#)): die Eichkurve wurde automatisch durch das Analysengerät erstellt. Qualitätskontrolle: es wird empfohlen, ein Kontrollserum (wie etwa das Serum von Dade-Behring GmbH, Marburg, Deutschland; zur Kontrolle von Apolipoproteinen bestimmt) für jede getestete Probe zu verwenden.

[0082] Werte: das Analysengerät zeigt direkt die Endkonzentration an. Bei den Anti-Apo-B100-Antikörper enthaltenden behandelten Proben muß die dreifache Verdünnung korrigiert werden.

Arbeitsbereich:

für Gesamt-Apo-B: 25 bis 300 mg/dl

für die Messung von Apo B48: 1,5 bis 25 mg/dl

für die Messung von Apo B100: Differenz zwischen den Messungen des Gesamt-Apo-B und Apo B48

Variationskoeffizient: 4 %

Übliche Werte (Smith 1997):

Apo B48: 4-6 mg/dl bei einem normalen, fastenden Patienten 20 mg/dl bei einem Patienten im Zeitraum nach der Mahlzeit

6. Andere Vorteile der Erfindung

[0083] Andere Vorteile und Verwendungen der synthetischen, für Apo B100 spezifischen Peptide der Erfindung schließen Folgendes ein:

- die Herstellung monoklonaler Antikörper,
- die Verwendung als Standard zur Eichung jeglicher Analysenverfahren für Apo B100 (ELISA; RIA, Elektroimmundiffusion usw.)
- die Verwendung bei der Untersuchung verschiedener Stoffwechselwege von Lipoproteinen wie Aufzeichnung oder Hemmung des Einfangs von Apo B enthaltender Lipoproteine durch LDL-Rezeptoren.

[0084] Andere Vorteile und Verwendungen der Antikörper dieser Erfindung sind die folgenden:

- die Verwendung bei jeglichen immunologischen Analysenverfahren zum differentiellen quantitativen Bestimmen von Apo B100 und Apo B48,
- die Verwendung im Rahmen des differentiellen Nachweises von Apo B100 und Apo B48 (Immunblot, Dot-blot, Immunhistochemie und Immunzytochemie),
- die Verwendung bei Immunaффinitäts- und Immunfällungsverfahren zum Reinigen der Proteine.

Literaturzitate

- Bassiri, R. M., Dvorak J. and Utiger R.D. (1979). Thyrotropin-releasing hormone. Methods of hormone radioimmunoassay. B. M. In: Jaffe, and Behrman H.R. (Eds). New York, New York Academic Press: p: 46.
- Davidson, N. O., S. Anant, et al. (1995). "Apolipoprotein B messenger RNA editing: insights into the molecular regulation of post-transcriptional cytidine deamination." *Curr Opin Lipidol* 6(2): 70-4.
- Fievet, C., Koffigan M., Ouvry D., Marcovina S., Moschetto Y., Fruchart J.C. (1984). "Noncompetitive enzyme-linked immunoassay for apolipoprotein B in serum." *Clin Chem* 30: 98-100.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1977). "The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis." *Annu Rev Biochem* 46: 897-930.
- Harlow, E. a. L., D., Ed. (1988). *Antibodies: a Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Publications.
- Havel, R. J., and Kane, J.P. (1995). Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. A. L. B. C.R. Scriver, W.S.Sly, and D.Valle. New York, McGraw-Hill. 2: 1841-1851.
- Hidaka, H., H. Kojima, et al. (1990). "Apolipoprotein B-48 analysis by highperformance liquid chromatography in VLDL: a sensitive and rapid method." *Clin Chim Acta* 189(3): 287-96.
- Hokanson, J. E. and M. A. Austin (1998). "Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies." *J Cardiovasc Risk* 3(2): 213-9.
- Jones, P. T., Dear P. H., Foote J., Neuberger M. S. and Winter G. (1986). "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." *Nature* 321: 522-525.
- Kane, J. P. (1983). "Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity." *Annu Rev Physiol* 45: 637-50.
- Karpe, F. and A. Hamsten (1994). "Determination of apolipoproteins B-48 and B-100 in triglyceride-rich lipoproteins by analytical SDS-PAGE." *J Lipid Res* 35(7): 1311-7.
- Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256(5517): 495-7.
- Levinson, S. S. and S. G. Wagner (1993). "Immunonephelometric/turbidimetric apolipoprotein B assays for the clinical laboratory." *Clin Chim Acta* 223(1-2): 31-42.
- Li, B., Z. Wu, et al. (1997). "[Quantitation of human apolipoprotein B100 by immunoturbidimetric assay]." *Hua*

XI Yi Ke De Xue Xue Bao 28(1): 109-12.

Merrifield, R. B. (1963). "Solide phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide." J. Am. Chem. Soc 85: 2149-2154.

Proctor, S. D. and J. C. Mamo (1997). "Separation and quantification of apolipoprotein B-48 and other apolipoproteins by dynamik sieving capillary electrophoresis." J Lipid Res 38(2): 410-4.

Riechmann, L., Clark M., Waldmann H. and Winter G: (1988). "Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma." Nature 332: 323-327.

Ritchie, R. F., and J. Stevens (1972). Qualifications for acceptable anti-serum performance in the automated immunoprecipitation system: A brief review of commercially available reagents. in advances in Automated Analysis Technicon Symposia. Tarry-town, NY, Mediad Inc: 9-14.

Simons, L. A., T. Dwyer, et al. (1987). "Chylomicrons and chylomicron remnants in coronary artery disease: a case-control study." Atherosclerosis 65(1-2): 181-9.

Smith, D., Proctor S.D., Mamo J.C. (1997). "A highly sensitive assay for quantitation of apolipoprotein B48 using an antibody to human apolipoprotein B and enhanced chemiluminescence." Ann Clin Biochem. 34: 185-189.

Smith, D., S. D. Proctor, et al. (1997). "A highly sensitive assay for quantitation of apolipoprotein B48 using an antibody to human apolipoprotein B and enhanced chemiluminescence." Ann Clin Biochem 34(Pt 2): 185-9.

Uchida, Y., Y. Kurano, et al. (1998). "Establishment of monoclonal antibody against human Apo B-48 and measurement of Apo B-48 in serum by ELISA method." J Clin Lab Anal 12(5): 289-92.

Vaitukaitis, J., J. B. Robbins, et al. (1971). "A method for producing specific antisera with small doses of immunogen." J Clin Endocrinol Metab 33(6): 988-91.

Wagner, H. A., R. Nustede, et al. (1987). "Isolation of apolipoprotein-B-48 from chylomicrons by high-performance liquid chromatography." J Chromatogr 397: 405-8.

Ward, E. S., D. Gussow, et al. (1989). "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli." Nature 341(6242): 544-6.

Young, S. G. (1990). "Recent progress in understanding apolipoprotein B." Circulation 82(5): 1574-94.

SEQUENZLISTE

<110> GENFIT SA

<120> Zusammensetzungen und Verfahren zur Bestimmung von Apo B48 und Apo B100

<130> ~~B0120W0~~

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
synthetisches Peptid Apo B100

<400> 1

Lys Ala Ala Ser Gly Thr Thr Gly Thr Tyr Gln Glu Trp Lys Asp Lys
 1 5 10 15
 Ala Gln Asn Leu Tyr Gln Glu Leu Leu Thr Gln Glu Gly Gln Ala Ser
 20 25 30
 Phe Gln Gly Leu Lys Asp Asn Val Phe Asp Gly Leu Val Arg Val Thr
 35 40 45
 Gln Lys Phe His Met Lys Val Lys His Leu Ile Asp Ser Leu Ile Asp
 50 55 60
 Phe Leu Asn Phe Pro Arg Phe Gln Phe Pro Gly Lys Pro Gly Ile Tyr
 65 70 75 80
 Thr Arg Glu Glu Leu Ser Thr Met Phe Ile Arg Glu Val Gly Thr Val
 85 90 95
 Leu Ser Gln Val Tyr Ser Lys Val His Asn Gly Ser Glu Ile Leu
 100 105 110

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
synthetisches Peptid Apo B100

<400> 2

Ala Phe Thr Asp Leu His Leu Arg Tyr Gln Lys Asp Lys Lys Gly Ile
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Ala Ala Ser Pro Ala Val Gly Thr Val Gly Met Asp Met
 20 25 30
 Asp Glu Asp Asp Asp Phe Ser Lys Trp Asn Phe Tyr Tyr Ser Pro Gln
 35 40 45
 Ser Ser Pro Asp Lys Lys Leu Thr Ile Phe Lys Thr Glu Leu Arg Val

50	55	60
Arg Glu Ser Asp Glu Glu Thr Gln Ile Lys Val Asn Trp Glu Glu Glu		
65	70	75
Ala Ala Ser Gly Leu Thr Ser Leu Lys Asp Asn Val Pro Lys Ala		
85	90	95
Thr Gly Val Leu Tyr Asp Tyr Val Asn Lys Tyr His		
100	105	

Patentansprüche

1. Im Wesentlichen reines synthetisches Peptid, **dadurch gekennzeichnet**, dass es die Aminosäure-Sequenz SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 2 und weniger als 200 Aminosäuren umfasst.
2. Im Wesentlichen reines synthetisches Peptid, dadurch gekennzeichnet, dass es aus der Aminosäure-Sequenz SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 2 besteht.
3. Peptid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es löslich ist oder komplex gebunden ist an ein Trägermolekül, wie z.B. KLH, Serum-Albumin oder eine Kugel.
4. Peptid nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es die Bildung von Antikörpern, die Apo B100 immun-präzipitieren (ausfällen), erlaubt.
5. Antikörper der für ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 spezifisch ist, oder Fragment oder Derivat dieses Antikörpers, der (das) im Wesentlichen die gleiche Antigen-Spezifität aufweist.
6. Antikörper nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass er gebildet worden ist durch Immunisieren eines Nicht-Human-Tieres mit einem Peptid oder einer Mischung von Peptiden nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und Gewinnung (Abtrennung) der Antikörper oder der Antikörper bildenden Zellen.
7. Antikörper nach einem der Ansprüche 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen polyklonalen Antikörper handelt.
8. Antikörper nach einem der Ansprüche 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie einer Mischung von monoklonalen Antikörpern entsprechen.
9. Antikörper nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass er die Fähigkeit hat, Apo B100 zu präzipitieren (auszufällen).
10. Verfahren zur Herstellung eines spezifischen Anti-Apo B100-Antikörpers, das umfasst die Verabreichung eines Peptids nach einem der Ansprüche 1 bis 4 an ein Nicht-Human-Tier und die Gewinnung (Abtrennung) der Antikörper oder der Zellen, die einen spezifischen Anti-Apo B100-Antikörper bilden.
11. Verfahren zur Herstellung eines spezifischen Anti-Apo B100-Antikörpers, das umfasst die Verabreichung einer Mischung von Peptiden nach einem der Ansprüche 1 bis 4 an ein Nicht-Human-Tier und die Gewinnung (Abtrennung) von Antikörpern oder Zellen, die einen spezifischen Anti-Apo B100-Antikörper bilden.
12. Verfahren zum Nachweis oder zur quantitativen Bestimmung von Apo B100 in einer biologischen Probe, das umfasst das Inkontaktbringen der Probe mit einem Antikörper nach einem der Ansprüche 5 bis 9 oder mit einem Antikörper, der nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11 hergestellt worden ist, und den Nachweis der Anwesenheit von Antigen-Antikörper-Immunkomplexen.
13. Verfahren zum differentiellen Nachweis oder zur differentiellen quantitativen Bestimmung von Apo B100 und von Apo B48 in einer Probe, das die folgenden Stufen umfasst:
 - (a) Bestimmung der Gesamtmenge von Apo B in einer Probe mit einem Anti-Apo B-Gesamt-Antikörper,
 - (b) Eliminierung von Apo B100 oder von Lipid-Teilchen, die Apo B100 enthalten, aus der Probe mit Hilfe eines spezifischen Anti-Apo B100-Antikörpers nach einem der Ansprüche 5 bis 9 oder eines spezifischen Anti-Apo B100-Antikörpers, der nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11 hergestellt worden ist, und
 - (c) Bestimmung der Menge von Apo B48 in der Probe, die in der Stufe (b) erhalten worden ist, oder in Lipid-Teilchen, die kein Apo B100 in dieser Probe enthalten, mit einem Anti-Apo B-Gesamt-Antikörper.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man in den Stufen (a) und/oder (c) einen polyklonalen Anti-Apo B-Gesamt-Antikörper verwendet.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem in der Stufe (b) verwendeten spezifischen Anti-Apo B100-Antikörper um einen polyklonalen Antikörper oder um eine Mischung von monoklonalen Antikörpern oder um einen Antikörper handelt, der so modifiziert worden ist, dass er die Präzipitation von Immunkomplexen erlaubt.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass der spezifische Anti-Apo B100-Antikörper, der in der Stufe (b) verwendet wird, ein polyklonaler immun-präzipitierender Antikörper ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Anwesenheit eines Antigen-Antikörper-Immunkomplexes durch ELISA, RIA, EIA, Turbidimetrie oder irgendein anderes immunologisches Analyseverfahren bestimmt wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Anwesenheit eines Antigen-Antikörper-Immunkomplexes bestimmt wird durch ein nephelometrisches Analyseverfahren.
19. Verfahren zum differentiellen Nachweis oder zur differentiellen quantitativen Bestimmung von Apo B100 und von Apo B48 in einer biologischen Probe, das umfasst das Inkontaktbringen der genannten Probe mit einem Antikörper nach einem der Ansprüche 5 bis 9 oder mit einem Antikörper, der nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11 hergestellt worden ist, und den indirekten Nachweis der Bildung von Apo B100-Antikörper-Immunkomplexen unter Anwendung eines nephelometrischen Analyseverfahrens.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der biologischen Probe um eine Blut- oder Plasma- oder Serum-Probe oder um eine Probe aus einer interstitiellen Flüssigkeit oder Cerebrospinalflüssigkeit oder einem Überstand einer Zellkultur handelt.
21. Verfahren zum Nachweis des Vorliegens, einer Prädisposition oder eines Risikos der Entwicklung einer Störung, die im Zusammenhang steht mit dem Lipid-Stoffwechsel bei einem Patienten (Individuum), wobei das Verfahren umfasst die differentielle quantitative in vitro-Bestimmung der Mengen von Apo B48 und Apo B100 in einer aus einem Patienten (Individuum) entnommenen Probe mit einem Antikörper nach einem der Ansprüche 5 bis 9 oder mit einem Antikörper, der nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11 hergestellt worden ist.
22. Verfahren nach Anspruch 21 für den Nachweis des Vorliegens, einer Prädisposition oder eines Risikos der Entwicklung von Arteriosklerose oder einer Cardiovascular-Erkrankung, wie beispielsweise einer Coronar-Erkrankung.
23. Verfahren zum Verfolgen einer Behandlung, die dazu bestimmt ist, Störungen zu korrigieren, die mit dem Lipid-Stoffwechsel bei einem Patienten (Individuum) im Zusammenhang stehen, das umfasst die quantitative in vitro-Bestimmung von Apo B100 und/oder von Apo B48 in einer Probe, die aus dem genannten Patienten (Individuum) stammt, mit Hilfe eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 5 bis 9 oder eines Antikörpers, der nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11 hergestellt worden ist.
24. Verfahren nach Anspruch 23 zum Verfolgen einer Behandlung einer Arteriosklerose oder einer Cardiovascular-Erkrankung, wie z.B. einer Coronar-Erkrankung.
25. Verfahren zum Nachweis oder zum Verfolgen des zellulären Einfangs von LDL und Lipoproteinen, die reich an Triglyceriden sind, bei einem Patienten (Individuum), das umfasst den in vitro-Nachweis der Gehalte von Apo B48 und/oder Apo B100, die in Lipid-Teilchen enthalten sind, mit Hilfe eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 5 bis 9 oder eines Antikörpers, der nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11 hergestellt worden ist.
26. Verfahren zur Bewertung des physiologischen Zustandes eines Patienten (Individuum s), das umfasst den in vitro-Nachweis der Gehalte von Apo B48 und/oder Apo B100 in einer Probe, die aus dem genannten Patienten (Individuum) stammt, mit Hilfe von Antikörpern nach einem der Ansprüche 5 bis 9 oder eines Antikörpers, der nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11 hergestellt worden ist.
27. Verwendung von Antikörpern nach einem der Ansprüche 5 bis 9 oder von Antikörpern, die nach einem

Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11 hergestellt worden sind, zum Selektionieren (Klassieren) von Verbindungen oder Lebensmitteldiäten, welche die Serum- oder Plasma-Konzentration von Apo B48 und/oder von Apo B100 modulieren können.

28. Antikörper nach einem der Ansprüche 5 bis 9 oder Antikörper, der nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11 hergestellt worden ist, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper an heterologe Fragmente, wie z.B. Toxine, Markierungsstoffe, Arzneimittel oder irgendein anderes therapeutisches Agens, gekoppelt ist.

29. Verwendung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 5 bis 9 und 28 oder eines Antikörpers, der nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11 hergestellt worden ist, für die Herstellung einer Zusammensetzung, die bestimmt ist für die selektive in vivo-Regulierung(-Steuerung) der Aktivität von Apo B100 bei einem Patienten (Individuum).

30. Pharmazeutische Zusammensetzung, die einen Antikörper nach einem der Ansprüche 5 bis 9 und 28 oder einen Antikörper, der nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11 hergestellt worden ist, und einen Exzipienten oder ein Vehiculum, der (das) pharmazeutisch akzeptabel ist, umfasst.

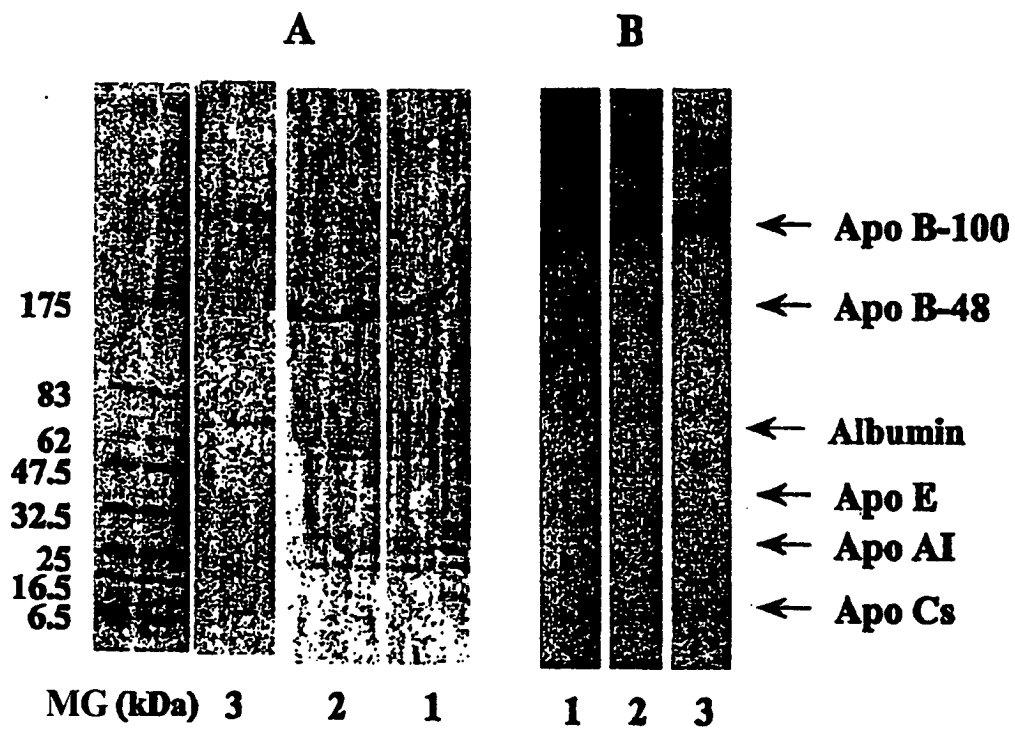
31. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in Verfahren zum Selektionieren (Klassieren) von Verbindungen, welche die Aktivität von Apo B modulieren.

32. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung einer Zusammensetzung, die dazu bestimmt ist, die Aktivität von Apo B100 auf spezifische Weise zu modulieren.

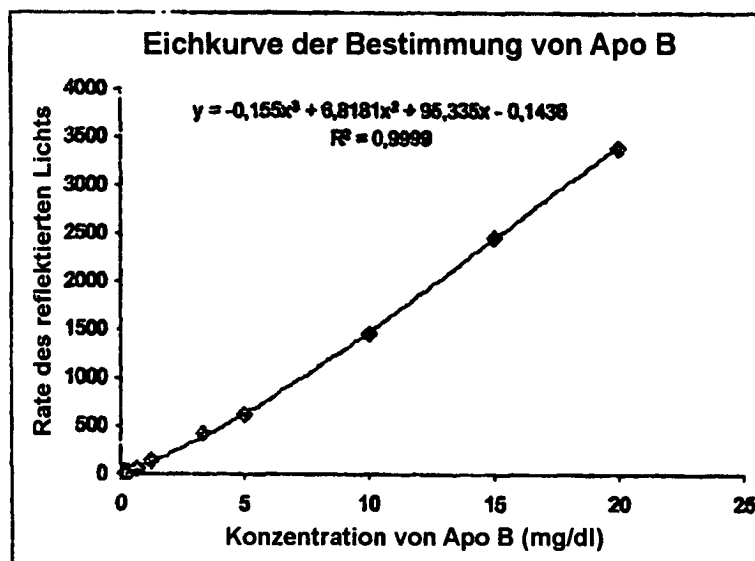
33. Kit, das umfasst ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einen Antikörper nach einem der Ansprüche 5 bis 9 und 28 oder einen Antikörper, der nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11 hergestellt worden ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1



Figur 2