(19) **RU** (11) **2 198 894** (13) **C2**

(51) МПК[7] **C 07 K 16/40, G 01 N 33/573//A 61 K 39/395**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 98106859/13, 06.04.1998

(24) Дата начала действия патента: 06.04.1998

(30) Приоритет: 04.07.1997 JP 9-88538

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2000

(46) Дата публикации: 20.02.2003

(56) Ссылки: SCHUMACHER M. et all, A direct immunoradiometric assay for human plasma prorenin: concentrations in cycling women and in women taking oral contraceptives. T. Clin. Endocrinol. Metab. 1992, Aug, 75(2): 617-23. TONOLO G. et all, Similarity between active and trypsin-activated inactive renin in dog plasma by means of renin inhibition: the dog as an animal model for studies of inactive renin, J. Hypertens. 1988 Dec., 6 (12): 975-80. EP 196921, 10.08.1986. JP 07-048280, 21.02.1995.

(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Н.Г. Лебедевой, рег.№ 0112

(71) Заявитель:
ТОКИВА КЕМИКАЛ ИНДАСТРИЗ КО., ЛТД. (JP),
ЮИТИ ИСИДА (JP)

(72) Изобретатель: МУРАКАМИ Казуо (JP), НАКАМУРА Юкио (JP), СУЗУКИ Фумиаки (JP), ИСИДА Юити (JP), ХАТАНО Ясухико (JP)

(73) Патентообладатель:
ТОКИВА КЕМИКАЛ ИНДАСТРИЗ КО., ЛТД. (JP),
ЮИТИ ИСИДА (JP)

(74) Патентный поверенный:
Лебедева Наталья Георгиевна

RU 2198894 C2

(54) НОВОЕ АНТИТЕЛО, СОЕДИНЕНИЕ С АКТИВНОСТЬЮ РЕНИНА, СОДЕРЖАЩЕЕ НОВОЕ АНТИТЕЛО, И СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОРЕНИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОГО АНТИТЕЛА

(57)

В настоящем изобретении предлагается антитело против N-концевого пептида профрагмента проренина человека, способное специфически распознавать пептид, состоящий из 15 аминокислотных остатков в N-концевом пептиде профрагмента проренина человека. Изобретение также относится к комплексу антитела с проренином человека и способу определения проренина человека в крови. С помощью полученного нового антитела и его комплекса с проренином можно в быстрые сроки и с большой точностью провести определение в крови проренина человека. 3 с.п. ф-лы, 8 ил., 1 табл.

RU 2198894 C2

(19) **RU** (11) **2 198 894** (13) **C2**

(51) Int. Cl.[7] **C 07 K 16/40, G 01 N 33/573//A 61 K 39/395**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 98106859/13, 06.04.1998

(24) Effective date for property rights: 06.04.1998

(30) Priority: 04.07.1997 JP 9-88538

(43) Application published: 10.02.2000

(46) Date of publication: 20.02.2003

(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery", pat.pov. N.G. Lebedevoj, reg.№ 0112

(71) Applicant:
TOKIVA KEMIKAL INDASTRIZ KO., LTD. (JP),
JuITI ISIDA (JP)

(72) Inventor: MURAKAMI Kazuo (JP),
NAKAMURA Jukio (JP), SUZUKI Fumiaki (JP), ISIDA Juiti (JP), KhATANO Jasukhiko (JP)

(73) Proprietor:
TOKIVA KEMIKAL INDASTRIZ KO., LTD. (JP),
JuITI ISIDA (JP)

(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) NOVEL ANTIBODY, COMPOUND WITH RENIN ACTIVITY COMPRISING NOVEL ANTIBODY AND METHOD OF PRORENIN ASSAY USING NOVEL ANTIBODY

(57) Abstract:

FIELD: medicine, immunology, analytical biochemistry. SUBSTANCE: invention proposes antibody raised against N-terminal peptide of human prorenin profragment that is able to recognize specifically peptide comprising of 15 amino acid residues by N- terminal peptide of human proprenin profragment. Invention relates also to method of assay of propenin in human blood. Using the novel prepared antibody and its complex with prorenin it is possible to determine prorenin in human blood being rapidly and with high precision. EFFECT: improved method of prorenin assay. 4 cl, 8 dwg, 1 tbl, 5 ex

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2

Обоснование изобретения

Настоящее изобретение относится к новому антителу против N-концевого пептида профрагмента проренина человека, обозначаемого здесь и далее как "pf", способному образовывать иммунный комплекс путем связывания с проренином человека, к соединению с активностью ренина, образуемому при связывании данного антитела с проренином человека, и к реагенту для определения проренина с применением данного антитела.

Проренин представляет собой соединение, обладающее ферментативной активностью, которое продуцируется в основном почками как предшественник ренина полностью зрелого типа, а именно как ренин полностью зрелого типа в сочетании с профрагментом, включающим 43 аминокислотных остатка. Известно, что при различных сосудистых нарушениях, вызываемых диабетом, концентрация проренина человека в плазме растет параллельно тяжести заболевания и снижается при облегчении течения болезни. Соответственно, предполагается, что концентрация проренина человека в крови может служить маркером сосудистых нарушений при диабете (смотри The New England Journal of Medicine, том 312, 1985, стр. 1412-1417, Memoirs of Tokyo Women's Medical College, том 60, 1990, стр. 342-350, и Clinical Investigator, том 71, 1993, стр. 3-6).

В связи с этим ранее было сделано несколько предложений в отношении определения концентрации проренина в плазме человека. Проблема, возникающая при применении этих предшествующих методов, заключается в том, что, поскольку плазма человека содержит наряду с ренином полностью зрелого типа как белка с ферментативной активностью еще и ферментативно неактивный проренин человека как предшественник ренина полностью зрелого типа, должен применяться непрямой метод, в котором проренин человека первоначально частично активируется в плазме с помощью кислоты при низкой температуре и затем превращается в ренин полностью зрелого типа при использовании трипсина, затем следует определение общего количества ренина с помощью ферментативного метода по общей активности ренина, или с помощью иммунологического метода как общего количества активного ренина, а количество проренина человека рассчитывается как разница, получаемая вычитанием отдельно определяемой величины активности ренина с помощью ферментативного метода или количества активного ренина, определенного с помощью иммунологического метода, из описанной выше определяемой общей активности ренина или общего количества активного ренина.

Под "ренином полностью зрелого типа" здесь подразумевается структура, происходящая из проренина после отделения от последнего профрагментной части путем ферментативного процессинга, которая способна проявлять активность ренина, поскольку ее ферментативно активный участок открыт. Указанная выше активность ренина представляет собой ферментативную активность как неотъемлемую функцию ренина полностью зрелого типа, который представляет собой ферментативный белок, а именно белок, избирательно действующий на субстрат ренина (ангиотензиноген) с образованием ангиотензина (Ang I).

Недавно сделано открытие, позволяющее превращать неактивный проренин человека в структуру открытого типа путем использования эффекта его связывания с низкомолекулярным ингибитором ренина, и в результате этого открытия была установлена возможность применения иммунологического метода для определения общей активности ренина с использованием моноклонального антитела, способного специфически узнавать проксимальный участок активной части ренина, и моноклонального антитела, способного узнавать как проренин человека, так и ренин полностью зрелого типа, параллельно с разработкой метода, в котором количество активного ренина определяется без добавки ингибитора ренина для расчета количества ренина человека как разницы между общим активным ренином и активным ренином, определяемым как описано выше (смотри Clinical Chemistry, том 42, 1996, стр. 1051-1063). По сравнению с известным ранее методом, таким как трипсинактивируемый ферментативный метод или метод активации трипсином для определения активности ренина, этот метод, несмотря на выгодность в отношении возможности подавления случайного разрушения трипсином проренина человека и ренина полностью зрелого типа, так же как несмотря на хорошую корреляцию с методом активации трипсином, имеет недостаток, заключающийся в том, что активность ренина, определяемая с его помощью, отклоняется в позитивную сторону по сравнению с действительной активностью ренина для случаев диабета, при которых отмечается рост титра проренина в крови. Более того, этот метод сопровождается трудностями, поскольку каждый раз должно проводиться определение и активности ренина и общей активности ренина.

Кроме того, известен иммунологический метод определения, который является прямым методом, использующим моноклональное антитело, способное узнавать как антиген С-конец pf проренина человека, а именно с 29-го по 43-ий остатки аминокислот, и моноклональное антитело против ренина, способное узнавать как моноклональное антитело, так и ренин полностью зрелого типа (смотри Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, том 75, 1992, стр. 617-623).

Этот метод выгоден, потому что имеет, в дополнение к очень хорошей корреляции с методом активации трипсином, настолько высокую чувствительность, что метод может быть использован даже для определения титра проренина в крови, полученной от здорового донора. С другой стороны, метод имеет дефекты, заключающиеся в том, что имеется тенденция в негативном отклонении величин, полученных этим методом, снижающихся до величины около 80% по сравнению с величинами, полученными методом активации трипсином, эта тенденция становится особенно заметной у больных с заболеванием, обуславливающим рост титра проренина человека, совместно с

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2

неопределенностью в части, касающейся узнавания моноклональных антител против ренина.

Резюме изобретения

Главной целью настоящего изобретения является, соответственно, обеспечение реагентом для определения проренина, способным точно и подходящим образом определять существование диабетических сосудистых нарушений путем преодоления недостатков метода активации трипсином и непрямого метода определения проренина человека посредством определения общей активности активированного ренина с применением ингибитора ренина, а также прямого иммунологического метода определения с применением известных ранее антител, способных узнавать как антиген С-конец pf проренина человека.

Таким образом, в настоящем изобретении предоставляется антитело против N-концевого пептида профрагмента проренина человека, способное специфически узнавать как антиген пептид, включающий аминокислотные остатки, начиная с первого остатка лейцина до остатка аргинина, занимающего пятнадцатую позицию в N-концевом пептиде профрагмента проренина человека.

Дополнительно в изобретении предоставляется новое соединение с активностью ренина, которое является комплексом проренина человека с указанным выше N-концевым пептидом профрагмента проренина. Это антитело против N-концевого пептида профрагмента проренина человека может применяться как действующий ингредиент в реагенте для определения проренина.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой график, демонстрирующий взаимоотношения между концентрацией IgG и количеством проренина человека в условиях, когда проренин человека взаимодействует с антителом класса IgG против N-концевого пептида pf.

Фиг.2 представляет собой график, демонстрирующий ингибиторную активность антитела против N-концевого пептида pf в результате реакции проренина человека с антителом против N-концевого пептида pf.

Фиг.3 представляет собой график, демонстрирующий дозозависимость активирующей способности комплекса между проренином и антителом класса IgG против N-концевого пептида pf.

Фиг. 4 представляет собой график, демонстрирующий взаимоотношения между проренинсвязывающей способностью антитела класса IgG против N-концевого пептида pf и фракциями элюата при гель-фильтрационной хроматографии.

Фиг. 5 представляет собой график для проведения сравнительного определения молекулярного веса проренина и антитела против N-концевого пептида pf.

Фиг. 6 представляет собой график, демонстрирующий корреляцию между методом активации трипсином и методом, использующим для определения реагент изобретения.

Фиг. 7 представляет собой график, демонстрирующий взаимоотношение между концентрацией проренина и количеством получаемого Ang I.

Фиг.8 представляет собой график, демонстрирующий ферментативную активность реагента для определения изобретения в отношении трех видов проренина человека как функцию концентрации.

Подробное описание предпочтительных воплощений изобретения

Изобретатели предварительно разработали реагент для определения проренина человека с помощью антитела, способного специфически узнавать pf часть проренина человека, состоящую из 43 аминокислотных остатков (смотри Japanese Patent Kokai 8-285852). В результате продолжения исследований они достигли успеха в отношении получения высокоаффинного антитела, способного специфически узнавать как антиген пептид, включающий с 1 по 15 аминокислотные остатки N-конца проренина человека, также было открыто, что в результате взаимодействия этого антитела против N-конца pf с проренином человека образуется соединение с активностью ренина, что дает возможность точного определения титра проренина в крови путем применения конкурентного иммуноферментного метода для определения Ang I (смотри Clinical and Experimental Hypertension - Theory and Practice, том A12, 1990, стр. 83-95), что привело к завершению изобретения, описанного выше на основе этого открытия.

Антитело против N-концевого пептида pf проренина человека в соответствии с настоящим изобретением может быть получено, например, следующим образом.

На первом этапе пептид, состоящий из аминокислотных остатков Leu-Pro-Thr-Asp-Thr-Thr-Thr-Phe-Lys-Arg-Ile-Phe-Leu-Lys-Arg, соответствующий N-концевому пептиду pf проренина человека, синтезировали методом твердофазного пептидного синтеза и пептид, синтезированный таким образом, соединяли с белком-носителем, таким как бычий сывороточный альбумин, овальбумин и гемоцианин моллюска фиссурелии, применяя такой сшивающий агент, как соединение малеимида для получения иммуноантигена.

На следующем этапе каждый из иммуноантигенов тщательно перемешивали с полным адъювантом Фрейнда и иммунизировали половозрелого кролика с массой тела около 2.5 кг путем их введения. Эту иммунизирующую обработку повторяли один раз в каждые две недели и после пятой инъекции отбирали небольшое количество крови из вены периферической части ушной раковины, которое использовали для определения титра антител. Если этот титр антител значительно возрастал, у кролика собирали всю кровь и из крови получали антисыворотку. Полученную таким образом антисыворотку подвергали хроматографии на DEAE Сефарозе для получения антитела класса IgG против N-концевого пептида pf.

Вместо получения поликлональных антител путем иммунизации кролика иммуноантигеном может использоваться альтернативный вариант в виде получения моноклональных антител путем иммунизации мышей иммуноантигеном в соответствии с известным ранее методом.

Количество белка рассчитывали для

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2

антитела класса IgG против N-концевого пептида pf из результатов измерения оптической плотности при длине волны 280 нм, принимая молекулярный вес IgG равным 150 000, обнаруживая титр равным 2.6 мг/мл. Это антитело против N-концевого пептида pf является антителом, проявляющим высокое сродство к проренину человека и специфически взаимодействующим с N-концом pf.

Соединение, проявляющее ферментативную активность, а именно активность ренина, получено путем взаимодействия антитела против N-концевого пептида pf с проренином человека. Процесс получения этого соединения с активностью ренина протекал следующим образом.

Так, раствор проренина человека смешивали с антителом против N-концевого пептида pf, разведенным физиологическим солевым раствором, содержащим бычью сыворотку, и смесь выдерживали при температуре 4°C в течение от 14 до 24 ч. После этого реакционную смесь смешивали с раствором ангиотензиногена овцы как субстрата проренина человека и инкубировали при 37°C в течение 15 мин для проведения дальнейшей реакции с последующим прекращением реакции в условиях охлаждения в ледяной бане.

Соединение с активностью ренина, полученное этим путем, подвергали тестированию на активность по отношению к продукции Ang I, сравнивая с проренином человека, активированным трипсином, для демонстрации того, что рениновая активность антитела против N-концевого пептида pf изменяется в зависимости от степени разведения.

Фиг. 1 прилагаемого чертежа представляет собой график, использующий антитело против N-концевого пептида pf проренина человека в соответствии с настоящим изобретением, как пример, отражающий взаимоотношения между концентрацией IgG при реакции антитела с проренином человека и оптической плотностью реакционной смеси при длине волны 450 нм. Этот график позволяет предположить наличие высокого сродства антитела против N-концевого пептида pf проренина человека, в соответствии с настоящим изобретением, к проренину человека.

Фиг. 2 представляет собой график, отражающий взаимоотношения между концентрацией пептида, в случае если антитело против N-концевого пептида pf проренина человека смешивается с синтетическим N-концевым пептидом pf, и его оптической плотностью при длине волны 450 нм. Этот график показывает, что взаимодействие между проренином человека и антителом против N-концевого пептида pf полностью тормозится синтетическим N-концевым пептидом pf, а именно, что в таком взаимодействии проявляется специфическая активность по отношению к проренину человека.

Фиг. 3 представляет собой диаграмму, отражающую для взятых в качестве примера комплексов, полученных путем взаимодействия проренина человека с антителом против N-концевого пептида pf проренина человека, их рениновую активность как функцию концентрации, выраженную в виде относительных величин, определенных в условиях принятия рениновой активности проренина человека, активированного трипсином, за 100%. Эта диаграмма указывает, что указанный выше комплекс проявляет активность ренина, которая зависит от количества используемого в данном случае антитела класса IgG против N-концевого пептида pf проренина человека.

Дополнительно комплекс антитела класса IgG против N-концевого пептида pf проренина человека и проренина человека подвергали фракционированию путем гель-фильтрационной жидкостной хроматографии высокого разрешения и в каждой фракции определяли ферментативную активность, что в результате выражалось графически в виде кривой, обозначенной сплошной линией на фиг.4. Сходно, кривая, обозначенная на фиг.4 прерывистой линией, отражает результат, полученный при иммуноферментном определении проренина человека после гель-фильтрационной хроматографии, при использовании антитела против N-концевого пептида pf и меченного ферментом протеина A.

Фиг.5 представляет собой график, отражающий взаимоотношения между молекулярными весами и временем задержки для нескольких известных белков, включая ферритин, имеющий молекулярную массу 450 кДа, бычий сывороточный альбумин, имеющий молекулярную массу 65 кДа, овальбумин, имеющий молекулярную массу 45 кДа, и химотрипсиноген, имеющий молекулярную массу 25 кДа, указанных точками A, B, C и D, соответственно, в то время как время задержки для комплекса проренина человека с антителом класса IgG против N-концевого пептида pf и для проренина человека указано стрелками I и II, соответственно.

Как вытекает из фиг.4 и 5, ферментативная активность комплекса найдена главным образом во фракциях со временем задержки от 12.0 до 12.5 мин, в то время как обнаружено, что время задержки для проренина человека составляет от 16.5 до 17.0 мин.

Описанные выше факты позволяют заключить, что ферментативная активность обуславливается комплексом, имеющим молекулярную массу от 200 кДа до 240 кДа, образованным между проренином человека, имеющим молекулярную массу от 43 до 50 кДа, и антителом класса IgG против N-концевого пептида pf проренина человека, имеющим молекулярную массу 150 кДа.

Фиг. 6 представляет собой график, демонстрирующий корреляцию между титрами проренина человека, полученными способом, использующим упомянутый выше комплекс, и методом активации трипсином. Этот график показывает очень высокую корреляцию с γ-0.986 между двумя величинами.

При использовании этого комплекса в качестве реагента для определения проренина было проведено измерение проренина при его различных концентрациях, и была обнаружена высокая линейная корреляция с концентрацией проренина в диапазоне от 12.5 до 400 нг Ang I/мл•час.

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2

Далее проренинновые сыворотки человека с высокой, средней и низкой концентрациями проренина, полученные разбавлением сывороткой человека для разведения, использовали для определения ферментативной активности с помощью тех же комплексов, что и указанные выше, в качестве реагента для определения, что позволило выявить, как показано на фиг.8, хорошую пропорциональность между образованием Ang I и степенью разведения в каждом случае.

Описанные выше определения с помощью тестов хорошо воспроизводились с коэффициентом вариации от 1.8 до 5.5% для тестирования воспроизводимости параллелей при n=7 для различных концентраций и от 3.8 до 7.5% в тесте ежедневной воспроизводимости при n=5.

Описанные выше результаты позволяют заключить, что антитело против N-концевого пептида pf проренина человека согласно настоящему изобретению проявляет высокое сродство к проренину человека, что сочетается со специфичной активностью по отношению к N-концу pf, и что комплекс между этим антителом и проренином человека обладает ферментативной активностью, которая настолько хорошо коррелирует с концентрацией проренина, что комплекс применим в качестве реагента для определения проренина.

Далее настоящее изобретение описывается более подробно с помощью примеров, которые, однако, совершенно не ограничивают разные стороны сферы настоящего изобретения. Ниже описываются процедуры для получения соответствующих реагентов, применяемых в Примерах. О титре проренина судили по его Ang I продуцирующей активности.

(1) Раствор хромогена

Раствор получали растворением тетраметилбензидина, обозначаемого ниже как TMB, в ацетатном буферном растворе с pH 6.5 в концентрации 5.5 мМ.

(2) Дигиотензиногеновый реагент

Кровь отбирали у овец через 48 часов после билатерального удаления почек и немедленно получали сыворотку крови, которую лиофилизировали. Для получения реагента порцию в 20 мг полученного высушенного материала растворяли в 1 л 0.2 М фосфатного буферного раствора с pH 6.5, содержащего 10 ммолей диизопропилфторфосфата (DFP) и 10 ммолей EDTA, обозначаемого ниже как PBS.

(3) Буферный раствор для промывки

Раствор готовили путем растворения поверхностно-активного агента Твин 20 в концентрации 0.05 вес.% в PBS физиологическом солевом растворе.

(4) Сыворотка человека для разведения

Коммерчески доступную нормальную сыворотку человека, предоставленную Nippon Biological Materials Center Co., подвергали аффинной хроматографии с использованием антитела, способного узнавать как полностью зрелый ренин, так и проренин, для того, чтобы полностью зрелый ренин и проренин человека адсорбировались на нем, с последующей инактивирующей обработкой прогреванием при 56°C в течение 30 мин.

Приготовление 1

Маточный раствор рекомбинантного проренина человека готовили следующим образом. Так, в соответствии с методом Murakami et al., описанным в Journal of Hypertensions, том 4, стр. S388-S390 (1986), вектор экспрессии, в который была введена кДНК проренина человека, полученная из почки человека, был включен в клетки яичника китайского хомячка, обозначаемые ниже как CHO клетки, и эти клетки культивировали затем в культуральной среде Игла модифицированным методом Dulbecco в присутствии 10% сыворотки плодов телят с последующей ее заменой после завершения периода роста CHO клеток на бессывороточную кудьтуральную среду, для получения культурального супернатанта, содержащего рекомбинантный проренин человека.

Порцию в 5 мл полученного таким образом супернатанта CHO культуры диализовали против PBS физиологического солевого раствора, содержащего 5 мМ EDTA, с последующим доведением концентрации рекомбинантного проренина человека до 200 мкг Ang I/мл•час для получения маточного раствора рекомбинантного проренина, который хранили при 4°C.

Приготовление 2

Меченный ферментом Ang I получали следующим образом. Так, 1 мл 2% раствора глутаральдегида добавляли по каплям при интенсивном встряхивании к раствору, приготовленному путем растворения 5 мг пероксидазы хрена в 500 мкл 0.2 М PBS. После окончания добавления по каплям раствора глутаральдегида смесь встряхивали дополнительно в течение 20 мин при 25°C и затем концентрировали до объема около 100 мкл с помощью мембранного фильтра (Zaltrius Co.) при охлаждении в ледяной бане с последующим удалением избытка глутаральдегида гель-фильтрацией для получения фракции фермента.

На следующем этапе эту смесь дополнительно концентрировали и смешивали с 130 мкл раствора, приготовленного путем растворения 1 мг синтетического Ang I пептида в 1 мл очищенной воды, и инкубировали в течение 2 ч при 20°C. После этого реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0.2 М водного раствора лизина, и реакционную смесь вновь концентрировали до объема в 100 мкл, и удаляли непрореагировавший Ang I гель-фильтрацией для получения желаемого раствора меченного ферментом Ang I.

Полученный таким образом раствор меченного ферментом Ang I смешивали с бычьим сывороточным альбумином, обозначаемым ниже как BSA, в концентрации 0.1% для получения маточного раствора меченного ферментом Ang I, который хранили при -80°C.

Полученный таким образом маточный раствор использовали после 3000-кратного разведения в PBS, содержащем 0.1% BSA, 0.1 М хлорида натрия и 0.05% Твин 20.

Приготовление 3

Антитело против Ang I получали следующим образом. Так, 6.8 мг коммерчески доступного синтетического Ang I пептида растворяли в 1 мл 0.2 М PBS для получения раствора, в который по каплям добавляли раствор, полученный растворением 3.4 мг м-малеимидобензоил-М-ангидросукцимидного

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2

эфира, обозначаемого здесь и далее как MBS, в 0.5 мл тетрагидрофурана.

Раствор затем выдерживали в течение 30 мин при 30°C с последующим продуванием газообразным азотом для выпаривания тетрагидрофурана. Оставшийся раствор смешивали с 5 мл метиленхлорида при встряхивании с последующей стадией разделения с помощью центрифугирования для получения раствора MBS и Ang I в виде водной фазы.

Отдельно раствор, приготовленный с помощью растворения 10 мг BSA в 500 мкл раствора 6 М мочевины, содержащий 0.1 М EDTA, смешивали с 20 мг борогидрида натрия и со 100 мкл н-бутилового спирта в качестве пеноудаляющего агента и давали отстояться в течение 30 мин с последующим добавлением 1 мл 0.2 М PBS и 0.4 мл ацетона для получения восстановленного BSA.

Раствор Ang I и MBS, а также восстановленный BSA, полученные выше, смешивали и инкубировали в течение 2 ч при 37°C для прохождения реакции с последующим диализом против PBS для удаления непрореагировавшего Ang I.

Иммунизацию проводили продуктом, полученным в этой реакции, как иммуноантителом для получения Ang I антисыворотки.

Приготовление 4

Планшет, покрытый Ang I антителом, получали следующим образом. Так, Ang I антисыворотку, приготовленную в Приготовлении 3, разводили в 5000 раз 0.05 М раствором карбонатного буфера с pH 9.6, и порцию в 100 мкл разбавленного таким образом раствора добавляли в каждую лунку 96-луночного микропланшета для иммунологического анализа (Maxisorp, продукт Nunc Co.), который выдерживали затем при 4°C от 18 до 24 ч. После этого отбрасывали из лунок разбавленный раствор и заменяли его на 200 мкл на лунку PBS физиологического солевого раствора, содержащего 1% казеин, и оставляли в таком виде при 4°C по меньшей мере на 16 ч для достижения иммобилизации Ang I антитела. Полученный таким образом планшет хранили при 4°C.

Пример 1

Раствор, полученный растворением 16 мг гемоцианина моллюска фиссуреллии в 1 мл 0.1 М PBS с pH 7.2, смешивали со 100 мкл раствора

N-(γ-малеимидобутирокси)сукцимида в диметилформамиде с концентрацией 15 мг/мл и выдерживали в течение 3 ч при комнатной температуре. После завершения реакции реакционную смесь освобождали от непрореагировавшего

N-(γ-малеимидобутирокси)сукцимида пропусканием смеси через колонку сефадекса G-25. После этого проводили элюцию продукта реакции 0.1 М PBS с pH 6.0 и элюат смешивали с 10 мг синтетического пептида, состоящего из первых пятнадцати аминокислотных остатков N-конца pf проренина, освобожденного от защитных групп, и выдерживали в течение 3 ч при комнатной температуре для получения проренинового комплекса, и конъюгат N-концевого синтетического пептида pf с гемоцианином и использовали как иммуноантитело. Этот раствор хранили при -80°C до использования для иммунизации животных.

Полученное таким способом иммунное антитело разводили физиологическим солевым раствором до достижения концентрации белка 1 мг/мл и смешивали затем с равным объемом полного адъюванта Фрейнда. Весь объем полученного таким образом раствора вводили подкожно в несколько точек новозеландскому белому кролику с массой тела около 2.5 кг. Иммунизацию кролика проводили с двухнедельными интервалами семь раз, причем при всех последующих инъекциях использовали иммуноантитело в дозе, равной половине объема, использованного при первой инъекции. После последней иммунизации проводили отбор всей крови кролика и из крови готовили антисыворотку.

Полученную таким образом антисыворотку диадизовали против 0.1 М PBS с pH 7.0 с последующим концентрированием и затем к ней добавляли раствор, полученный растворением 100 г азида натрия NaN_3 в 1 л физиологического солевого раствора, в количестве одной сотой от объема антисыворотки для хранения при 4 °C.

Порцию в 1 мл раствора антисыворотки, полученного выше, подвергали процедуре высаливания сульфатом натрия и твердый, выпавший в осадок продукт растворяли в 17.5 мМ PBS с pH 6.3. Раствор диализовали в течение ночи против того же PBS и затем пропускали через колонку DEAE Сефарозы, уравновешенную тем же PBS, со скоростью элюции от 0.3 до 0.5 мл/мин для получения фракции, абсорбирующей свет при длине волны 280 нм. Раствор этой фракции диализовали против 0.1 М PBS с pH 7.0 и затем концентрировали с помощью Centricon-30 (производство Amicon Co.) с последующим добавлением одной сотой объема вышеупомянутого раствора азида натрия с концентрацией 100 г/л для хранения при 4°C.

Содержание белка в полученной таким способом фракции IgG, содержащей антитело против N-концевого пептида pf, равнялось 2.6 мг/мл на основании расчетов по данным оптической плотности при длине волны 280 нм и молекулярной массе IgG, равной 150 000.

На следующем этапе активность комплекса антитела класса IgG против N-концевого пептида pf, полученного таким образом, с проренином человека определяли следующим образом.

Так, маточный раствор рекомбинантного проренина человека с концентрацией 200 мкг Ang I/мл•час, полученный в Приготовлении 1, описанном выше, разводили 0.05 М раствором карбонатного буфера с pH 9.6 для получения концентрации 1 мкг Ang I/мл•час и разведенный таким образом раствор добавляли в каждую из лунок 96-луночного микропланшета для иммунологического анализа (Polysorp, продукт Nunc Co.), который выдерживали по меньшей мере в течение 16 ч при 4°C. После этого разбавленный раствор отбрасывали из лунок и заменяли на 200 мкл на лунку PBS физиологического солевого раствора с pH 7.4, содержащего 1% казеин, с последующим

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2

выдерживанием в течение по меньшей мере 16 ч при 4°С для получения микропланшета с иммобилизованным проренином, который хранили при 4°С.

На следующем этапе вышеупомянутую IgQ фракцию, содержащую антитело против N-концевого пептида pf, разводили PBS физиологическим солевым раствором с pH 7.2, содержащим 0.1% BSA и 0.05% Твин 20, при различных степенях разведения - от 10 до 10^9-кратных. Порцию в 100 мкл каждого из разведенных растворов добавляли в лунку микропланшета с иммобилизованным проренином и выдерживали в течение 2 ч при комнатной температуре для проведения реакции с последующим добавлением 100 мкл раствора, полученного 4000-кратным разведением протеина А, меченного пероксидазой (продукт Zymed Laboratories Inc.), содержащего 0.1% BSA, 0.1 М хлорида натрия и 0.05% Твин 20, и выдерживали в течение 2 ч при комнатной температуре для проведения реакции. После завершения реакции упомянутый выше раствор отбрасывали из лунок, которые повторно промывали пятикратно 300 мкл буферного раствора для промывки.

После этого порцию в 150 мкл раствора хромогена добавляли в каждую из лунок микропланшета и после инкубации в течение 5 мин при 37°С в каждую из лунок добавляли порцию в 50 мкл 0.03% раствора перекиси водорода с последующей инкубацией в течение 30 мин при 37°С.

Наконец, реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М серной кислоты и в лунках микропланшета определяли оптическую плотность при длине волны 450 нм с использованием микропланшетного ридера (производитель - Molecular Device Co.) для получения результатов, представленных на графике фиг.1. Как следует из этого графика, высокое сродство к проренину человека было присуще антителу класса IgG против N-концевого пептида pf.

На следующем этапе исследовали специфичность антитела класса IgG против N-концевого пептида pf с помощью следующего ингибиторного теста.

Так, 1 мг вышеупомянутого N-концевого синтетического пептида pf, использованного для получения антитела, растворяли в 1 мл PBS физиологического солевого раствора, содержащего BSA и Твин 20, и этот раствор разводили тем же самым PBS физиологическим солевым раствором при различных степенях разведения - от 10 до 10^7-кратных для получения серии разведенных растворов. Порцию в 500 мкл каждого из разбавленных таким образом растворов смешивали с 10 мкл антитела класса IgG против N-концевого пептида pf и порцию в 100 мкл этого раствора добавляли в лунку микропланшета с иммобилизованным проренином, который выдерживали в течение 2 ч при комнатной температуре.

После завершения реакции микропланшет повторно промывали пять раз по 300 мкл буферного раствора для промывки, и порцию в 100 мкл раствора протеина А, меченного пероксидазой, добавляли в лунку для измерения оптической плотности при длине волны 450 нм тем же способом, как и при анализе количества антитела, для получения результатов, представленных на графике фиг.2. Как следует из этого графика, реакция антиген-антитело между антителом против N-концевого пептида pf и проренином человека полностью ингибируется N-концевым синтетическим пептидом pf в качестве антигена или, другими словами, антитело против N-концевого пептида pf обладает антигенной специфичностью.

Пример 2

Супернатант CHO культуры, полученный в Приготовлении 1, разводили 10-кратно PBS физиологическим солевым раствором с pH 7.0, содержащим 1% BSA, и порцию в 200 мкл разведенного таким образом раствора смешивали с 40 мкл раствора антисыворотки, полученного разведением антисыворотки против N-концевого пептида pf PBS физиологическим солевым раствором с pH 7.6, содержащим 0.1% BSA, при различных степенях разведения - от 10 до 10^6-кратных, и выдерживали в течение 16 ч при 4°С.

После этого порцию в 50 мкл каждой из полученных выше реакционных смесей смешивали со 150 мкл ангиотензиногенового реагента и инкубировали в течение 30 мин при 37°С.

На следующем этапе порцию в 100 мкл полученной выше реакционной смеси наносили по частям в микропланшет с иммобилизованным Ang I антителом, приготовленный в Приготовлении 4, и добавляли 100 мкл Ang I, меченного ферментом, приготовленного в Приготовлении 2, и выдерживали в течение 2 ч при 4°С. После завершения реакции микропланшет повторно промывали три раза по 300 мкл буферного раствора для промывки и добавляли 150 мкл раствора хромогена с последующей инкубацией в течение 5 мин при 37°С и затем добавляли порцию в 50 мкл 0.03% раствора перекиси водорода с последующей инкубацией в течение 30 мин при 37°С для проведения реакции и развития окраски.

Наконец, реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2% серной кислоты и проводили измерение оптической плотности при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного ридера.

Отдельно, порцию в 200 мкл супернатанта CHO культуры, полученного в Приготовлении 1, смешивали с 5 мкл раствора, приготовленного растворением 1 мг трипсина из поджелудочной железы быка (продукт Sigma Co.) в 1 мл 1 мМ соляной кислоты, и выдерживали в течение 10 мин при 25°С, и ферментативную реакцию трипсина останавливали добавлением 5 мкл раствора, полученного растворением 2 мг ингибитора трипсина сои (продукт Sigma Co.) в 1 мл 0.2 М PBS с pH 7.4, для превращения проренина человека в полностью зрелый проренин.

На следующем этапе порцию в 100 мкл полученной выше реакционной смеси добавляли в ячейки микропланшета с иммобилизованным Ang I антителом для проведения анализа Ang I описанным выше способом. Полученные таким образом результаты представлены на диаграмме фиг.3 в форме относительной активации антителом против N-концевого пептида pf, принимая за 100% величину активации, т. е. количество Ang I, продуцируемого

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2

проренином человека, активированным трипсином. Как следует из этого графика, комплекс антитела класса IgG против N-концевого пептида pf с проренином человека проявляет дозозависимость в своей активирующей способности.

Пример 3

Порцию в 2 мкл разбавленного раствора рекомбинантного проренина человека с концентрацией 800 нг Ang I/мл•час добавляли к 200 мкл раствора антитела класса IgG против N-концевого пептида pf, полученного в Приготовлении 1, с последующим добавлением PBS физиологического солевого раствора, содержащего 5 мМ EDTA для доведения суммарного объема до 500 мкл с последующим выдерживанием в течение 24 ч при 4°C для образования комплекса проренина человека и антитела класса IgG против N-концевого пептида pf.

На следующем этапе порцию в 100 мкл этой реакционной смеси наносили на гель-фильтрационную колонку для жидкостной хроматографии высокого разрешения (модель TSK-GEL-G3000SXL, производство Toso Co.) и проводили элюцию с помощью PBS физиологического солевого раствора, содержащего 5 мМ EDTA, при скорости элюции 0.6 мл/мин для сбора фракций элюата объемом по 0.3 мл каждая.

Порцию в 50 мкл, взятую из каждой фракции, смешивали с 50 мкл ангиотензиногенового реагента в качестве субстрата ренина и инкубировали в течение 15 мин при 37°C для образования Ang I, после чего этот раствор немедленно переносили на лед и смешивали со 150 мкл PBS, содержащего 0.1% BSA, 0.1 М хлорида натрия и 0.05% Твин 20, с доведением суммарного объема до 250 мкл.

На следующем этапе порцию в 100 мкл этой реакционной смеси добавляли в каждую из лунок планшета с иммобилизованным Ang I антителом, и сюда же добавляли порцию в 100 мкл раствора Ang I, меченного ферментом, приготовленного в Приготовлении 2, с последующим выдерживанием в течение 2 ч при 4°C для проведения реакции. После этого планшет повторно промывали три раза по 300 мкл буферного раствора для промывки.

На следующем этапе продукт реакции смешивали со 150 мкл раствора хромогена и выдерживали в течение 5 мин при 25°C с последующим добавлением 50 мкл 0.03% раствора перекиси водорода в течение 30 мин при 25°C.

Наконец, реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М серной кислоты и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного ридера для получения результатов, представленных сплошной линией на фиг. 4. Как следует из этого графика, активность ренина, то есть активность образования ренина, обнаруживалась преимущественно во фракциях с временем задержки от 12.0 до 12.5 мин.

Для сравнения порцию в 100 мкл этого же разбавленного раствора рекомбинантного проренина человека подвергали, как применялось выше, гель-фильтрации с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения при тех же условиях, что и указанные выше, и порцию в 100 мкл каждой из фракций элюата обрабатывали сходным способом, как и в случае теста формирования комплекса антитела класса IgG против N-концевого пептида pf, и смешивали с протеином А, меченным пероксидазой, раствором хромогена и 0.03% раствором перекиси водорода с последующим измерением оптической плотности при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного ридера для получения результатов, представленных прерывистой линией на фиг.4. Как следует из этого графика, проренин, измеренный иммунологическим методом, выявлялся почти исключительно во фракциях с временем задержки от 16.5 до 17.0 мин.

С целью исследования взаимосвязи между временем задержки и молекулярной массой маркер молекулярной массы (продукт Server Co.) подвергали гель-фильтрации при тех же условиях, что и описанные выше, для получения результатов, представленных на фиг.5, согласно которым проренин имел молекулярную массу в диапазоне от 43 кДа до 50 кДа, которая несколько больше, чем молекулярная масса в 45 кДа овальбумина, а комплекс проренина и антитела класса IgG против N-концевого пептида pf имел молекулярную массу от 200 кДа до 240 кДа.

Из полученных результатов можно заключить, что иммунокомплекс, проявляющий ферментативную активность или активность ренина, был образован при реакции антиген-антитело между проренином и антителом против N-концевого пептида pf, и что в результате расщепления ангиотензиногена как субстрата ренина образовывался Ang I.

Пример 4

Готовили ряд разведенных растворов, которые получали разведением раствора проренина с активностью 200 нг Ang I/мл•час кратными разведениями сывороткой человека для разведения и готовили два ряда образцов, используя порции в 100 мкл каждого из этих разбавленных растворов.

На следующем этапе растворы образцов первого ряда использовали для определения образования Ang I известным методом активации трипсином, а растворы образцов второго ряда использовали для определения образования Ang I с помощью комплекса между проренином человека и антителом против N-концевого пептида pf, полученного в Примере 3.

Фиг. 6 представляет собой график корреляционной зависимости между двумя рядами величин, полученных этим способом, который показывает хорошую корреляцию между ними с коэффициентом корреляции $\gamma^2 = 0{,}972$.

На следующем этапе готовили ряд разведенных растворов путем разведения раствора проренина с активностью 400 нг Ang I/мл•час кратными разведениями сывороткой человека для разведения и готовили ряд образцов, используя порции в 100 мкл каждого из этих разбавленных растворов. В этих образцах определяли количество образованного Ang I с использованием упоминавшегося выше комплекса для получения результатов, показанных на фиг.7, которая представляет собой график соотношения между концентрацией

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2

проренина и образованием Ang I.

Как следует из этого графика, обнаруживается хорошая линейная зависимость в диапазоне концентраций проренина от 12.5 до 400 нг Ang I/мл•час.

Далее готовили три ряда (A), (B) и (C) растворов разбавленного проренина человека путем кратных разведении высоко-, средне- и слабоконцентрированных исходных растворов с концентрациями 503.2, 160.4 и 70.6 нг Ang I/мл•час, соответственно, с помощью сыворотки человека для разведения, и готовили три ряда образцов, используя порции в 100 мкл каждого из разбавленных растворов, относящихся к соответствующему ряду, ферментативная активность которых измерялась с помощью упомянутого выше комплекса, для получения результатов, представленных на фиг.8. Как следует из фиг.8, прямая линия, проходящая через начало координат, была получена для разбавленных растворов, относящихся к каждому из рядов.

Пример применения

Комплекс проренина человека и антитела против N-концевого пептида pf, полученный в Примере 3, применяли для определения титра проренина в образцах сыворотки, полученной от четырех взрослых здоровых мужчин в возрасте от 20 до 40 лет, тем же способом, что и в Примере 4.

Для сравнения в тех же образцах сыворотки измеряли титр проренина общепринятым методом активации трипсином.

Результаты, полученные в этих тестах, выражены в единицах нг Ang I/мл•час в таблице, представленной ниже, для каждого из четырех исследованных субъектов.

Формула изобретения:

1. Антитело против N-концевого пептида профрагмента проренина человека, способное специфически распознавать пептид, содержащий по меньшей мере 15 аминокислотных остатков, от первого остатка лейцина до 15-го остатка аргинина, в N-концевом пептиде профрагмента проренина человека.

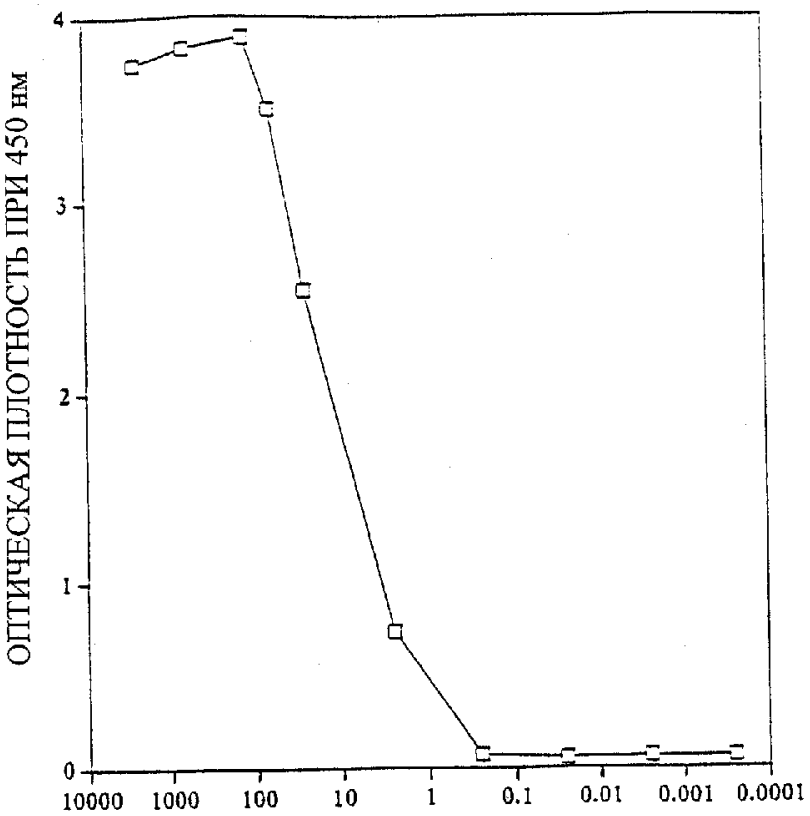
2. Соединение с активностью ренина, состоящее из комплекса антитела против N-концевого пептида профрагмента проренина человека по п.1, с проренином человека.

3. Способ определения проренина человека в крови, предусматривающий следующие стадии: (a) взаимодействие проренина человека в крови с антителом против N-концевого пептида профрагмента проренина человека по п.1 для формирования соединения с активностью ренина по п.2; (b) добавление ангиотензиногена в качестве субстрата ренина к соединению с активностью ренина для образования ангиотензина 1; (c) определение ангиотензина 1, по количеству которого судят о титре проренина.

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2

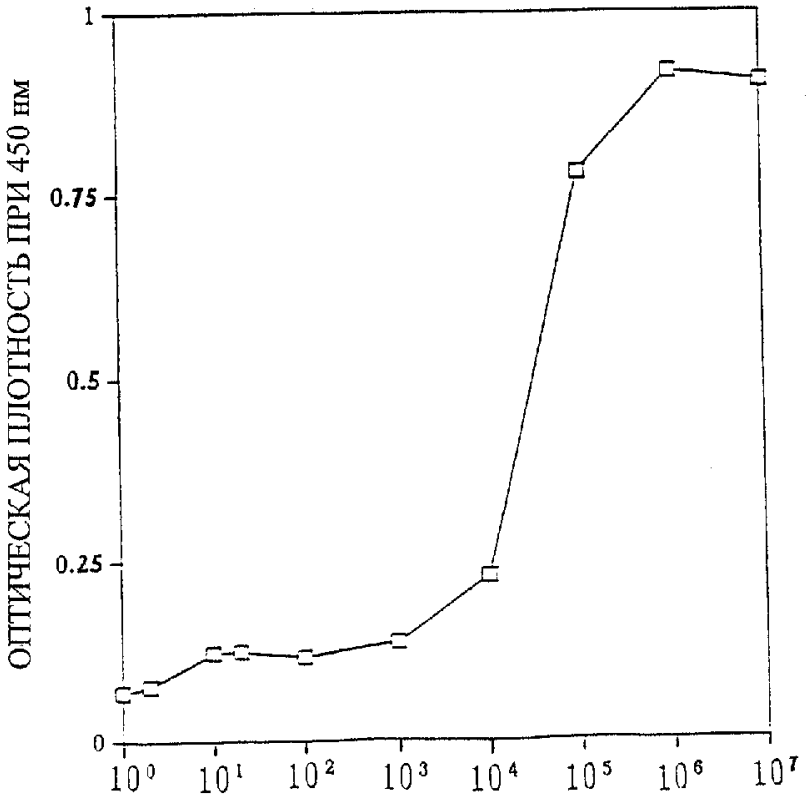
Случай No	Титр проренина в сыворотке, нг Ang I/мл.час	
	с реагентом для определения изобретения	с помощью активации трипсином
1	20.5	31.5
2	28.8	24.2
3	21.1	25.9
4	32.2	13.8



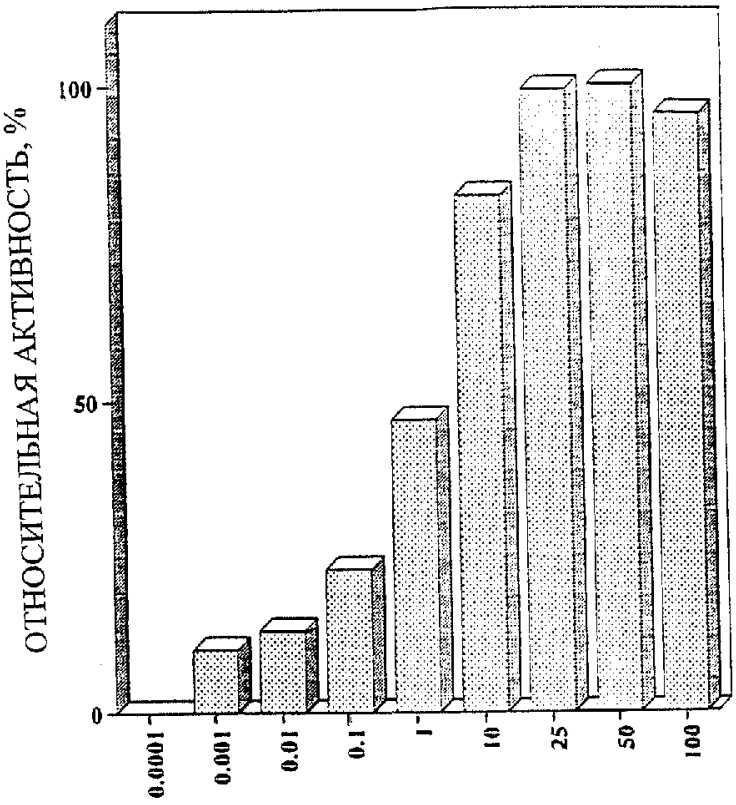
Фиг.1

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2



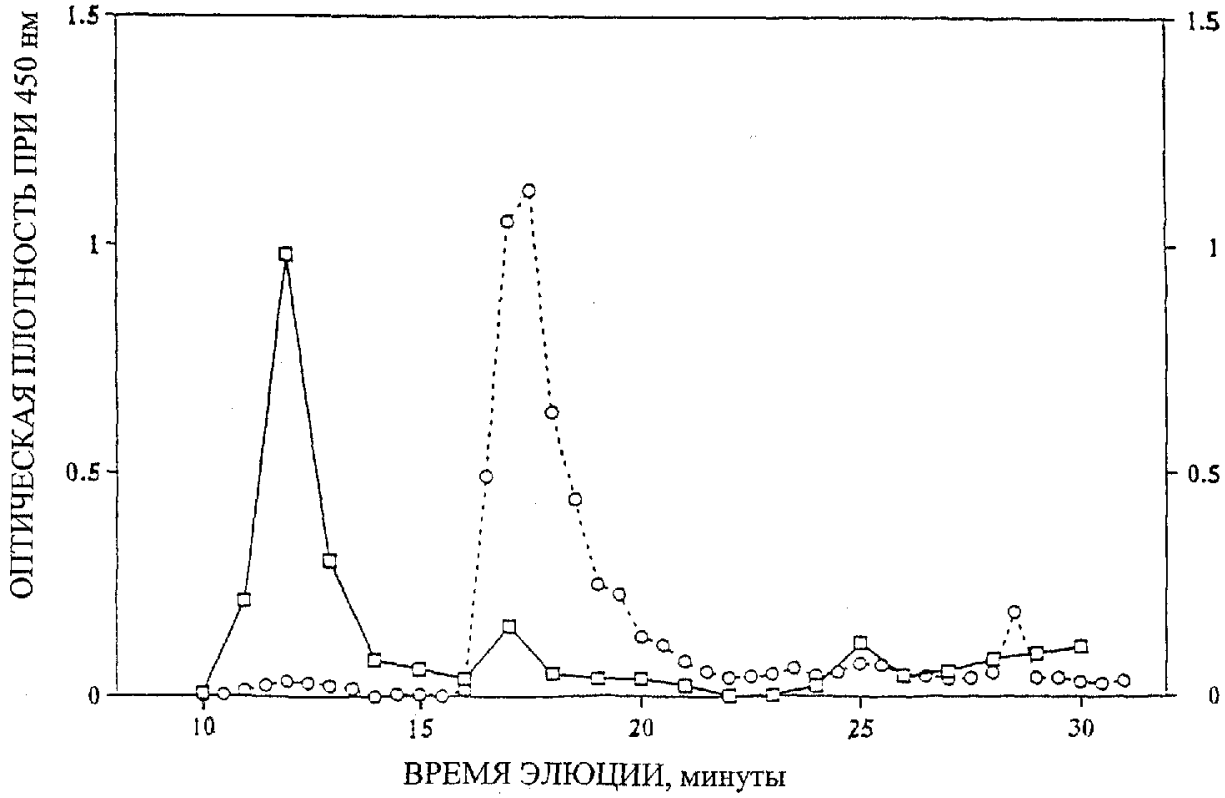
Фиг.2



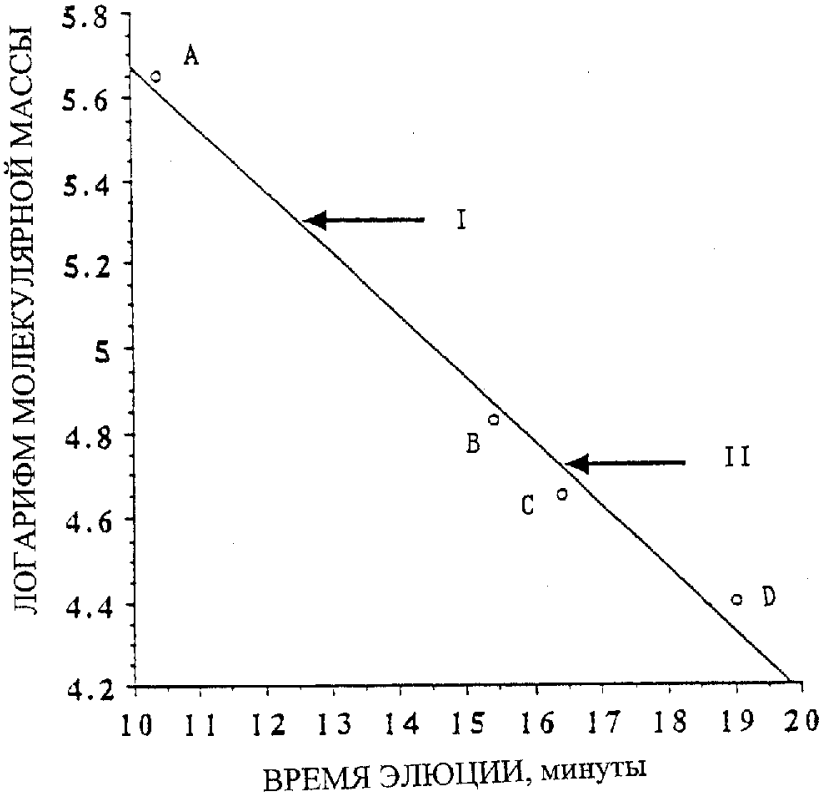
Фиг.3

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2



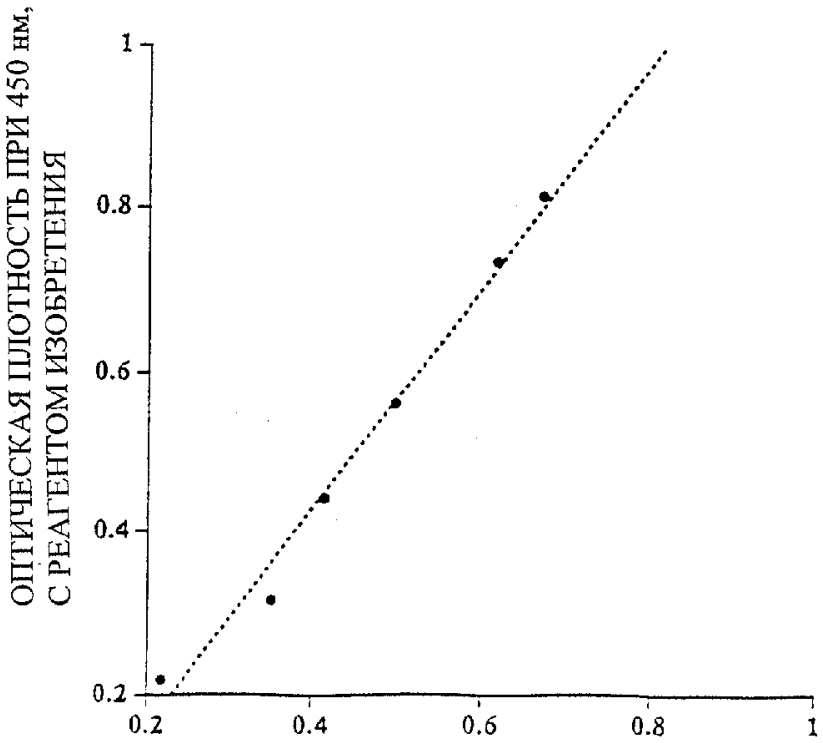
Фиг.4



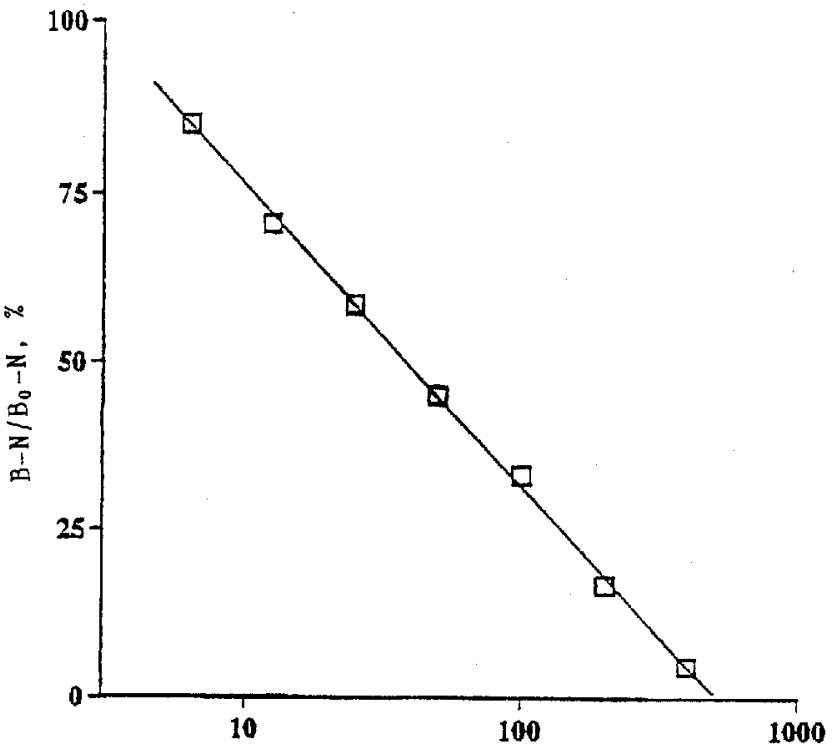
Фиг.5

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2



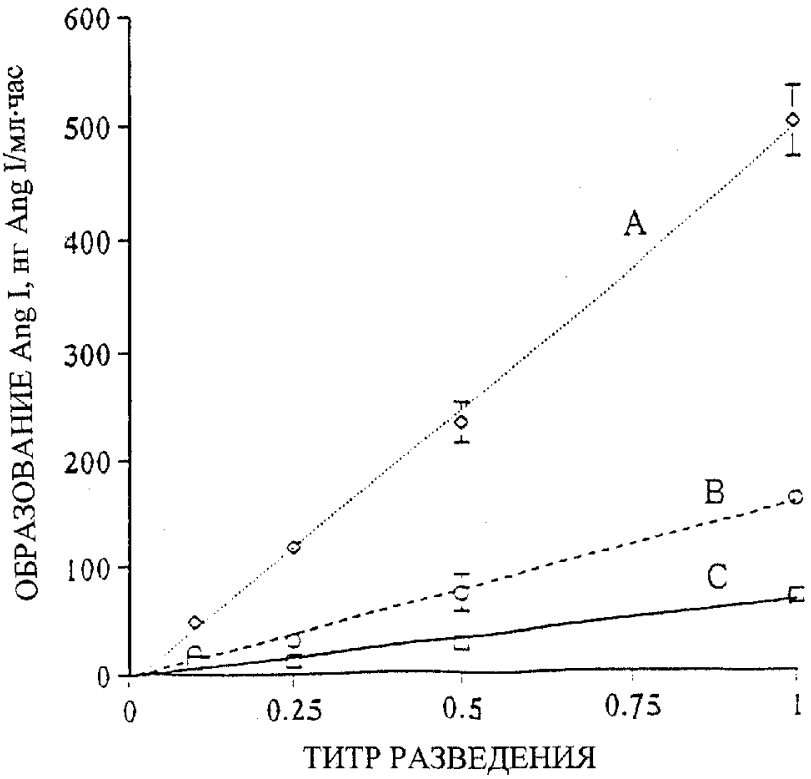
Фиг.6



Фиг.7

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2



Фиг.8

RU 2198894 C2

RU 2198894 C2