



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 17 019 T2 2005.12.22**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 067 142 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 17 019.5**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 305 736.1**

(96) Europäischer Anmeldetag: **07.07.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.01.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **29.12.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.12.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C07K 16/18**

G01N 33/573, G01N 33/577, G01N 33/68

(30) Unionspriorität:

19323599 07.07.1999 JP

(73) Patentinhaber:

Riken, Wako, Saitama, JP

(74) Vertreter:

**Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183
Wiesbaden**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Morishima, Nobuhiro, Wako-shi, Saitama
351-0198, JP; Nakanishi, Keiko, Omiya-shi,
Saitama 331-0052, JP; Shibata, Takehiko,
Wako-shi, Saitama 351-0198, JP**

(54) Bezeichnung: **Antikörper gegen Spaltprodukte von Vimentin**

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**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen Antikörper gegen das Spaltprodukt von Vimentin, ein Verfahren zur Detektion von Apoptose unter Verwendung dieses Antikörpers, sowie eine Verwendung für diesen Antikörper.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Apoptose ist der Zelltod in mehrzelligen Organismen. Bei Entwicklungsprozessen erzeugte überschüssige Zellen, Zellen, die in einem adulten Organismus nicht länger benötigt werden, durch Strahlung oder chemische Substanzen geschädigte Zellen oder gefährliche Zellen, wie etwa Tumorzellen, werden durch Apoptose zum Zelltod geführt und somit aus dem Körper entfernt.

[0003] Caspasen sind proteolytische Enzyme (Protease), die eine Schlüsselrolle bei der Apoptose spielen. Die Erforschung der Apoptose hat sich seit den 1990er Jahren stark ausgedehnt. Einer der Schlüsselfaktoren, der die Forschung befördert hat, ist die Identifizierung einer Caspase-Familie von Proteasen, die bei der Ausführung der Apoptose beteiligt sind (Thornberry, N. & Lazebnik, Y. (1998) Science, 281, 1312–1316). Mindestens 10 oder mehr Mitglieder der Caspase-Familie sind in Säugern identifiziert worden. Es ist auch gezeigt worden, dass Caspasen als inaktive Vorläufer in normalen Zellen vorliegen. Wenn die Apoptose für eine Zelle, die absterben soll, eingeleitet wird, so aktiviert sich eine Initiator-Caspase aus der Caspase-Familie durch begrenzte Proteolyse (Prozessierung) selbst. Die aktivierte Initiator-Caspase aktiviert eine andere Caspase, indem sie diese partiell spaltet, die gespaltene Caspase aktiviert eine weitere Caspase und der Prozess setzt sich eins nach dem anderen fort. Man nimmt an, dass dieser Mechanismus der Amplifikations-Kaskade die gesamte Aktivierung bewirkt. Alle Caspasen spalten die C-terminale Seite eines spezifischen Asparaginsäurerestes in einem Protein, wobei jedoch die Effizienz der Spaltung eines jeden Mitglieds der Caspase-Familie in Abhängigkeit von den Aminosäuresequenzen nahe der Spaltstelle variiert.

[0004] Die durch Stimulierung mittels des anti-Fas-Antikörpers ausgelöste Apoptose ist die am besten untersuchte Apoptose, von der man annimmt, dass sie eine zentrale Rolle im adulten Organismus spielt (Nagata, S. (1997) Cell 88, 355–365). Caspase-8, die an der Ausführung der Apoptose beteiligt ist, ist das erste Mitglied der Caspase-Familie, das nach Stimulierung mit dem anti-Fas-Antikörper in Zellen aktiviert wird und fungiert somit als Initiator (Bodini, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. & Wallach, D. (1996) Cell 85, 803–815; Muzio, M., Chinnaiyan,

A.M., Kishkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Kramer, P.H., Peter, M.E. & Dixit, V.M. (1996) Cell, 85, 817–827).

[0005] Es sind mehrere Verfahren zur Detektion der Aktivierung einer Caspase verwendet worden, wie etwa 1) Die Detektion der Prozessierung einer Caspase oder deren Aktivierung unter Verwendung eines Antikörpers, der eine Caspase erkennt; oder 2) Messen der Proteaseaktivität unter Verwendung eines Substratanalogons. Ein jedes dieser Verfahren hat jedoch insofern einen Nachteil, als die Möglichkeit, zwischen Mitgliedern der Caspase-Familie zu unterscheiden, begrenzt ist. Bei dem Verfahren nach 1) ist die Herstellung eines spezifischen Antikörpers, der in der Lage ist, sowohl einen inaktiven Vorläufer als auch einen aktiven Typ zu erkennen, oft schwierig.

[0006] MORISHIMA („Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action“, GENES TO CELLS 1999, Band 4, Seiten 401–414) beschreibt die Spaltung von Vimentin durch Caspase-8, die an mehreren Stellen des Proteins, z.B. zwischen Asp259 und Val260, in einem frühen Stadium der Apoptose erfolgt. Der Nachweis der Vimentin-Spaltung in apoptotischen Zellen erfolgt mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung eines monoklonalen anti-Vimentin-Antikörpers, der sowohl mit dem intakten Protein als auch mit dessen gespaltenen Fragmenten interagiert.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Antikörper gegen das Spaltprodukt von Vimentin bereitzustellen, das einen Hauptbestandteil eines Zytoskelett-Proteins darstellt; ein Verfahren zur Detektion der Apoptose unter Verwendung dieses Antikörpers bereitzustellen; sowie weiterhin eine Verwendung für den Antikörper bereitzustellen.

[0008] Als Ergebnis intensiver und ausgedehnter Forschung in Richtung der oben genannten Zielsetzung haben die Erfinder schließlich herausgefunden, dass Vimentin in einer apoptotischen Zelle spezifisch durch Caspase-8 gespalten wird, und sie waren erfolgreich darin, einen Antikörper herzustellen, der in der Lage ist, die spezifische Spaltung von Vimentin zu detektieren.

[0009] Folglich betrifft die vorliegende Erfindung einen Antikörper oder ein Fragment davon, der ein N- oder C-terminales Fragment von Vimentin erkennt, wobei das N-terminale Fragment wenigstens 5 Aminosäurereste von Asp259 bis zu dem N-Terminus von Vimentin umfasst und wobei das C-terminale Fragment wenigstens 5 Aminosäurereste von Val260

bis zu dem C-Terminus von Vimentin umfasst, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper oder das Fragment davon mit dem Spaltprodukt von Vimentin, das durch die Spaltung von intaktem Vimentin zwischen Asp259 und Val260 erhalten wird, reagiert, aber nicht mit intaktem Vimentin reagiert.

[0010] Das Spaltprodukt von Vimentin ist ein Spaltprodukt, das durch die Wirkung von Caspase-8 erhalten wird.

[0011] Der oben genannte Antikörper kann entweder ein polyklonaler Antikörper oder ein monoklonaler Antikörper sein.

[0012] Vimentin umfasst die Sequenzen, die als SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 4 angegeben sind.

[0013] Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers oder eines Fragments davon, der mit einem Spaltprodukt von Vimentin, das zwischen Asp259 und Val260 gespalten ist, reagiert, aber nicht mit intaktem Vimentin reagiert, mit den Stufen, in denen man

- (a) durch Immunisierung mit einem antigenen Polypeptid mit N- oder C-terminalen Fragmenten von Vimentin eine Immunantwort in einem nicht-menschlichen Säuger auslöst, wobei das N-terminale Fragment wenigstens 5 Aminosäurereste von Asp259 bis zu dem N-Terminus von Vimentin umfasst, und wobei das C-terminale Fragment wenigstens 5 Aminosäurereste von Val260 bis zu dem C-Terminus von Vimentin umfasst,
- (b) ein Hybridom aus Lymphoidzellen des Wirts herstellt,
- (c) ein Hybridom auswählt, welches einen monoklonalen Antikörper produziert, der mit einem Spaltprodukt von Vimentin, aber nicht mit intaktem Vimentin reagiert, und
- (d) optional den monoklonalen Antikörper zu einem Fragment davon verarbeitet und
- (e) den Antikörper oder das Fragment davon gewinnt.

[0014] Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung einen monoklonalen Antikörper oder ein Fragment davon, der durch das vorstehend genannte Verfahren erhältlich ist.

[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers, der mit einem Spaltprodukt von Vimentin, welches zwischen Asp259 und Val260 gespalten ist, reagiert, aber nicht mit intaktem Vimentin reagiert, mit den Stufen, in denen man

- (a) durch Immunisierung mit einem antigenen Polypeptid, das N- oder C-terminale Fragmente von Vimentin umfasst, eine Immunantwort in einem

nicht-menschlichen Säuger auslöst, wobei das N-terminale Fragment wenigstens 5 Aminosäurereste von Asp259 bis zu dem N-Terminus von Vimentin umfasst, und wobei das C-terminale Fragment wenigstens 5 Aminosäurereste von Val260 bis zu dem C-Terminus von Vimentin umfasst,
 (b) Antiserum aus dem Blut des nicht-menschlichen Säugers gewinnt und
 (c) den Antikörper oder ein Fragment davon gewinnt.

[0016] Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung einen polyklonalen Antikörper oder ein Fragment davon, der durch das vorstehend genannte Verfahren erhältlich ist.

[0017] Das Spaltprodukt von Vimentin wird durch die Wirkung von Caspase-8 erhalten; dabei umfasst Vimentin die Sequenz, die als SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 4 angegeben ist.

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum Detektieren von Caspase-Aktivität in vitro oder ein Verfahren zum Feststellen von Apoptose in vitro, bei dem man den oben genannten Antikörper oder ein Fragment davon mit einem Spaltprodukt von Vimentin reagieren lässt und das resultierende Reaktionsprodukt feststellt.

[0019] Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit für die Detektion von Apoptose, welches den oben genannten Antikörper oder ein Fragment davon umfasst.

[0020] Die vorliegende Erfindung wird nun im Detail beschrieben.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0021] [Fig. 1](#) zeigt ein schematisches Diagramm der Spaltstelle für Caspase in Vimentin.

[0022] Die [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) zeigen Photographien einer Western-Blot-Analyse.

[0023] [Fig. 4](#) zeigt Photographien indirekter Immunfluoreszenzfärbung von apoptotischen Zellen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0024] Die vorliegende Erfindung betrifft einen Antikörper, der spezifisch das Spaltprodukt von Vimentin erkennt, jedoch mit dem vollständigen Vimentin (intaktem Vimentin), einem Substrat einer Caspase (z.B. Caspase-8), die im Anfangsstadium der Apoptose aktiviert wird, nicht reagiert. Um die Aktivität von Caspasen festzustellen, haben die vorliegenden Erfinder durch ihr Augenmerk auf Veränderungen des

Substrats (Vimentin), nicht jedoch der Caspase selbst, einen Antikörper produziert, der mit einer Spaltstelle eines Substrats, das von einer Caspase gespalten wird, reagiert. Daher kann die Aktivierung einer Caspase nun mit hoher Empfindlichkeit detektiert werden, und zwar unabhängig von dem Probenformat, wie etwa einem Gewebe oder einer Zelle.

[0025] Unter den Aminosäuresequenzen des Vimentin-Proteins haben die vorliegenden Erfinder einen Asparaginsäurerest an einer spezifischen Stelle identifiziert, die durch Caspase-8 gespalten wird. Oligopeptide, die eine Sequenz an der N-terminalen Seite oder C-terminalen Seite des Asparaginsäurerestes besitzen, wurden chemisch synthetisiert und dazu verwendet, um ein Kaninchen zu immunisieren. Nach mehreren Immunisierungen wurde Antiserum gewonnen. Dann wurde ein Antikörper, der stark an die zur Immunisierung verwendeten Oligopeptide bindet, aus dem Antiserum gereinigt. Der gereinigte Antikörper bindet nicht an intaktes Vimentin-Protein, bindet jedoch spezifisch an ein durch Caspase-8 gespaltenes Produkt. Durch die Verwendung dieses Antikörpers bei der Western Blot-Analyse und durch Immunfärbung von Zellen und Geweben wird die Feststellung der Aktivierung von Caspase-8 möglich, indem das Vimentin entweder in vitro, in einer Gewebeprobe oder in einer Zellprobe gespalten wird.

[0026] Der Begriff „Antikörper“ stellt bei der vorliegenden Erfindung das vollständige Antikörpermolekül oder dessen Fragmente (z.B. Fab- oder F(ab')₂-Fragment) dar, das an das Spaltprodukt von Vimentin als einem Antigen binden kann. Der Antikörper dieser Erfindung kann ein polyklonaler oder monoklonaler Antikörper sein.

[0027] Antikörper der vorliegenden Erfindung können mittels verschiedener Verfahren hergestellt werden. Derartige Herstellungsverfahren für Antikörper sind in der Technik bekannt (z.B. siehe Harlow E. & Lane D., Antibody, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)).

1 Herstellung von Antikörpern, die mit Spaltprodukten von Vimentin reagieren.

[0028] (1) Herstellen der Antigene: Vimentin, auf das Caspasen einwirken, ist ein Intermediärfilament-Protein, das charakteristisch ist für mesenchymale Zellen, wie etwa Fibroblasten und Leukozyten.

[0029] [Fig. 1](#) ist ein Schema, das eine Stelle eines Intermediärfilament-Proteins, Vimentin, zeigt, die von einer Caspase gespalten werden soll, wenn Apoptose durch Behandlung mit anti-Fas-Antikörper eingeleitet wird. Bei der vorliegenden Erfindung verwendete Caspasen beinhalten Caspase-8. Caspase-8 erkennt und schneidet die C-terminale Seite von Asp-259 einer Aminosäuresequenz von Vimentin im

Menschen oder in der Maus (SEQ ID NO:3 für den Menschen, SEQ ID NO:4 für die Maus). Gemäß der vorliegenden Erfindung können zwei Typen von Antikörpern gegen Vimentin-Protein oder Vimentin-Peptid, das durch Caspase-8 zwischen Asp-259 und Val-260 geschnitten wird, hergestellt werden: ein Antikörper, der das resultierende N-terminale Fragment erkennt (als V1-Antikörper bezeichnet) und ein Antikörper, der das resultierende C-terminale Fragment erkennt (als V2-Antikörper bezeichnet) (siehe [Fig. 1](#)).

[0030] Wenn der V1-Antikörper hergestellt wird, kann ein Protein- oder Peptidfragment, umfassend maximal 259 Aminosäurereste, bevorzugt 6 Aminosäurereste, oder bevorzugter 5 Aminosäurereste, von Asp-259 bis zum 1. Met am N-Terminus, bezogen auf eine Aminosäuresequenz gemäß Darstellung in SEQ ID NO: 3 oder 4, als Antigen verwendet werden. Wenn der V2-Antikörper hergestellt wird, kann entsprechend ein Protein- oder Peptidfragment, umfassend maximal 207 Aminosäurereste, bevorzugt 6 Aminosäurereste, bevorzugter 5 Aminosäurereste, von Val-260 bis Glu-466 am C-Terminus, bezogen auf eine Aminosäuresequenz gemäß Darstellung in SEQ ID NO: 3 oder 4, als Antigen verwendet werden. Um die Antigenizität weiter zu verbessern, unterzieht man jedes der obigen Protein- oder Peptid-Fragmente bevorzugt einer Kupplungsreaktion an dem anderen Terminus als demjenigen, der aus der Caspase-Spaltung resultiert. Zur Erleichterung der Kupplungsreaktion ist es bevorzugt, dass ein Cys-Rest an den Protein- oder Peptid-Terminus gebunden wird.

(2) Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Spaltprodukte von Vimentin

(i) Gewinnung Antikörper-produzierender Zellen

[0031] Proteine oder Peptide, wie in (1) hergestellt, werden Säugern, wie etwa Ratte, Maus oder Kaninchen, als Antigene verabreicht. Wenn kein Adjuvans eingesetzt wird, wird eine Dosierung von 0,1 bis 100 mg des Antigens pro Tier verwendet, wenn ein Adjuvans eingesetzt wird, liegt die Dosis des Antigens bei 1 bis 100 µg. Die Adjuvantien beinhalten Freundes vollständiges Adjuvans (FCA), Freundes unvollständiges Adjuvans (FIA) und Aluminiumhydroxid-Adjuvans. Die Immunisierung wird hauptsächlich mittels intravenöser, subkutaner oder intraperitonealer Injektion durchgeführt. Darüber hinaus sind die Intervalle der Immunisierung nicht spezifisch begrenzt. Die Immunisierung wird 1- bis 10-mal durchgeführt, bevorzugt 2- bis 5-mal, in Intervallen von mehreren Tagen bis mehreren Wochen, bevorzugt in Intervallen von 2 bis 5 Wochen. Ein bis 60 Tage, bevorzugt 1 bis 14 Tage, nach der letzten Immunisierung werden die Antikörper-produzierenden Zellen gewonnen. Beispiele für Antikörper-produzierende Zellen beinhalten Milzzellen, Lymphknotenzellen, periphere Blutzellen, be-

vorzugt Milzzellen oder lokale Lymphknotenzellen.

(ii) Zellfusion

[0032] Die Antikörper-produzierenden Zellen werden mit Myelomazellen fusioniert, um Hybridome zu erhalten. Myelomazellen zur Fusion mit den Antikörper-produzierenden Zellen können allgemein erhältliche, etablierte Zelllinien von Tieren, wie etwa der Maus, beinhalten. Bevorzugt besitzen die hier verwendeten, etablierten Zelllinien Wirkstoff-Selektivität und können im unfusionierten Zustand nicht in HAT-Selektionsmedium überleben, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält, sondern können darin nur überleben, wenn sie mit den Antikörper-produzierenden Zellen fusioniert werden. Spezifische Beispiele für Myelomazellen beinhalten Maus-Myelomazelllinien, wie etwa X63Ag.8.653, NSI/1-Ag4-1 und NS0/1; sowie Ratten-Myelomazelllinien, wie etwa YB 2/0.

[0033] Im nächsten Schritt werden die Myelomazellen mit den Antikörper-produzierenden Zellen fusioniert. Kurz dargestellt, werden 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml an Antikörper-produzierenden Zellen mit 2×10^5 bis 2×10^6 Zellen/ml an Myelomazellen in einem tierischen Zellkulturmedium, wie etwa Serum-freiem DMEM oder RPMI-1640, gemischt. Bevorzugte Zellverhältnisse der Antikörper-produzierenden Zellen zu den Myelomazellen sind 2:1 bis 3:1. Dann wird die Fusionsreaktion in Gegenwart eines Zellfusions-Promotors durchgeführt. Der Zellfusions-Promotor ist z.B. Polyethylenglykol mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 1.000 bis 6.000 Dalton. Weiterhin kann eine kommerziell erhältliche Zellfusionsvorrichtung, die eine Stimulation über elektrische Pulse verwendet, z.B. Elektroporation, verwendet werden, um die Antikörper-produzierenden Zellen mit den Myelomazellen zu fusionieren.

(iii) Selektion und Klonierung der Hybridome

[0034] Hybridome von Interesse werden aus den fusionierten Zellen selektiert. Zuerst wird die Zellsuspension mit einem Medium, wie etwa RPMI-1640, enthaltend fetales Kälberserum, in geeigneter Weise verdünnt, dann werden etwa 3×10^5 Zellen/Well in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben, es wird Selektionsmedium zu jedem Well hinzu gegeben, und die Zellen werden kultiviert, wobei das Selektionsmedium in geeigneter Weise erneuert wird. Zellen, die etwa 14 Tage nach dem Start der Kulturen in Selektionsmedium wachsen, können als Hybridome gewonnen werden.

[0035] Dann werden die Überstände der Hybridomazell-Kulturen mittels Durchtestens auf die Anwesenheit eines Antikörpers, der mit dem Spaltprodukt von Vimentin reagiert, überprüft. Das Durchtesten der Hybridome kann mittels eines beliebigen konven-

tionellen Verfahrens durchgeführt werden und ist nicht in besonderer Weise eingeschränkt. Beispielsweise kann ein Teil des Kulturüberstandes, der sich in einer Probenvertiefung befindet, in dem ein Hybridom herangewachsen ist, gesammelt und unter Verwendung eines Enzym-Immunoassays oder eines Radioimmunoassays einem solchen Test unterzogen werden.

[0036] Die Klonierung der fusionierten Zellen wird mittels des Verfahrens der begrenzenden Verdünnung oder dergleichen durchgeführt. Schließlich werden die Hybridome, die Zellen darstellen, die monoklonale Antikörper produzieren, die mit dem Spaltprodukt von Vimentin reagieren, jedoch nicht mit intaktem Vimentin reagieren, etabliert.

(iv) Gewinnung monoklonaler Antikörper

[0037] Monoklonale Antikörper können unter Verwendung konventioneller Verfahren, wie etwa einem Zellkultur-Verfahren und einem Verfahren der Aszites-Bildung, aus etablierten Hybridomen gewonnen werden.

[0038] Bei dem Zellkultur-Verfahren lässt man Hybridome in Kulturmedium für tierische Zellen, wie etwa RPMI-1640 oder MEM-Medium mit 10% fetalem Kälberserum oder Serum-freiem Medium, unter konventionellen Kulturbedingungen (z.B. bei 37°C und 5% CO₂) für 7 bis 14 Tage wachsen. Die Antikörper werden dann aus den Kulturüberständen gewonnen.

[0039] Bei dem Verfahren der Aszites-Bildung werden etwa 1×10^7 Zellen von Hybridomen intraperitoneal Tieren derselben Säugerspezies verabreicht, wie derjenigen, von der die Myelomazellen abgeleitet wurden, sodass eine große Anzahl an Hybridomen heranwächst. Nach 1 bis 2 Wochen wird Bauchhöhlenflüssigkeit abgenommen.

[0040] Wenn bei den oben beschriebenen Gewinnungsverfahren eine Reinigung der Antikörper erforderlich ist, so können die Antikörper mittels bekannter Verfahren, wie etwa einem Ammoniumsulfat-Verfahren, Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration und Affinitätschromatographie, gereinigt werden. Diese Verfahren können unabhängig voneinander oder in Kombination verwendet werden.

(3) Herstellung polyklonaler Antikörper gegen das Spaltprodukt von Vimentin

[0041] Antigene, die gemäß obiger Beschreibung hergestellt wurden, werden Säugern, wie etwa Ratte, Maus und Kaninchen, verabreicht. Wenn kein Adjuvans eingesetzt wird, wird eine Dosierung von 0,1 bis 100 mg des Antigens pro Tier verwendet, wenn Adjuvans eingesetzt wird, liegt die Dosis des Antigens bei 10 bis 1000 µg. Die bei dieser Erfindung verwendeten

Adjuvantien beinhalten Freund's vollständiges Adjuvans (FCA), Freund's unvollständiges Adjuvans (FIA) und Aluminiumhydroxid-Adjuvans. Die Immunisierung wird hauptsächlich mittels intravenöser, subkutaner oder intraperitonealer Injektion durchgeführt. Die Intervalle der Immunisierung sind nicht spezifisch festgelegt. Die Immunisierung wird 1- bis 10-mal durchgeführt, bevorzugt 2- bis 5-mal, in Intervallen von wenigen Tagen bis wenigen Wochen, bevorzugt in Intervallen von 2 bis 5 Wochen. Sechs bis 60 Tage nach der letzten Immunisierung wird der Antikörpertiter unter Verwendung von ELISA (Enzym-gekoppelter Immunosorptions-Assay), EIA (Enzym-Immunoassay) oder RIA (Radioimmunoassay) gemessen. An dem Tag, an dem sich ein maximaler Antikörpertiter zeigt, wird Blut abgenommen, um Antiserum zu erhalten.

[0042] Nachfolgend wird die Reaktivität der polyklonalen Antikörper im Antiserum gegen das Spaltprodukt von Vimentin mittels ELISA gemessen. Es werden polyklonale Antikörper selektiert, die eine starke Reaktivität gegen das Spaltprodukt von Vimentin zeigen, jedoch keine Reaktivität gegenüber intaktem Vimentin zeigen.

[0043] Beispielsweise werden die polyklonalen Antikörper im Anti-Serum auf eine Affinitätssäule aufgetragen, an der das Spaltprodukt von Vimentin fixiert ist, wodurch Antikörper (als an der Säule adsorbierte Fraktion) gewonnen werden, die mit dem Spaltprodukt von Vimentin reagieren. Dann werden die resultierenden Antikörper auf eine Affinitätssäule gebracht, an der intaktes Vimentin fixiert ist, wodurch Antikörper gewonnen werden, die keine Adsorption zeigen, sondern durchfließen. Zum Schluss werden die erhaltenen Antikörper ELISA unterworfen, um zu bestätigen, dass sie mit dem Spaltprodukt von Vimentin, jedoch nicht mit intaktem Vimentin reagieren.

2. Verfahren zur Detektion von Apoptose

[0044] Der obige Antikörper kann verwendet werden, um gemäß der vorliegenden Erfindung das Spaltprodukt von Vimentin zu detektieren (z.B. zu quantifizieren). Beispielsweise kann eine Probe, die das Spaltprodukt von Vimentin enthält, mit dem monoklonalen oder polyklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung inkubiert werden, gefolgt von einem Anti-Maus-IgG-Antikörper, der mit einem Enzym, wie etwa Meerrettich-Peroxidase (HRP), markiert ist. Die Menge des Spaltprodukts von Vimentin in der Probe kann durch Messen der Intensität der während der Enzymreaktion gebildeten Farbe mittels einer Messvorrichtung bestimmt werden. Der gemessene Wert kann als ein Indikator für die Bestimmung der Caspase-Aktivität verwendet werden. Ein höherer gemessener Wert entspricht einer gesteigerten Caspase-Aktivität, was anzeigt, dass die Apoptose der Testzelle fortgeschritten ist.

[0045] Der Antikörper der vorliegenden Erfindung kann auch verwendet werden, um Apoptose durch Umsetzen des Antikörpers mit Zellen in einer biologischen Probe zu detektieren. Beispielsweise kann die zu untersuchende Probe mit dem obigen Antikörper inkubiert werden. Das in der Probe vorliegende Spaltprodukt von Vimentin kann detektiert und quantifiziert werden, indem ein Anti-Maus-IgG-Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markiert ist, gemäß konventioneller Verfahren verwendet wird.

[0046] Ein Messwert, der größer als die Negativkontrolle ist, zeigt eine höhere Aktivität der Caspase an. Im Gegensatz dazu zeigt ein Messwert, der geringer als eine Positivkontrolle ist, eine niedrigere Caspase-Aktivität an. Diese Messwerte können als Daten zur Bestimmung des Fortschreitens der Apoptose verwendet werden. Beispielsweise können sie als Indikatoren für das Fortschreiten von Autoimmunerkrankungen, wie etwa von systemischem Lupus erythematoses (SLE), autoimmuner hämolytischer Anämie und Basedow-Erkrankung oder des erworbenen Immunschwächesyndroms (AIDS) verwendet werden.

3. Reagenz, das den Antikörper der vorliegenden Erfindung enthält

[0047] Der Antikörper gegen das Spaltprodukt von Vimentin kann gemäß der vorliegenden Erfindung für verschiedene Reagenzien verwendet werden. Wenn der Antikörper beispielsweise als Reagenz zur Detektion des Spaltprodukts von Vimentin verwendet wird, so kann die Detektion unter Verwendung der in Abschnitt 2 oben dargestellten Prozedur durchgeführt werden. Das Reagenz gemäß der vorliegenden Erfindung kann beispielsweise einen Anti-Maus-IgG-Antikörper enthalten, der mit HRP markiert ist, einen mit HRP markierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, ein Substrat für HRP und einen Puffer, und ebenso den oben genannten Antikörper.

[0048] Alternativ, wenn der Antikörper der vorliegenden Erfindung als Reagenz für die immunhistochemische Färbung verwendet wird, so kann die Detektion gemäß eines konventionellen Verfahrens für immunhistochemische Färbung durchgeführt werden. In diesem Fall kann das Reagenz gemäß der vorliegenden Erfindung z.B. einen mit HRP markierten Anti-Maus-IgG-Antikörper, einen fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-IgG-Antikörper, ein Substrat für HRP und einen Puffer, sowie den oben genannten Antikörper enthalten. Beispielsweise können verschiedene mikroskopische Gewebeschnitte, die aus einer Biopsie eines SLE-Patienten stammen, mittels konventioneller Verfahren hergestellt werden, um mit dem Antikörper der vorliegenden Erfindung zu reagieren. Diese Schnitte können mit einem Anti-Maus-IgG-Antikörper, markiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP), als sekundärem Antikörper inkubiert werden, und dann

mit einem Substrat wie 3,3'-Diaminobenzidin behandelt werden, um braune Farbe zu entwickeln. Die in den Schnitten aufgefundenen braunen Bereiche zeigen an, dass eine Caspase in diesem Gebiet aktiv geworden ist.

BEISPIELE

[0049] Die vorliegende Erfindung wird in den folgenden Beispielen weiter erläutert. Diese Beispiele dienen nur dem Zweck der Veranschaulichung und sind nicht als Einschränkung des Schutzbereichs der Erfindung zu verstehen.

Beispiel 1: Herstellung von Antikörpern

(a) Materialien

[0050] Die zur Immunisierung verwendeten Peptide wurden von der Biologica Co. (Nagoya, Japan) bezogen. Aktiviertes Hämocyanin („Imject Maleimide-KLH“) wurde von Pierce (Rockford, IL, USA) bezogen. FMP-aktiviertes Cellulofine wurde von der Seikagaku Corp. (Tokyo, Japan) bezogen. Andere biochemische Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan) bezogen.

(b) Kupplung der chemisch synthetisierten Peptide an Trägerproteine

[0051] Die synthetisierten Peptide (2 mg) wurden in Dulbeccos Phosphatpuffer (hier im folgenden als PBS bezeichnet; Harlow E. & Lane, D. (1988) „Antibody“, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) gelöst. Diese Peptide besitzen die folgenden Sequenzen: Cys-Gln-Ile-Asp-Val-Asp (SEQ ID NO: 1; bezeichnet als Sequenz V1) bzw. Val-Ser-Lys-Pro-Asp-Cys (SEQ ID NO:2; bezeichnet als Sequenz V2).

[0052] Die Sequenzen V1 und V2 entsprechen den fünf Aminosäureresten, die sich unmittelbar N-terminal bzw. C-terminal zu der Spaltstelle von Caspase-8 in dem Vimentin-Protein befinden, und die jeweils einen Cys-Rest für die Kupplungsreaktion an den anderen Terminus besitzen, der nicht an der Spaltstelle von Caspase-8 liegt ([Fig. 1](#)). Die Sequenzen V1 und V2 wurden in 400 µl bzw. 200 µl PBS gelöst. Jede Lösung wurde mit 200 µl an aktiviertem Hämocyanin (Imject Maleimide-KLH) gemischt, um die Kupplungsreaktion zu starten. Jedes Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur behutsam für 2,5 Stunden rotiert. Das Reaktionsprodukt wurde bei 4°C gegen PBS dialysiert, um nicht-umgesetzte Peptide zu entfernen. Das resultierende Peptid-Träger-Konjugat wurde mit PBS auf ein Endvolumen von 5 ml verdünnt.

(c) Immunisierung

[0053] Das obige Peptid-Träger-Konjugat wurde gründlich mit Freund's Adjuvans (Harlow E. & Lane, D. (1988) „Antibody“, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) gemischt und zur Immunisierung einem weißen Neuseeland-Kaninchen subkutan injiziert. Es wurde ein Peptid-Träger-Konjugat verwendet, das pro Injektion 400 µg des Peptids enthielt. Das Kaninchen wurde 4mal, an den Tagen 1, 9, 22 und 31, immunisiert. Das im Kreislauf befindliche Blut wurde 8 Tage nach der letzten Immunisierung gesammelt, um mittels konventioneller Verfahren Antiserum herzustellen.

(d) Vorbereitung der Affinitätssäule zur Reinigung spezifischer Antikörper

[0054] Man ließ 0,3 g an aktiviertem Harz (FMP-aktiviertes Cellulofine) in destilliertem Wasser (50 ml) quellen und füllte das Harz dann in eine Econo-Säule (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Das Harz in der Säule wurde dann mit 10 ml destilliertem Wasser weiter gewaschen. Ein Milligramm des synthetisierten Peptids (Sequenz V1 oder V2) wurde in 10 ml Kupplungspuffer (50 mM Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 8,5) gelöst und mit dem Harz in der Säule gemischt, um die Kupplungsreaktion zu starten. Die Kupplungsreaktion lief über Nacht bei 4°C unter Rotation weiter. Das Harz wurde mit 20 ml Blockierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M Monoethanolamin) bei Raumtemperatur und unter Rotation für 4 Stunden weiter inkubiert, um nicht umgesetztes Harz zu blocken. Im folgenden wurden die nicht umgesetzten Peptide mittels sequenziellen Waschens mit den folgenden Lösungen entfernt (jeweils 20 ml): 1) destilliertes Wasser; 2) 0,1M Gly-HCl (pH 2,5); 3) destilliertes Wasser; 4) Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1M NaCl, 1 % Triton X-100) und 5) destilliertes Wasser.

[0055] Die vorbereitete Affinitätssäule wurde unmittelbar vor ihrem Einsatz zur Affinitätsreinigung mit 10 ml Elutionspuffer (0,1 M Gly-HCl; pH 2,5), 10 ml destilliertem Wasser, gefolgt von 20 ml TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl), gewaschen.

(e) Affinitätsreinigung spezifischer Antikörper aus Antiseren

[0056] Das Antiserum (3 ml für Sequenz V1, 6 ml für Sequenz V2) wurde auf die obige Säule geladen und darin gut mit dem Affinitätsharz gemischt. Man ließ die Säule für 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen, um das Binden des Antikörpers an das Harz zu bewirken. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule nacheinander mit den folgenden Lösungen gewaschen: 1) 10 ml TBS; 2) 30 ml Waschpuffer (siehe oben); 3) 30 ml TBS und 4) 10 ml an 0,15 M NaCl. Die spezifischen Antikörper wurden mit 4 ml Elutionspuffer (siehe oben) eluiert. Die

von der Säule eluierte Proteinfraction wurde unverzüglich mit 1 M Tris (0,2 ml) auf Eis gemischt, um ihren pH in einen neutralen Bereich zu bringen.

[0057] Schließlich wurden 4 ml an anti-V1-Antikörper (2,75 mg/ml) bzw. anti-V2-Antikörper (0,15 mg/ml) erhalten. Die gereinigten Antikörper wurden auf Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gefroren gelagert.

Beispiel 2: Western Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper

[0058] Die humane T-Zelllinie Jurkat oder SKW6.4 (4×10^5 Zellen/ml) wurden durch Behandlung mit 200 ng/ml anti-Fas-Antikörper (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japan) dazu veranlasst, Apoptose durchzumachen. Die Behandlung wurde für 0 bis maximal 8 Stunden fortgesetzt. Die Zellen (jeweils 2×10^6) wurden durch Zentrifugation (1.000 rpm/min, 5 min) gesammelt und dann in PBS suspendiert. Die Zellen wurden erneut gemäß den oben definierten Bedingungen zentrifugiert, um Kulturmedium in der Probe zu entfernen. Jede Zellprobe wurde für 20 Sekunden in 40 μl Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 6M Harnstoff, 2% Natriumdodecylsulfat (SDS), 10% Glycerin, 0,003% Bromphenolblau) für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Proteine in jeder Zellysate-Probe wurden mittels 12% Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, U.K. (1970) Nature, 227, 680–685) aufgetrennt und unter Verwendung einer Transfer-Vorrichtung für halbtrockene Blots („Semidry Blot transfer device“; Nihon EIDO, Tokyo, Japan) auf eine Nitrozellulosemembran überführt, um Western Blots herzustellen.

[0059] Die Western Blots wurden durch das Enzym-Chemilumineszenz-Markierungsverfahren (ECL) (Harlow E. & Lane, D. (1988) „Antibody“, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) immunologisch angefärbt. Als primärer Antikörper diente ein kommerziell erhältlicher anti-Vimentin-Antikörper, V9 (8.8 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) oder der anti-V1- oder anti-V2-Antikörper (0,2 $\mu\text{g/ml}$). Der sekundäre Antikörper war ein anti-Maus oder anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase markiert war (1000-fache Verdünnung, Cappel, Durham, NC, USA). Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Western Blots unter Verwendung des ECL-Plus-Kits (Amersham Japan, Tokyo, Japan) sichtbar gemacht. Die Immunanfärbung erfolgte nach Herstelleranweisungen. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) dargestellt.

[0060] [Fig. 2](#) zeigt Western Blots des Lysats von Jurkat-Zellen, die mit dem anti-Fas-Antikörper behandelt worden waren. Nach der Elektrophorese wurden die Blots mit dem anti-Vimentin-Antikörper

(V9) immunologisch angefärbt. Bei der Behandlung mit dem anti-Fas-Antikörper für mehrere Stunden spalteten Caspasen Vimentin (58 kDa) an maximal drei Stellen in Fragmente verschiedener Größe.

[0061] Wenn das Lysat der Zellen, die die Apoptose durchlaufen, unter Verwendung des anti-V1- oder anti-V2-Antikörpers der Western Blot-Analyse unterzogen wird, so färben diese Antikörper nur Vimentin-Fragmente, die durch Spaltung der Sequenz Ile-Asp-Val-Asp erzeugt worden waren, in spezifischer Weise ([Fig. 3](#)). Der anti-V1-Antikörper detektierte 30 kDa- und 19,5 kDa-Fragmente, während der anti-V2-Antikörper 27 kDa- und 21 kDa-Fragmente detektierte, da weitere Caspasen eine weitere Fragmentierung verursachten, die weitgehend gleichzeitig mit oder nach der Spaltung durch Caspase-8 erfolgte. Andererseits reagierten weder der anti-V1- noch der anti-V2-Antikörper mit intaktem Vimentin (58 kDa), das nicht gespalten worden war (siehe [Fig. 3](#), Spur bei 0 Stunden). Somit zeigt [Fig. 3](#), dass der Antikörper der vorliegenden Erfindung nur Vimentin-Fragmente erkennt, die in Zellen zu finden sind, die Apoptose durchmachen.

Beispiel 3: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung apoptotischer Zellen mit spezifischen Antikörpern

[0062] Die humane T-Zelllinie Jurkat (4×10^5 Zellen/ml) wurde durch Behandlung mit 200 ng/ml anti-Fas-Antikörper (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japan) dazu angeregt, Apoptose durchzumachen.

[0063] Nach der 6-stündigen Behandlung wurden die Zellen ($1,5 \times 10^6$) durch Zentrifugation (1.000 rpm/min, 5 min) gesammelt und dann in PBS suspendiert. Die Zellen wurden erneut unter denselben, oben definierten Bedingungen zentrifugiert, um das Kulturmedium in der Probe zu entfernen.

[0064] Die gesammelten Zellen wurden in kaltem Methanol bei -20°C für 2 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung (Harlow E. & Lane, D. (1988) „Antibody“, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) unterzogen. Zuerst wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 1 Stunde mit dem anti-V1- oder anti-V2-Antikörper (0,2 $\mu\text{g/ml}$ in PBS, enthaltend 3% Rinderserum-Albumin) inkubiert und dann mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde ein fluoreszenzmarkierter anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Alexa 448, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) als sekundärer Antikörper verwendet, der 500-fach verdünnt war und den obigen Zellen für eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur zugegeben wurde. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, um ungebundenen sekundären Antikörper zu entfernen. Das PBS enthielt ein DNA-an-

färbendes Reagenz, DAPI (0,1 µg/ml, Sigma-Aldrich), um die Chromosomen im Zellkern sichtbar zu machen. Die Zellen wurden dann mittels des Fluoreszenz-Mikroskops IX70 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) überprüft.

[0065] Die Ergebnisse sind in [Fig. 4](#) dargestellt. [Fig. 4](#) zeigt eine Photographie der Zellen, die mittels des anti-V2-Antikörpers fluoreszenzgefärbt wurden. Die apoptotischen Zellen konnten durch Kondensation und Fragmentierung ihrer Zellkerne identifiziert werden, wenn das Sichtbarmachen unter Verwendung von DAPI (siehe kleine Pfeile in [Fig. 4](#)) erfolgte. Es wurde beobachtet, dass der anti-V2-Antikörper spezifisch nur solche Zellen anfärbt, die die Apoptose durchlaufen. Zellen, die keine Apoptose durchmachen (siehe große Pfeile in [Fig. 4](#)) werden nicht durch den anti-V2-Antikörper angefärbt. Als Kontrolle wurden Jurkat-Zellen, die nicht mit dem anti-Fas-Antikörper behandelt worden waren, in entsprechender Weise geprüft, was zeigte, dass keine dieser Zellen durch den anti-V2-Antikörper angefärbt wurde.

[0066] Es wurde gezeigt, dass der Antikörper der vorliegenden Erfindung nur mit dem Spaltprodukt von Vimentin, jedoch nicht mit intaktem Vimentin, reagiert.

[0067] Die vorliegende Erfindung kann die Detektion der tatsächlichen Spaltung von Substraten durch Caspasen erreichen, und zwar unabhängig vom Probenformat, wie etwa Protein, Zelle oder Gewebe. Somit erlaubt es einem die vorliegende Erfindung 1) die Umwandlung von Caspase-8 von ihrem Vorläufer in ihre aktive Form zu überwachen; 2) festzustellen, dass die aktive Form von Caspase-8 tatsächlich an ihrem Ort in der Zelle ihre Funktion ausübt; und 3) selektiv die Zellen in Zellpopulationen zu unterscheiden, in denen Caspase-8 aktiv geworden ist.

[0068] Die vorliegende Erfindung stellt den Antikörper bereit, der mit dem Spaltprodukt von Vimentin reagiert, nicht jedoch mit intaktem Vimentin. Durch die Verwendung des Antikörpers der vorliegenden Erfindung kann die Initiator-Caspase, die in aktiver Form vorliegt und Proteine spaltet, identifiziert werden, indem man das Spaltprodukt von Vimentin detektiert.

[0069] Vimentin wird während der Entwicklung in verschiedenen Geweben hochgradig exprimiert. Ebenso wird eine gesteigerte Expression von Vimentin oft beobachtet, wenn das Gewebe krebsartig wird. Dementsprechend kann der Antikörper der vorliegenden Erfindung ein nützliches Reagenz zur Überprüfung der Caspase-Aktivität in sich entwickelnden Geweben oder Krebszellen sein, ebenso zur Detektion von Apoptose oder zur Entscheidung über Behandlungspläne für mit Apoptose zusammenhängende Erkrankungen.

Freitext der Sequenzliste

SEQ ID NO: 1: Synthetisches Peptid

SEQ ID NO: 2: Synthetisches Peptid

Patentansprüche

1. Antikörper oder ein Fragment davon, der ein N- oder C-terminales Fragment von Vimentin erkennt, wobei das N-terminale Fragment wenigstens 5 Aminosäurereste von Asp259 bis zu dem N-Terminus von Vimentin umfaßt

und wobei das C-terminale Fragment wenigstens 5 Aminosäurereste von Val260 bis zu dem C-Terminus von Vimentin umfaßt,

dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper oder das Fragment davon mit dem Spaltprodukt von Vimentin, das durch die Spaltung von intaktem Vimentin zwischen Asp259 und Val260 erhalten wird, reagiert, aber nicht mit intaktem Vimentin reagiert.

2. Antikörper oder ein Fragment davon nach Anspruch 1, wobei das Spaltprodukt von Vimentin durch die Wirkung von Caspase-8 erhalten wird.

3. Antikörper oder ein Fragment davon oder das Fragment davon nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei Vimentin die als SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 4 angegebene Sequenz umfaßt.

4. Antikörper oder Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Antikörper ein polyclonaler Antikörper oder ein monoklonaler Antikörper ist.

5. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon, der mit einem Spaltprodukt von Vimentin, das zwischen Asp259 und Val260 gespalten ist, reagiert, aber nicht mit intaktem Vimentin reagiert, mit den Stufen, in denen man

(a) durch Immunisierung mit einem antigenen Polypeptid mit N- oder C-terminalen Fragmenten von Vimentin eine Immunantwort in einem nicht-menschlichen Säuger auslöst,

wobei das N-terminale Fragment wenigstens 5 Aminosäurereste von Asp259 bis zu dem N-Terminus von Vimentin umfaßt

und wobei das C-terminale Fragment wenigstens 5 Aminosäurereste von Val260 bis zu dem C-Terminus von Vimentin umfaßt,

(b) ein Hybridom aus Lymphoidzellen des Wirts herstellt,

(c) ein Hybridom auswählt, welches einen monoklonalen Antikörper produziert, der mit einem Spaltprodukt von Vimentin aber nicht mit intaktem Vimentin reagiert, und

(d) optional den monoklonalen Antikörper zu einem

Fragment davon verarbeitet und
(e) den Antikörper oder das Fragment davon gewinnt.

6. Verfahren zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers, der mit einem Spaltprodukt von Vimentin, welches zwischen Asp259 und Val260 gespalten ist, aber nicht mit intaktem Vimentin reagiert, mit den Stufen, in denen man

- (a) durch Immunisierung mit einem antigenen Polypeptid, das N- oder C-terminale Fragmente von Vimentin, welches zwischen Asp259 und Val260 gespalten ist, umfaßt, eine Immunantwort in einem nicht-menschlichen Säuger auslöst, wobei das N-terminale Fragment wenigstens 5 Aminosäurereste von Asp259 bis zu dem N-Terminus von Vimentin umfaßt, und wobei das C-terminale Fragment wenigstens 5 Aminosäurereste von Val260 bis zu dem C-Terminus von Vimentin umfaßt,
- (b) Antiserum aus dem Blut des nicht-menschlichen Säugerwirts gewinnt und
- (c) den Antikörper oder das Fragment davon gewinnt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Spaltprodukt von Vimentin durch die Wirkung von Caspase-8 erhalten wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder Anspruch 7, wobei Vimentin die als SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 4 angegebene Sequenz umfaßt.

9. Monoklonaler Antikörper oder Fragment davon, erhältlich nach dem Verfahren gemäß Anspruch 5.

10. Polyklonaler Antikörper oder Fragment davon, erhältlich nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8.

11. Verfahren zum Detektieren von Caspase-Aktivität in vitro, wobei die Caspase Vimentin erkennt und zwischen Asp259 und Val260 spaltet, mit den Stufen, in denen man

- (a) den Antikörper oder das Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 4 mit einem Spaltprodukt von Vimentin reagieren läßt und
- (b) das resultierende Reaktionsprodukt feststellt.

12. Verfahren zum Feststellen von Apoptose in vitro mit den Stufen, in denen man

- (a) den Antikörper oder das Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 4 mit einem Spaltprodukt von Vimentin, das von einer Caspase zwischen Asp259 und Val260 gespalten ist, reagieren läßt und
- (b) das resultierende Reaktionsprodukt feststellt.

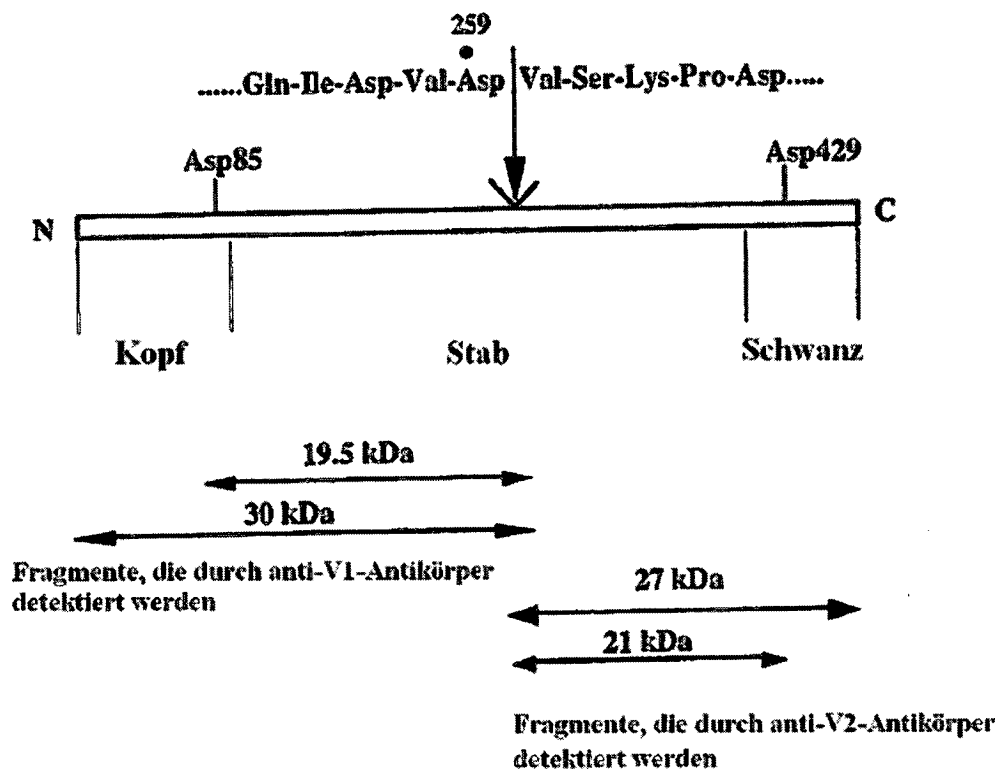
13. Kit für die Detektion von Apoptose, welches den Antikörper oder das Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfaßt.

14. Kit nach Anspruch 13, welches einen ersten Antikörper, einen zweiten Antikörper, der mit einem Enzym markiert ist, Substrat und Puffer umfaßt.

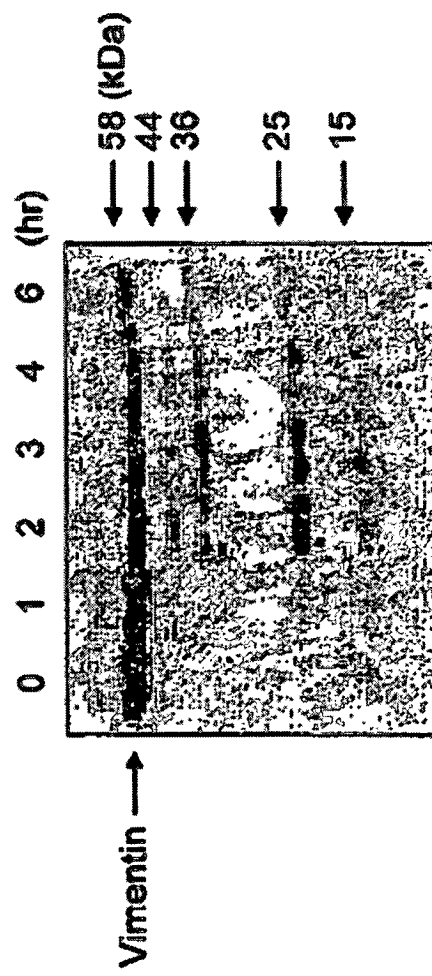
Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1



Behandlungsdauer mit anti-Fas-Antikörper



Spaltung von Vimentin in Jurkat-Zellen, die Apoptose durchmachen

FIG. 2

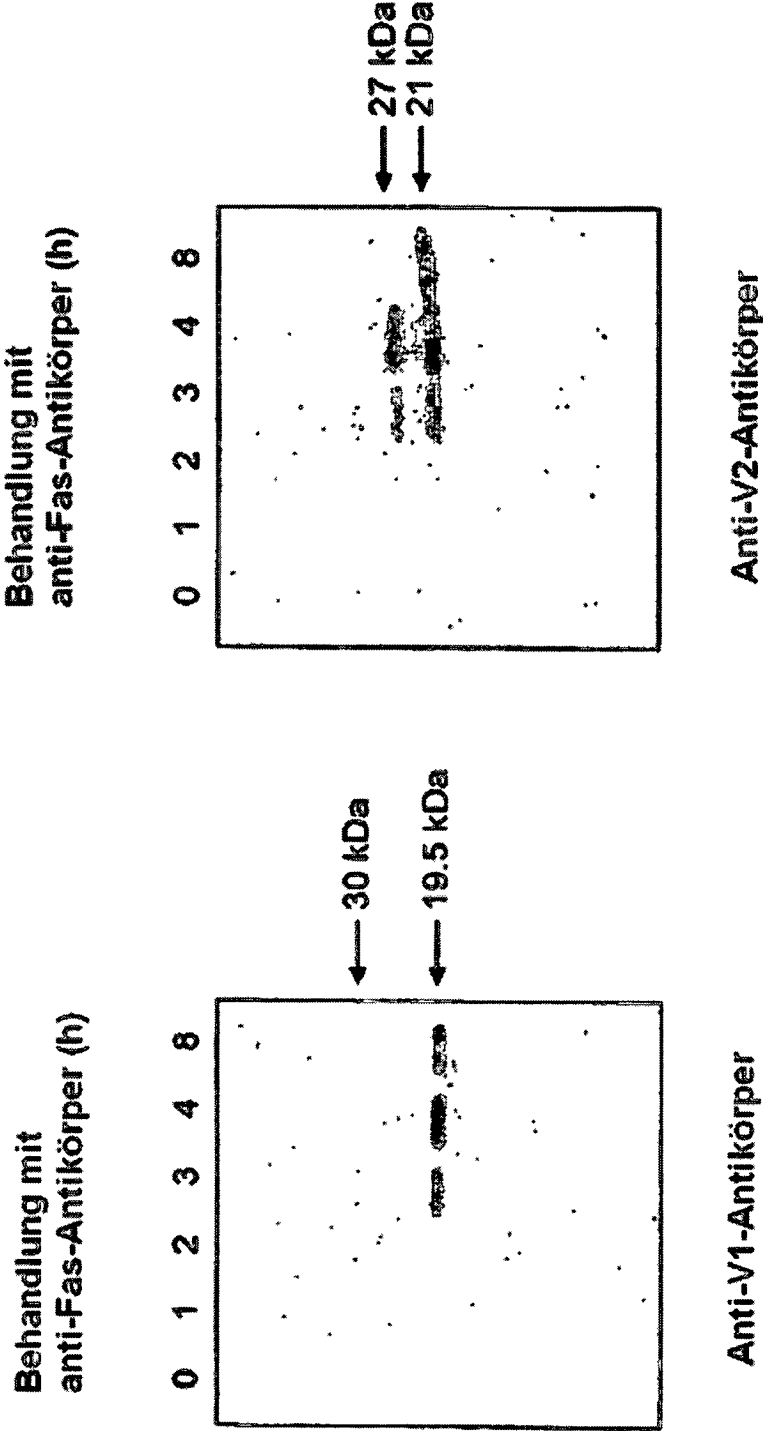
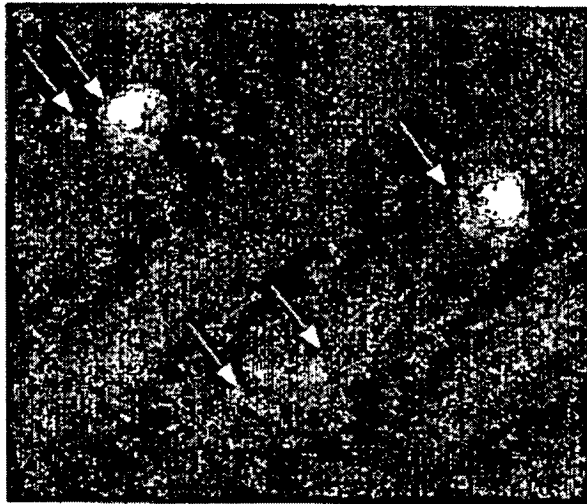
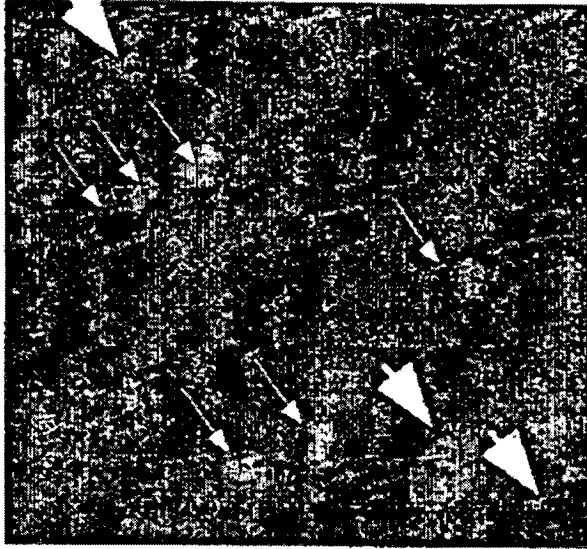


FIG. 3

Färbung mit anti-V2-Antikörper



DAPI-Färbung



Die kleinen Pfeile zeigen die Zellkerne apoptotischer Zellen an.

Die großen Pfeile zeigen die Zellkerne normaler Zellen an.

FIG. 4