



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

85946

C (45) Patentti myönnetty

Patent beviljat 25 03 1988

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

A 61K 39/395, G 01N 33/53

(21) Patentihakemus - Patentansökning	855086
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	19.12.85
(24) Alkupaivä - Löpdag	22.04.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	19.12.85
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	13.03.92
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	US85/00737
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	23.04.84 US 603125 P

(71) Hakija - Sökande

1. **Boston Biomedical Research Institute, Inc.**, 20 Staniford Street, Boston, Mass. 02114, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Paulus, Henry P.**, 85 East India Row, Boston, Mass. 02110, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: **Oy Kolster Ab**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä bispesifisen vasta-aineen valmistamiseksi ja määritysmenetelmä jossa sitä käytetään
Förfarande för framställning av en bispecifik antikropp och bestämningsförfarande varvid denna används

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 834529 (C 12N 5/00), EP A 68763 (C 12P 1/00), EP A 96463 (C 07G 7/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää bispesifisen monoklonaalisen vasta-ainedeterminantin valmistamiseksi, jossa menetelmässä hankitaan kaksi erilaista monoklonaalista vasta-ainedeterminanttia, joista kumpikin koostuu kahdesta identtisestä L-H-puolimolekyylistä, joita yhdistää yksi tai useampi disulfidisilta, saatetaan mainitut kaksi erilaista vasta-ainedeterminanttia olosuhteisiin, joissa L-H-puolimolekyylejä yhdistävät disulfidisillat katkeavat, jolloin kumpikin determinantti halkeaa pariiksi identtisiä puolimolekyylejä, muodostetaan toisesta parista identtisiä puolimolekyylejä derivaatta tioliaktiivointiaineen avulla ja yhdistetään mainitut puolimolekyylit, jolloin muodostuu bispesifisiä vasta-ainedeterminantteja yhden tai useamman disulfidisillan muodostumisen kautta.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av en bispecifik, monoklonal antikropps-determinant och det omfattar steg för bildande av två olika monoklonala antikropps-determinanter, varvid vardera determinanten omfattar två identiska L-H-halvmolekyler sammanlänkade med en eller flera disulfidbindningar, och sedan utsättande av de bägge olika antikropps-determinanterna för förhållanden, vilka förmår bryta disulfidbindningarna som sammanbinder L-H-halvmolekylerna, varvid vardera determinanten spjälks i ett par av identiska halvmolekyler, varefter ett par av de identiska halvmolekylerna derivatiseras med ett tiolaktiveringsmedel och halvmolekylerna kombineras för bildande av de bispecifika antikropps-determinanterna genom bildande av en eller flera disulfidbindningar.

Menetelmä bispesifisen vasta-aineen valmistamiseksi ja määritysmenetelmä jossa sitä käytetään

5 IgG-vasta-aineiden tiedetään koostuvan kahdesta puolimolekyylistä, joista kumpikin muodostuu kevyestä ketjusta (L-ketjusta) ja raskaasta ketjusta (H-ketjusta). Näiden kahden puoliskon H-ketjuja sitovat toisiinsa disulfidisillat, jotka voidaan katkaista selektiivisellä pelkistyksellä. Jos tämä tehdään kahdelle erilaiselle IgG-
10 näytteelle, voidaan puolimolekyylit yhdistää hybridivasta-aineiksi. Tämä on tehty intakteille kaniinin globuliineille [Nisonoff et al., Science 134 (1964) 376 - 379]. Myös IgA-vasta-aineet voidaan halkaista samanlaisiksi puolimolekyyleiksi.

15 Hybridejä on muodostettu myös käyttämällä IgG-vasta-aineiden $F(ab')_2$ -fragmentteja intaktien vasta-aineiden sijasta, ts. molekyylien $F(c')$ -osat, jotka eivät saa aikaan immuunispesifisyyttä, poistetaan ennen hybridisaatiota pilkkomalla sopivalla proteaasilla, kuten pepsiinillä.
20 Tätä menettelyä ovat kuvanneet Nisonoff et al. [Arch. Biochem. Biophys. 89 (1960) 230 - 244] ja Nisonoff ja Rivers [Arch. Biochem. Biophys. 93 (1960) 460 - 462]. Ensin mainitun julkaisun jälkikeskustelussa Nisonoff totesi [Current Contents 44 (2.11.1981) 25] seuraavaa:

25 Tähän asti tätä menettelyä on käytetty rajoitetusti, pääasiassa solujen pintojen värjäämisessä ferritiinillä käyttämällä anti-ferritiini -vasta-aineen ja solun pinta-antigeenin vasta-aineen hybridiä. On myös ajateltu, että hybridivasta-aine voisi toimia keinona farmakologisen
30 aineen viemiseksi spesifisesti kosketukseen halutun kudospinnan kanssa.

Tällaisten hybridien käyttöä sytotoksisten lääkkeiden levitykseen on myös ehdotettu [Raso ja Griffin, Fed. Proc. 37 (1978) 1350].

35 Milstein [Proc. R. Soc. Lond. B211 (1981) 393 - 412] ehdottaa mahdollisuutta käyttää "monoklonaalaisia vas-

ta-aineita toksisten aineiden kantajina kasvainten hoitamiseksi spesifisesti" ja lausuu, että "on mahdollista, että Fab-fragmentit ovat parempia kohdistusaineita kuin intakti vasta-aine".

5 Hybridivasta-aineita on muodostettu myös fuusioimalla kaksi solua, joilla on kyky tuottaa erilaisia vasta-aineita, hybridisoluksi, jolla on kyky tuottaa hybridivasta-aineita. Tällaista menetelmää kuvaavat Milstein ja Cuello [Nature 305 (1983) 537 - 540]. Erilaisia monokloonaalisia vasta-aineita tuottavia hiiren hybridoomasoluja fuusioitiin, ja tuloksena olevat fuusioidut solut tuottivat vasta-aineseoksia, jotka koostuivat kaikista mahdollisista alkuperäisten raskaiden ja kevyiden ketjujen kahden erilaisen yhteenliittymän muodostamista yhdistelmistä. Tämä molekyylliseos sisälsi hybridivastaaineita, jotka koostuivat kummankin alkuperäisen vasta-ainemolekyylin yhdestä puoliskosta ja jotka voitiin osittain puhdistaa ioninvaihtokromatografialla.

15 Eräässä toisessa julkaisussa [Raso et al., Cancer Research 41 (1981) 2073 - 2078] kuvataan kaniinin vasta-aineen $F(ab')_2$ -fragmentteja sisältävän epäpuhtaan tuotteen muodostamista; kaniinin vasta-ainefragmentit halkaistiin pelkistämällä ja yhdistettiin antirisiin A-ketjun $F(ab')_2$ -fragmentteihin. Näitä kaksoisspesifisiä dimeerejä käytettiin kokeisiin, joissa tutkittiin kohdistettua lääkkeen antamista. Artikkelissa sanotaan:

25 Tähän työhön käytetyt kahta tyyppiä olevat puhdistetut vasta-aineet eristettiin tavanomaisista heteroantiseerumeista. Siten näiden kahden populaation liittämistä täytyy olla seurauksena monimutkainen affiniteetti- ja spesifisyysyhdistelmien muodostama joukko. Homogeenisten hybridoomaperäisten vasta-aineiden keksiminen tekee mahdolliseksi hybridivasta-aineen rakenneosapuoliskojen sitoutumisaffiniteettien täydellisen kontrollin, ja tämän yhtenäisyyden pitäisi tehostaa suuresti niiden lopullista tehoa antovälineinä.

Tämä keksintö tarjoaa käytettäväksi homogeenisen, identtisisistä bispesifisistä vasta-ainedeterminanteista koostuvan tuotteen, jossa kukin bispesifinen determinantti koostuu disulfidisiltojen yhdistämistä kahdesta L-H -puolimolekyylistä, jotka ovat keskenään erilaisia ja spesifisiä eri antigeenideterminanteille.

Keksinnön kohteena on menetelmä bispesifisen monoklonaalisen IgG-vasta-aineen tai sen fragmentin valmistamiseksi. Keksinnön kohteena on edelleen menetelmä neste-
10 mäsissä näytteessä olevan tuntemattoman aineen määrän määrittämiseksi, joka aine saatetaan reagoimaan ainakin ensimmäisen entsyymin kanssa, jolloin muodostuu mitattavissa oleva ioni tai yhdiste, joka muodostunut ioni tai yhdiste toimii mainitun aineen mittana käyttämällä keksinnön mukaisesti valmistettua vasta-ainetta. Keksinnön mukaisille menetelmille on tunnusomaista se, mitä patentti-
15 vaatimuksissa esitetään.

Vasta-aineen tai sen fragmentin valmistusmenetelmälle on edullista, että ennen yhdistämisvaihetta muodostetaan johdannainen toisesta, identtisten puolimolekyylien muodostamasta parista tioliaktivointiaineen avulla, joka edistää disulfidisiltojen muodostumista tiolilla aktivoitujen puolimolekyylien ja erilaisten puolimolekyylien välille.

Keksinnön muissa edullisissa suoritusmuodoissa monoklonaaliset vasta-aineet ovat IgG1 tai, vähemmän edullisesti IgG2A, IgG2B tai IgG3); kukin puolimolekyyli, mikäli se on peräisin IgG-vasta-aineesta, sisältää ainakin F(ab')osan; tioliaktivointiaine estää tiolilla aktivoitujen puolimolekyylien uudelleenyhdistymisen; toinen tai molemmat monoklonaalisista vasta-ainedeterminanteista koostuu yhden tai useamman disulfidisillan yhdistämistä puolimolekyyleistä, ja vaihe, jossa tällaiset determinantit halkaistaan puolimolekyyleiksi, toteutetaan olosuhteissa, jotka estävät disulfidisiltojen muodostumisen puo-
35

limolekyylien H-ketjujen sisään; ja tioliaktivointiaine on 5,5'-ditiobis(2-nitrobensoehappo), 2,2'-dipyridiinidisulfidi, 4,4-dipyridiinidisulfidi tai sulfiitin ja tetratioonaatin seos. [Tioliaktivointiaineiden käyttöä F(ab')-fragmenttien liittämiseen muihin proteiineihin on kuvattu esimerkiksi julkaisuissa Raso et al., J. Immunol. 125 (1980) 2610; Raso et al., Cancer Res. 42 (1982) 457; ja Masuho et al., B.B.R.C. 90 (1979) 320, jotka julkaisut mainitaan tässä viitteenä]. Disulfidisiltojen muodostuminen disulfidisiltojen alunperin yhdistämien H-ketjujen alueelle estetään edullisesti tekemällä halkaisureaktio ditiolikompleksointiaineen, kuten arseniitin, esimerkiksi epäorgaanisen arseniitin, kuten natriumarseniitin, tai aryyliarseniitin, esimerkiksi fenyyliarsiinioksidin, tai kadmiumsuolan läsnäollessa tai tekemällä halkaisureaktio olosuhteissa, joissa H-ketjujen konformaatio muuttuu disulfidisiltojen muodostumisen estävällä tavalla, esimerkiksi pH:n 3,8 - 4,5 (edullisimmin 4,2) vallitessa tai poistamalla pelkistyneet kysteiiniryhmät yhtä lukuun ottamatta käyttämällä proteolyyttistä entsyymiä, kuten karboksipeptidaasi Y:tä.

Kun estetään samanlaisten puolimolekyylien liittyminen uudelleen toisiinsa, voidaan bispesifisten determinanttien puhdistus seoksesta tehdä yksinkertaisesti molekyylikoon perusteella, esimerkiksi geelisuodatuksella; tämä on mahdollista, koska liuoksessa olevien ainoiden molekyylien, puolimolekyylien ja hybridien koot eroavat toisistaan siten, että toisen koko on kaksinkertainen toiseen nähden. Muita erotusmenetelmiä ovat esimerkiksi ioninvaihto ja isoelektrinen fokusointi.

Kuvio 1 esittää kaavamaisesti bioluminenssitutkimuksessa käyttökelpoista järjestelyä.

Kuvio 2 esittää kaavamaisesti kanavointi-immuunitutkimusta, jossa käytetään bispesifisiä monoklonaalisia vasta-ainedeterminantteja.

Kuvio 3 esittää kaavamaisesti fluoresenssienergian-siirtoimmuunitutkimusta, jossa käytetään bispesifisiä monoklonaalisia vasta-ainedeterminantteja.

5 Kuvio 4 on kaavamainen esitys kaniinin IgG₁:n rakenteesta verrattuna hiiren IgG₁:een.

Kuvio 5 esittää kaavamaisesti kilpailevia ketjunsäisiä reaktioita hiiren puolimolekyyleissä.

10 Kuvio 6 esittää kaavamaisesti edullista menetelmää bispesifisten monoklonaalisten vasta-ainedeterminanttien valmistamiseksi.

Kuvio 7 esittää kaavamaisesti luminenssienergian-siirtoimmuunitutkimusta, jossa käytetään bispesifisiä monoklonaalisia vasta-ainedeterminantteja.

15 Keksinnön mukaisesti valmistetut bispesifiset monoklonaaliset vasta-ainedeterminantit ovat käyttökelpoisia monenlaisiin tarkoituksiin. Nämä sovellutukset perustuvat kaikki näiden determinanttien kykyyn toimia spesifisten kohtien B' kautta hyvin spesifisinä yhteenliittäjinä mille tahansa kahdelle antigeenideterminantille, joilla on kyky
20 stimuloida vasta-ainetuotantoa eläimessä; esimerkiksi tehokkaille proteiineille, polypeptideille, hiilihydraateille, nukleinihapoille tai hapteneille, jotka ovat joko vapaina tai immobilisoituina pinnoille tai hiukkasille.

25 Eräs esitettyjen bispesifisten vasta-ainedeterminanttien käyttötarkoitus on niiden käyttö aineina, jotka sitovat halutun antigeenisen ryhmän haluttuun pintaan, joka sisältää tai jolle on immobilisoituna erilainen antigeenideterminantti. Esimerkiksi hiukkasille tai kalvoille siten immobilisoituja entsyymejä voidaan käyttää kiinteä-
30 faasikatalysaattoreina. Tämän tyyppisen immobilisoinnin etuina muihin nähden ovat se, että voidaan valita vastaaineita, joilla ei ole haitallista vaikutusta entsyymin aktiivisuuteen, ja se, että voidaan immobilisoida puhtaita entsyymejä epäpuhtaista seoksista. Bispesifisiä vasta-ainedeterminantteja voidaan käyttää myös hyvin spesifisinä
35

bispesifisinä reagensseina immuunitutkimusmenettelyissä, joita käytetään esimerkiksi lääketieteellisten häiriötilojen diagnostisointiin, tai molekyylikoettimina antigeenideterminanttien sukulaisuuden tutkimiseksi biologisissa systeemeissä.

5

Bispesifisten vasta-ainedeterminanttien lisäsovellutuksena on niiden käyttö elektrodeissa. Tätä keksintöä voidaan käyttää rakenteeltaan minkälaisissa elektrodeissa tahansa, esimerkiksi kiinteäfaasiantureissa, kuten kenttävaikutustransistoreissa, joita kuvaa Wohltjen [Analyt. Chem. 56 (1984) 87A].

10

Entsyymielektrodeilla, jotka valmistetaan käyttämällä bispesifisiä vasta-ainedeterminantteja, on useita etuja tavanomaisiin entsyymielektrodeihin nähden. Eräs etu on niiden tarkka itserakentumisominaisuus; haluttu elektrodijärjestely muodostetaan yksinkertaisesti kiinnittämällä asianmukainen hapteeni tai asianmukaiset hapteenit kalvoon (joko elektrodikalvoon tai erilliseen elektrodin kanssa yhteydessä olevaan kalvoon) ja upottamalla hapteenin sisältävä kalvo liuokseen, joka sisältää asianmukaisia bispesifisiä vasta-aineita ja entsyymejä. Tämä rakentamisen helppous merkitsee myös sitä, että elektrodi on helppo ladata uudelleen, kun on tapahtunut elektrodin toimintakyvyn loppuminen pitkän käytön takia.

15

20

25

Elektrodien eräänä etuna on myös bispesifisten vasta-ainedeterminanttien spesifisyyden toimintatapa. Kullakin entsyymillä on joukko antigeenikohtia, joilla on kyky tarttua vasta-aineen spesifiseen kohtaan. Tällaisissa kohdissa tapahtuva sitoutuminen johtaa kuitenkin usein entsyymien inaktivoitumiseen. Bispesifisten monoklonaalisten vasta-ainedeterminanttien ollessa kyseessä tämä ongelma vältetään, koska determinantit valitaan siten, että ne sitoutuvat entsyymiin vain sellaisista kohdista, joissa tapahtuva sitoutuminen ei aiheuta entsyymien deaktivoitumista.

30

35

Lisäetuna on se, että elektrodin rakentaminen tai uudelleen panostaminen voidaan tehdä käyttäen epäpuhtaita entsyymiseoksia, koska bispesifisten vasta-ainedeterminanttien ainutlaatuinen spesifisyys takaa oikeiden entsyymien valitsemisen epäpuhtaasta seoksesta. Joissakin tapauksissa elektrodirakenne voidaan stabiloida miedolla bifunktionaalisella silloitusaineella, esimerkiksi dime-

5 tyyliisuberimidaatilla.

Bispesifisten vasta-ainedeterminanttien eräänä sovellutuksena on vielä niiden käyttö itserakentuvien verkkojen, joita käytetään esimerkiksi molekulaarisina mikro-

10 piireinä, muodostamiseen.

Edellä mainittuja käyttötarkoituksia kuvataan yksityiskohtaisemmin US-patenttijulkaisussa 4 444 878

15 (Paulus), joka mainitaan tässä viitteenä.

Ryhdyimme nyt käsittelemään yksityiskohtaisemmin keksinnön mukaisten bispesifisten vasta-ainedeterminanttien muodostamista ja erityismenetelmää, jota käytetään vasta-aineiden ollessa hiirestä peräisin.

Kuvio 4 valaisee rakenne-eroa kaniinin IgG₁-vasta-

20 aineiden ja hiiren IgG₁-vasta-aineiden (joita useimmat monoklonaaliset vasta-aineet ovat) välillä. Näissä rakenteissa on raskaita ketjuja yhdistävien disulfidisiltojen määrä erilainen. Kaniinin IgG₁:n kahta puoliskoa pitää yhdessä yksi sidos, ja F(ab')₂:n pelkistykseen F(ab')-monomeeriksi samoin kuin monomeerin uudelleenliittymiseen dimeeriksi liittyy vain yhden sidoksen katkeaminen ja muodostuminen uudelleen, mikä on suhteellisen yksinkertainen prosessi. Sitä vastoin hiiren IgG₁:n raskaita ketjuja yh-

25 distää 3 disulfidisiltaa, ja niiden katkeaminen ja uudelleenmuodostuminen voi johtaa kilpaileviin ketjunsisäisiin sivureaktioihin, jotka ovat kuviossa 5 esitettyä tyyppiä ja voivat merkittävästi alentaa halutun tuotteen saantoa. Ketjunsisäinen reaktio tekee puolimolekyylistä kykenemättömän liittymään erilaiseen puolimolekyyliin. Tämän kek-

30

35

sinnön mukainen menetelmä tekee mahdolliseksi puhtaiden bispesifisten monoklonaalisten vasta-ainedeterminanttien tuotannon suurella saannolla hiiren monoklonaalisista vasta-aineista samoin kuin muista nisäkäslajeista peräisin olevista vasta-aineista.

Menetelmä sisältää seuraavat peräkkäiset vaiheet. Tuotetaan tavanomaisia menetelmiä käyttäen kahta erilaista monoklonaalista IgG₁-vasta-ainetta, joista kummallakin on toinen halutuista spesifisyyksistä. Kukin vasta-aine käsitellään sitten sopivalla proteaasilla, kuten pepsinillä, jolloin vasta-ainemolekyylin F(c')-osa irtoaa ja syntyy F(ab')₂-fragmentti. Sitten kukin aine saatetaan olosuhteisiin, joissa F(ab')-puolimolekyyliä yhdistävät disulfidisillat, mutta eivät mitkään muut molekyylin disulfidisillat, katkeavat. Samanaikaisesti nämä olosuhteet ovat sellaiset, että estetään raskaiden ketjujen sisäisten disulfidien muodostuminen, esimerkiksi ditiolikompleksointiaineen (esimerkiksi natriumarseniitin (kuten kuviossa 6), aromaattisen arseniitin, kuten fenyyliarsiinioksidin tai CdCl₂:n) lisäämisen tai raskaan ketjun konformaation muuttamisen (esimerkiksi alentamalla pH arvoon 4,2) tai proteolyttisellä entsyymillä tehtävän kaikkien paitsi yhden pelkistyneiden kysteiniiniryhmien (esimerkiksi karboksipeptidaasi Y:llä) poistamisen ansiosta.

Toinen aineista käsitellään sitten tioliaktivointiaineella kaikkien vapaiden tiolien kompleksoimiseksi, jolloin muodostuu johdos, jolla on kyky reagoida nopeasti muiden vapaiden tiolien kanssa disulfideiksi, kuten näkyy kuviossa 6 tapahtumaketjun 1 lopussa. Tähän tarkoitukseen soveltuvia aineita ovat aromaattiset disulfidit, kuten DTNB (Ellman, Arch. Biochem. Biophys. 82 (1959) 70) (kuvio 6), 2,2'-dipyridiinidisulfidi, 4,4'-dipyridiinidisulfidi [Grasetti et al., Arch. Biochem. Biophys. 119 (1967) 41] ja sulfiitti/tetrationaatti [Masuho et al., B.B.R.C. 98 (1979) 320]. Tämä aktivoitu aine yhdistetään sitten

(kuvion 6 tapahtumaketju 3) toiseen ditiolikompleksoituun aineeseen, joka sisältää käytettävissä olevia tioleja, sellaisissa olosuhteissa, joissa ainakin jotkut puolimolekyylit liittyvät kemiallisesti bispesifiseksi vasta-aine-

5 determinanteiksi mutta eivät monospesifiseksi $F(ab')_2$:ksi.

Vaihtoehtoisesti voidaan molemmat aineet käsitellä tioliaktivointiaineella, jolloin muodostuu aktivoituja tiolijohdoksia. (Tämä on usein kätevää aktivoitujen joh-

10 dosten suhteellisen hyvän stabiilisuuden ansiosta). Toinen aineista käsitellään sitten ylimäärällä pienimolekyylistä tiolia vapaiden tiolien regeneroimiseksi $F(ab')$ -monomeerille, minkä jälkeen seuraa erottaminen ylimäärästä pienimolekyyllisiä tioleja. Molekyyllisisäinen disulfidisoltojen muodostuminen voidaan estää lisäämällä ditiolikompleksointi-

15 aiainetta (kuvio 6 tapahtumasarja 2) tai muuttamalla raskaan ketjun konformaatiota. Joissakin tapauksissa voi olla kuitenkin edullista sallia molekyyllisisäisten disulfidisoltojen muodostuminen. Tämä aine yhdistetään sitten (kuvion 6 tapahtumasarja 3) tioliaktivoidussa muodossa olevaan toiseen $F(ab')$ -aineeseen olosuhteissa, joissa ainakin

20 osa puolimolekyyleistä liittyy kemiallisesti bispesifiseksi $F(ab')_2$:ksi.

Koska näissä olosuhteissa tuotettu $F(ab')_2$ -fraktio koostuu yksinomaan halutuista bispesifisistä vasta-ainedeterminanteista, edellyttäen, että lähtöaineina on käytetty asianmukaisesti puhdistettuja monoklonaalisia vasta-aineita, voidaan homogeenisia bispesifisiä vasta-ainedeterminanteja saada yksinkertaisesti poistamalla monomeerinen $F(ab')$ fraktio halutusta $F(ab')_2$:sta molekyyliekoon perusteella käyttäen jotakin kätevää menettelyä, kuten geelisuodatusta.

25

30

Seuraavaa menettelyä käytetään valmistettaessa identtisistä bispesifisistä vasta-ainedeterminanteista koostuva homogeeninen tuote, jossa kussakin bispesifisessä

35 determinantissa on kohta, joka on spesifinen avidiinipro-

teinin eräälle ainutkertaiselle antigeenikohdalle, ja kohta, joka on spesifinen β -galaktosidaasientsyymien eräälle ainutkertaiselle antigeenikohdalle. Tämä menettely seuraa yleisesti kuviossa 6 esitetyistä vaiheista.

5 Ensimmäinen vaihe on monoklonaalisten vasta-aineiden valmistaminen näille kahdelle proteiinille, avidiinille ja β -galaktosidaasille. Tämä tehdään immunisoimalla yksi ryhmä BALB/C-hiiriä kutakin entsyymiä vastaan käyttämällä tavanomaisia immunisointimenettelyjä.

10 Immunisoinnin jälkeen preparoidaan eläinten perna-solut ja fuusioidaan ne MOPC-21 -myeloomasolujen johdoksiin (esimerkiksi NS1 tai SP2/O-Ag14) käyttämällä Galfren et al. [Methods in Enzymology 73 (1981) 3 - 46] kuvaamaa menettelyä. Hybridisolut valikoidaan hypoksantiini-aminopteriini-tymidiinialustassa, kloonataan ja niistä tutkitaan haluttujen entsyymien vastaisten vasta-aineiden tuotanto Galfren et al. [ibid.] kuvaamalla menetelmällä.

15 Kloonit, joiden havaitaan tuottavan halutun entsyymin vastaisia vasta-aineita, tutkitaan sitten, jotta saataisiin valituksi klooni, joka tuottaa IgG₁-ryhmän vasta-ainetta, jolla on suuri affiniteetti entsyymien suhteen ja joka ei aiheuta entsyymien inaktivoitumista. Mielenkiinnon kohteena olevat kloonit säilytetään nestetyypessä käyttöön asti. Vasta-ainetta valmistetaan tavanomaisella menetelmällä, jossa kloonattuja soluja lisätään vesivatsakasvaimina pristaanilla esikäsiteltyjen hiirien vatsaontelossa.

20 Halutut avidiinin ja β -galaktosidaasin vastaiset IgG₁-vasta-aineet puhdistetaan sitten vesivatsanesteestä suurin piirtein Parhamin et al. [Journal of Immunological Methods 53 (1982) 133 - 173] kuvaamalla tavalla, käyttämällä menettelyä, joka sisältää ammoniumsulfaattisaostuksen, geelisuodatuksen ja DEAE-selluloosakromatografian, jossa käytetään lineaarista suolagradiienttiä. Monoklonaaliset vasta-aineet pilkotaan F(ab')₂-fragmenteiksi pepsinillä Lamoyin ja Nisonoffin [Journal of Immunological

35

Methods 56 (1983) 235 - 243] kuvaamalla tavalla inkuboimalla 18 tuntia 25 °C:ssa liuoksessa, joka sisältää 2 paino-% pepsiiniä 0,1 M natriumasetaatissa, pH 4,2. F(ab')₂-fragmentit puhdistetaan sitten suuren erotuskyvyn neste-kromatografiolla TSK 3000 SW-pylvässä eluenttina 0,1 M natriumfosfaatti, pH 6,8, Parhamin et al. [ibid.] kuvaamalla tavalla.

F(ab')₂-fraktiot muutetaan sitten täydellisesti Fab'-monomeeriksi pelkistämällä liuoksella, joka sisältää 10 mmol/l 2-merkaptotyyliamiinia, 1 mmol/l EDTA:a, 10 mmol/l natriumarseniittiä ja 0,1 mol/l natriumfosfaattia, pH 6,8, 18 tuntia 25 °C:ssa. Seokseen lisätään sitten kiinteää DTNB:tä loppupitoisuudeksi 20 mmol/l. Kun seosta on pidetty 2-3 tuntia 25 °C:ssa, poistetaan DTNB-ylimäärä ja 15 pienimolekyyliset tuotteet tekemällä keskipakogeelisuodatus Sephadex[®] G-25:llä, joka on tasapainoitettu 0,1 M natriumfosfaatilla, pH 6,8, joka sisältää 1 mmol/l EDTA:a. Tuloksena olevat Fab'-monomeerien tionitrobentsoaatit ovat 20 suhteellisen stabiileja, ja niitä voidaan säilyttää useita päiviä ilman, että tapahtuu merkittävää hajoamista.

Toinen Fab'-monomeerin tionitrobentsoaattijohdokista (anti-avidiini -vasta-aineesta saatu) muutetaan sitten takaisin vapaaksi tiolimuodoksi (kompleksoitu ditio- 25 lilla) inkuboimalla 30 min 25 °C:ssa liuoksessa, joka sisältää 10 mmol/l merkaptotyyliamiinia, 1 mmol/l EDTA:a ja 0,1 mol/l natriumfosfaattia, pH 6,8. Merkaptotyyliamiini-ylimäärä ja pienimolekyyliset reaktiotuotteet poistetaan sitten tekemällä keskipakogeelisuodatus Sephadex[®] 30 G-25:llä, joka on tasapainoitettu 0,1 M natriumfosfaatilla, pH 6,8, joka sisältää 1 mmol/l EDTA:a.

Tuloksena oleva anti-avidiini-F(ab')-tioli saate- taan sitten heti kosketukseen yhtä suuren moolimäärän kanssa anti-β-galaktosidaasi-Fab':n tionitrobentsoatti- johdosta proteiinipitoisuuden ollessa vähintään 0,5 mg/ml 35 3-20 tunnin ajaksi 25 °C:ssa bispesifisen F(ab')₂:n muodos-

tumisen mahdollistamiseksi. Seokseen lisätään sitten kiinteää DTNB:tä loppupitoisuudeksi 5 mmol/l, ja annetaan seoksen seistä 3 tuntia 25 °C:ssa mahdollisen ei-kovalenttisen dimeerisen materiaalin hajoamisen edistämiseksi.

5 Avidiinin ja β -galaktosidaasin vastainen homogeeninen bispesifinen vasta-ainedeterminantti valmistetaan sitten erottamalla $F(ab')_2$ -fraktio jäljelle jääneistä Fab'-monomeereista HPLC:llä TSK 3000 SW:llä käyttäen 0,1 M natriumfosfaattia, pH 6,8, joka menettely ei vahingoita $F(ab')_2$:a

10 eikä vaadi sen sitomista muuhun aineeseen, jolloin minimoituu aktiivisuutta heikentävien konformaatiomuutosten riski. Halutun bispesifisen vasta-ainedeterminantin muodostuminen voidaan helposti osoittaa käyttämällä hyväksien kykyä saada aikaan avidiinista riippuvainen β -galaktosidaasin sitoutuminen biotiinilla substituoidusta selluloosasta valmistettuihin kiekkoihin.

Bispesifinen vasta-ainedeterminantti voidaan liittää biotiinisubstituoidusta selluloosasta valmistettuun kalvoon tutkittaessa yhdistettä, esimerkiksi laktoosia,

20 jonka mittauksessa β -galaktosidaasi voi olla apuna (kuten jäljempänä selitetään tarkemmin).

Anti- β -galaktosidaasi voidaan immobilisoida biotiinisubstituoidulle kalvolle saattamalla yksinkertaisesti kalvo (joka sisältää biotiinin sitoutunutta avidiinia)

25 kosketukseen bispesifisen determinantin kanssa, jossa on anti-avidiinipuolisko ja anti- β -galaktosidaasipuolisko, sekä β -galaktosidaasin kanssa. Samalla tavalla glukoosioksidaasi voidaan immobilisoida kalvoon.

Käyttämällä edellä kuvattua menettelyä voidaan valmistaa kaksi bispesifistä molekyyliä, joista o-ensimmäinen spesifinen glukoosioksidaasientsyymien sisältämän ainutkertaisen antigeenisen kohdan suhteen ja β -galaktosidaasin antigeenisen kohdan suhteen, ja toinen on spesifinen glukoosioksidaasin eri antigeenikohdan ja tyypin I kollageenin erään antigeenikohdan suhteen. Näitä voidaan käyttää

35

muodostettaessa elektrodi laktoosin yleistä mittausta varten, kuten Paulus [ibid.] kuvaa.

Seuraavassa kuvataan koetyyppiesimerkkiä, jossa mitataan ainetta, jonka määrityksessä voidaan käyttää kolorimetriä, reflektometriä, luminenssensin mittausta tai fluorometriä tutkittavan aineen tuntemattoman määrän mittaamiseen. Yleisesti ilmaistuna kokeessa mitataan nestemäisessä näytteessä olevan tuntemattoman aineen määrää, johon aineeseen vaikuttaa ainakin ensimmäinen entsyymisiten, että vapautuu mitattavissa oleva ioni tai yhdiste, jota voidaan käyttää tuntemattoman aineen mittana. Kokeessa sidotaan ensimmäinen entsyymi kiinteään alustaan (esimerkiksi helmille tai kalvokantajaan) tai toimintajärjestyksessä aiemmin vaikuttavaan toiseen entsyymiin käyttämällä apuna esitettyä bispesifistä vasta-ainedeterminanttia, joka on spesifinen ensimmäisen entsyymin ja kantajan tai toisen entsyymin suhteen. Tällä tavalla voidaan liittää toisiinsa miten monta reaktiosarjaan liittyvää entsyymiä tahansa, ja toimintajärjestyksessä viimeinen entsyymi sidotaan yleensä kantajaan. Näyte saatetaan kosketukseen kantajalle immobilisoidun entsyymin tai entsyymien kanssa, ja mitataan mitattavissa oleva ioni tai yhdiste. Tuntemattomiin aineisiin, joita voidaan mitata, kuuluu esimerkiksi verensokeri.

Peräkkäin vaikuttavat entsyymit voidaan vaihtoehtoisesti liittää toisiinsa tuntemattoman aineen avulla, joka on määrä mitata käyttämällä asianmukaisia bispesifisiä vasta-aineita. Tämä laajentaa mitattavissa olevien aineiden alueen biomolekyyleihin, kuten hormoneihin (esimerkiksi ihmisen sikiön suonikalvon gonadotropiini, jota mitataan raskaustesteissä, ja insuliini).

Kuvio 1 valaisee järjestelyä, jossa itseasettuvia entsyymejä yhdistävät bispesifiset vasta-ainedeterminantit (nuolenkärkikuviot, jotka yhdistävät renkailla merkittyjä entsyymejä). Järjestyksessä viimeinen entsyymi (lusiferaa-

si) voidaan immobilisoida käyttämällä esimerkiksi avidiinia ja biotiinisubstituoitua kalvoa (ei kuviossa). Lusi-
feraasi on kuviossa näkyvällä tavalla pelkistytessään bio-
luminesoiva (esitettyä reaktioketjua kuvaavat tarkemmin
5 Wienhausen ja DeLuca [Anal. Biochem. 127 (1982) 380] ja
Hastings et al., [US-patenttijulkaisu 4 278 761], jotka
julkaisut mainitaan tässä viitteenä].

Kuvio 2 valaisee "kanavointi"-immuunitutkimusta,
jossa käytetään kahta bispesifistä vasta-ainedeterminant-
10 tia. (Kuvatussa kokeessa noudatetaan joitakin Litmanin et
al., [Anal. Biochem. 106 (1980) 223] kuvaaman kanavointi-
immuunitutkimuksen periaatteita). Ensimmäinen bispesifinen
determinantti on spesifinen ensimmäiselle entsyymille ja
mitattavan antigeenin, esimerkiksi ihmisen sikiön suoni-
15 kalvon gonadotropiinin, ensimmäiselle antigeenikohdalle.
Toinen bispesifinen determinantti on spesifinen toiselle
entsyymille ja mitattavan antigeenin toiselle antigeeni-
selle kohdalle. Ensimmäisellä entsyymillä on kyky vaikut-
taa ensimmäiseen substraattiin sillä tavalla, että syntyy
20 toinen substraatti, johon voidaan antaa vaikuttaa toisen
entsyymin, jolloin vapautuu mitattavissa oleva yhdiste tai
ioni. Koe tehdään saattamalla nestemäinen seos, jonka
epäilläään sisältävän mitattavaa molekyyliä, kosketukseen
käytettävien kahden bispesifisen determinantin ja käytet-
25 tävien kahden entsyymin kanssa ensimmäisen substraatin
läsnäollessa. Jos on läsnä tuntematonta ainetta, sitoutu-
vat nämä kaksi determinanttia siihen, ja determinantteihin
sitoutuneet kaksi entsyymiä joutuvat hyvin lähelle toi-
siaan, niin että tapahtuvien kahden reaktion teho kasvaa
30 useita kertalukuja. Kuvatussa tapauksessa ensimmäinen ent-
syymi on glukoosioksidaasi, toinen entsyymi on peroksidaa-
si, ensimmäinen substraatti on glukoosi, ja toinen subst-
raatti on peroksidi, joka hapettaa leukoväriaineen, jol-
loin muodostuu mitattavissa oleva väriaine. Järjestyksessä
35 viimeinen entsyymi voidaan immobilisoida. Kuviossa 2 esi-

tettyyn kokeeseen sisältyy optinen piirre signaali:kohina-
suhteen parantamiseksi, kilpailevan entsyymin (tässä ta-
pauksessa katalaasin) käyttö tarpeeksi suurena määränä
peroksidaasin vaikutuksen peittämiseksi entsyymiin liit-
5 tyvän tuntemattoman aineen poissaollessa.

Kuvio 3 valaisee fluoresenssienergiansiirtoimmuuni-
tutkimusta, joka on analoginen kuvion 2 kokeelle; erona on
se, että energiansiirtokokeessa vaikutetaan orgaanisten
substraattien sijasta valoon mitattavissa olevan tuloksen
10 tuottamiseksi. Kokeessa käytetään kahta fluoresoivaa pro-
teiinia; kuvatussa kokeessa nämä ovat fykoerytriini
("Phy") ja allofykosyaniini ("All"), joita molempia tuot-
tavat siniviherlevät ja joita kuvaavat Glazer ja Stryer
[Biophys. J. 43 (1983) 323], joka julkaisu tässä mainitaan
15 viitteenä, käyttökelpoisiksi immuunitutkimuksiin. Kuten
kuviossa 3 ilmenee, toinen bispesifinen monoklonaalinen
vasta-ainedeterminantti on spesifinen tutkittavan antigeen-
nin (esimerkiksi ihmisen sikiön suonikalvon gonadotropii-
nin) ensimmäiselle kohdalle ja Phy:lle, ja toinen bispe-
20 sifinen monoklonaalinen vasta-ainedeterminantti on spesi-
finen kyseessä olevan antigeenin toiselle kohdalle ja
All:lle. Antigeenin läsnäolo saattaa Phy:n ja All:n lähei-
sesti toisiinsa liittyneiksi, mikä kasvattaa suuresti
energiansiirtotehoa. Signaali syntyy, koska Phy eksitoiduu
25 aallonpituudella 500 nm ja emittoi aallonpituudella 580
nm, kun taas All läpäisee aallonpituuden 500 nm, mutta
eksitoiduu aallonpituudella 580 nm ja emittoi aallonpituu-
della 660 nm. Aallonpituudella 660 nm esiintyvä signaali
syntyy siten vain valon kulkiessa peräkkäin molempien pro-
30 teiinien läpi, jonka prosessin teho riippuu proteiinien
läheisyydestä toistensa suhteen. Edellä kuvatun kaltaisissa
kokeissa toinen tai molemmat fluoresoivista proteiini-
neista voidaan immobilisoida kantajalle joko tavanomaisin
keinoin tai esitettyjen bispesifisten determinanttien
35 kautta.

Läheistä tyyppiä olevassa immuunikokeessa, jota valaistaan kuviossa 7, tapahtuu luminesenssienergian siirto luminesoivan molekyylin ja fluoresoivan aineen välillä Patelin et al. [Analytical Biochemistry 129 (1983) 162 - 5 169] kuvaamalla tavalla. Kuvion 7 tapauksessa käytetään luminesoivaa proteiinia, ekvoriinia, fykoerytriinin yhteydessä. Antigeenin läsnäolo liittää ekvoriinin ja fykoerytriinin läheisesti toisiinsa, mikä kasvattaa suuresti energiansiirtotehoa. Ca²⁺:n lisääminen saa aikaan ekvoriinin 10 luminesenssin aallonpituudella 475 nm, joka eksitoi fykoerytriinin ja saa sen fluoresoimaan aallonpituudella 580 nm. Aallonpituudella 580 nm esiintyvä signaali syntyy siten vain fykoerytriinin aikaansaaman ekvoriiniluminesenssiaallonpituuden modulaation tapahtuessa, jonka prosessin 15 teho riippuu proteiinin läheisyydestä toisiinsa nähden.

Muut suoritusmuodot ovat mahdollisia. Esimerkiksi, vaikka IgG₁-vasta-aineet ovat edullisia, voidaan keksinnön yhteydessä käyttää myös IgG₂-vasta-aineita. Myös kokonais- 20 ta puolimolekyyliä, pikemmin kuin pelkkää F(c')-osaa, voidaan käyttää. Saantoa voidaan hieman parantaa käyttämällä ditiolikompleksointiaineena natriumarseniitin sijasta 0,25 mM fenyyliarsiinioksidia.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä bispesifisen monoklonaalisen IgG-vas-
ta-aineen tai sen fragmentin valmistamiseksi t u n n e t-
5 t u siitä, että

käytetään kahta erilaista monoklonaalista IgG-vas-
ta-ainetta tai niiden fragmenttia, joista kumpikin tunnis-
taa eri antigeenideterminantin ja käsittää kaksi identtis-
tää L-H-puolimolekyyliä, joita yhdistää vähintään yksi di-
10 sulfidisilta,

katkaistaan disulfidisillat, jotka yhdistävät L-H-
puolimolekyylit, jotka tunnistavat eri antigeenidetermi-
nantit olosuhteissa, jotka estävät H-ketjujen sisäisten
disulfidisiltojen muodostumisen, jolloin kumpikin vasta-
15 aine tai vasta-ainefragmentti jakautuu pariksi identtisiä
puolimolekyyliä,

muodostetaan mainituista eri antigeenideterminant-
teja tunnistavista puolimolekyyleistä tioliaktivointiai-
neella johdannainen, joka nopeasti reagoi vapaiden tiolien
20 kanssa muodostaen disulfideja ja toinen puolimolekyyli
muutetaan tioliaktivoidusta F(ab'):sta vapaaksi tioliksi,
tai vaihtoehtoisesti käytetään suoraan vapaita tiolipuoli-
molekyyliä, jotka muodostuvat toisen vasta-aineen tai sen
fragmentin katkaisureaktiossa, ilman aikaisempaa muutta-
25 mista tioliaktivointireagenssin avulla ja sitä seuraavaa
pelkistämistä,

sekoitetaan tioliaktivoidut puolimolekyylit vapai-
den tiolipuolimolekyylien kanssa, ja

erotetaan mahdolliset reagoimattomat puolimolekyy-
30 lit bispesifisistä vasta-aineista tai niiden fragmenteista
esim. molekyylikoon perusteella.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että

toinen monoklonaalisista IgG-vasta-aineista tai
35 vasta-ainefragmenteista käsittää kaksi identtistä L-H-

puolimolekyylisiä, joita sitoo toisiinsa useampia kuin yksi disulfidisilta.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että disulfidisiltojen muodostumi-
5 nen H-ketjujen sisäisesti estetään tekemällä halkaiseminen
ditiolikompleksointiaineen läsnäollessa.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että ditiolikompleksointiaine si-
sältää arseniitin.

10 5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että disulfidisiltojen muodostumi-
nen H-ketjujen sisäisesti estetään tekemällä halkaisu olo-
suhteissa, joissa H-ketjujen konformaatio muuttuu disulfi-
disiltojen muodostumisen estämiseksi.

15 6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että disulfidisiltojen muodostumi-
nen H-ketjujen sisäisesti estetään poistamalla halkaisun
jälkeen kaikki kysteiiniryhmät yhtä lukuunottamatta käyt-
tämällä proteolyyttistä entsyymiä.

20 7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että tioliaktiivointiaine käsittää
aromaattisen disulfidin.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että aromaattinen disulfidi on
25 5,5'-ditiobis(2-nitrobensoehappo).

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että aromaattinen disulfidi on
2,2'-dipyridiinidisulfidi.

30 10. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että aromaattinen disulfidi on
4,4-dipyridiinidisulfidi.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että, tioliaktiivointiaine käsittää
sulfiitin ja tetratioonin seoksen.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kun molemmista F(ab')-puoli-
molekyyleistä on muodostettu johdannaiset tioliaktivoi-
ntiaineen avulla, toinen puolimolekyyleistä muutetaan käy-
5 tettäviksi olevasta tioliaktivoituksesta F(ab'):sta vapaaksi
tioliksi.

13. Menetelmä nestemäisessä näytteessä olevan tun-
temattoman aineen määrän määrittämiseksi, joka aine saate-
taan reagoimaan ainakin ensimmäisen entsyymin kanssa, jol-
10 loin muodostuu mitattavissa oleva ioni tai yhdiste, joka
muodostunut ioni tai yhdiste toimii mainitun aineen mitta-
na, t u n n e t t u siitä, että

mainittu ensimmäinen entsyymin liitetään kiinteään
kantajaan tai toiseen, järjestyksessä aiemmin toimivaan
15 entsyymiin käyttämällä patenttivaatimuksen 1 mukaista vas-
ta-ainetta, jonka toinen L-H-puolimolekyyli on spesifinen
mainitun ensimmäisen entsyymimolekyylin eräälle antigeeni-
selle kohdalle ja toinen puolimolekyyli on spesifinen mai-
nitun kantajan tai mainitun toisen entsyymin eräälle anti-
20 geeniselle kohdalle,

määritetään mitattavissa oleva ioni tai yhdiste
näytteessä olevan tuntemattoman aineen määrittämiseksi.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että ioni tai yhdiste määritetään
25 mittaamalla fluoresenssi, väri tai luminesenssi.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en bispecifik monoklonal IgG-antikropp eller ett fragment därav, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

5 använder två olika monoklonala IgG-antikroppar eller fragment därav, vilka var för sig känner igen en olik antigendeterminant och omfattar två identiska L-H-halvmolekyler sammanbundna med åtminstone en disulfidbindning,

10 bryter disulfidbindingarna som binder samman de två L-H-halvmolekylerna, som känner igen olika antigendeterminanter, under förhållanden där disulfidbindingar inom H-kedjorna förhindras, varvid vardera antikroppen eller dess fragment spjälks upp i två identiska halvmolekyler,

15 bildar derivat av nämnda halvmolekyler, som känner igen olika antigendeterminanter, med ett tiolaktiverande agens, vilket derivat snabbt reagerar med fria tioler under bildande av disulfider, och konverterar en av halvmolekylerna från den tiolaktiverade F(ab') till fri tiol, eller alternativt direkt använder de fria tiolhalvmolekylerna, vilka bildas under spjälkningsreaktionen av den ena antikroppen eller dess fragment, utan föregående konvertering med ett tiolaktiverande agens och därpåföljande reduktion,

25 blandar de tiolaktiverade halvmolekylerna med de fria tiolhalvmolekylerna, och

separerar eventuella oreagerade halvmolekyler från de bispecifika antikropparna eller deras fragment t.ex. på basen av molekylvikt.

30 2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att den ena av de monoklonala IgG-antikropparna eller antikroppfragmenten omfattar två identiska L-H-halvmolekyler, vilka binds samman av mer än en disulfidbindning.

35 3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att bildandet av disulfidbindningar

inom H-kedjorna förhindras genom att utföra spjälkningen i närvaro av ett ditiolkomplexbildande medel.

5 4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e - t e c k n a t därav, att det ditiolkomplexbildande medlet omfattar en arsenit.

10 5. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e - t e c k n a t därav, att bildandet av disulfidbindningar inom H-kedjorna förhindras genom att utföra spjälkningen under förhållanden, där konformationen hos H-kedjorna modifieras för att förhindra bildandet av disulfidbindningar.

15 6. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e - t e c k n a t därav, att bildandet av disulfidbindningar inom H-kedjorna förhindras genom att man efter spjälkningen avlägsnar alla med undantag av en reducerad cystein-grupp genom att använda ett proteolytiskt enzym.

20 7. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e - t e c k n a t därav, att det tiolaktiveringsagenset omfattar en aromatisk disulfid.

25 8. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e - t e c k n a t därav, att den aromatiska disulfiden är 5,5-ditiobis(2-nitrobensoesyra).

30 9. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e - t e c k n a t därav, att den aromatiska disulfiden är 2,3'-dipyridindisulfid.

35 10. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e - t e c k n a t därav, att den aromatiska disulfiden är 4,4-dipyridindisulfid.

40 11. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e - t e c k n a t därav, att tiolaktiveringsagenset omfattar en blandning av sulfit och tetrationsat.

45 12. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e - t e c k n a t därav, att efter att man bildat derivat av de bägge F(ab')-halvmolekylerna med ett tiolaktiveringsagens, omvandlas den ena halvmolekylen från det tillgängliga tiolaktiverade F(ab'):et till fri tiol.

13. Förfarande för bestämning av mängden av en okänd substans i ett vätskeprov, varvid substansen bringas att reagera med åtminstone ett första enzym för att åstadkomma en mätbar jon eller förening, varvid den uppkomna jonen eller föreningen utgör ett mått på den nämnda substansen, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

5 binder nämnda första enzym vid en fast bärare eller vid ett andra, tidigare i sekvens verkande enzym genom att använda en antikropp enligt patentkravet 1, vars ena L-H-
10 halvmolekyl är specifik för en antigen plats på nämnda första enzyymmolekyl och den andra halvmolekylen är specifik för en antigen plats på nämnda underlag eller på nämnda andra enzym,

bestämmer den mätbara jonen eller föreningen som
15 ett mått på den okända substansen i provet.

14. Förfarande enligt patentkravet 13, k ä n n e t e c k n a t därav, att jonen eller föreningen bestäms genom att mäta fluorescens, färg eller luminescens.

000042 000044

LAKTOOSIN BIOLUMINESENSSITESTI

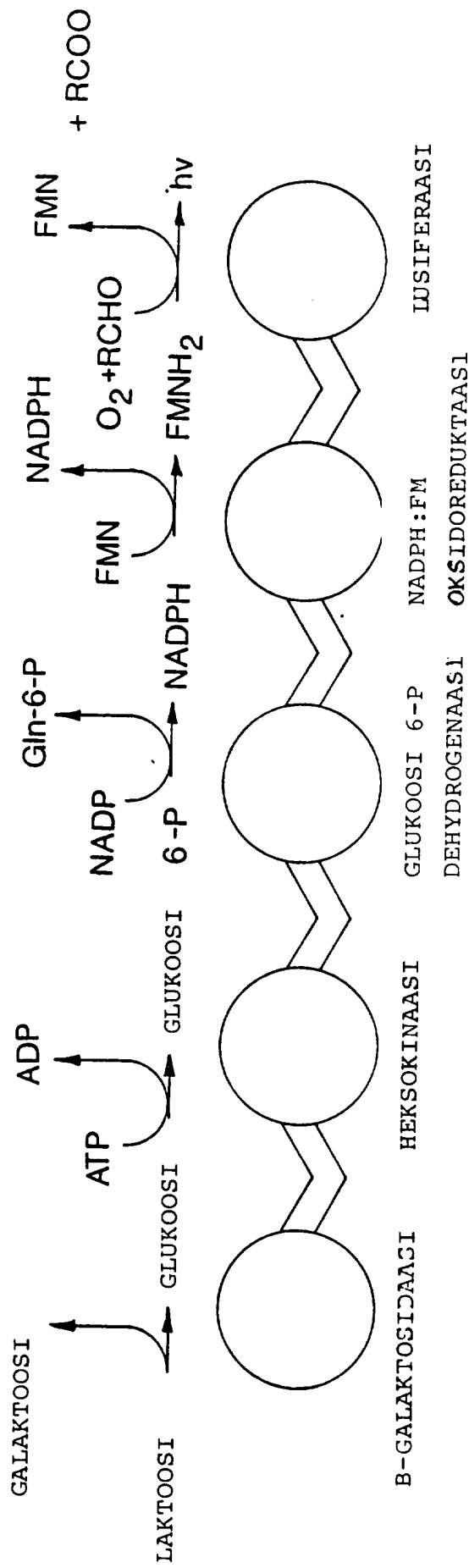
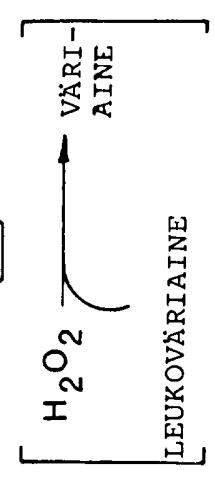
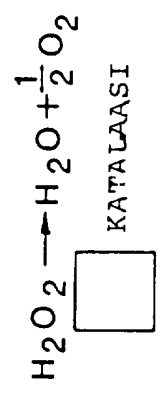
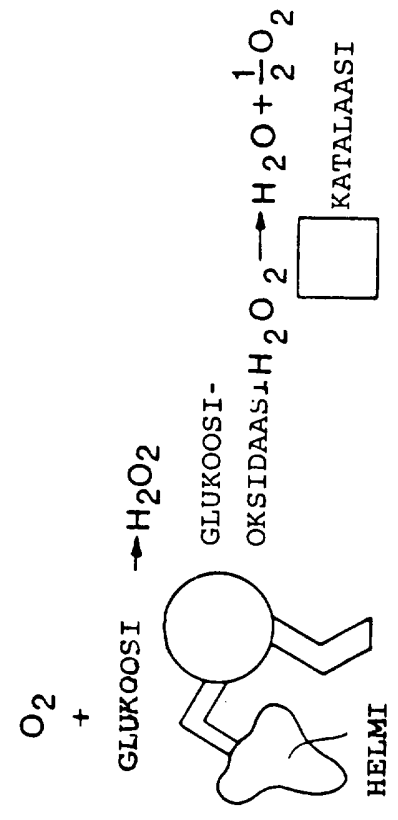


FIG. 1



KANAVOINTI-IMMUUNITUTKIMUS

EI ANTIGEENIA



ANTIGEENI MUKANA

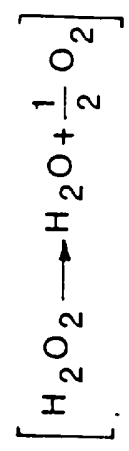
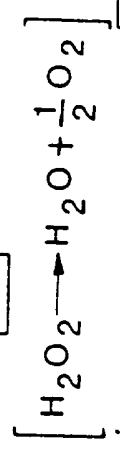
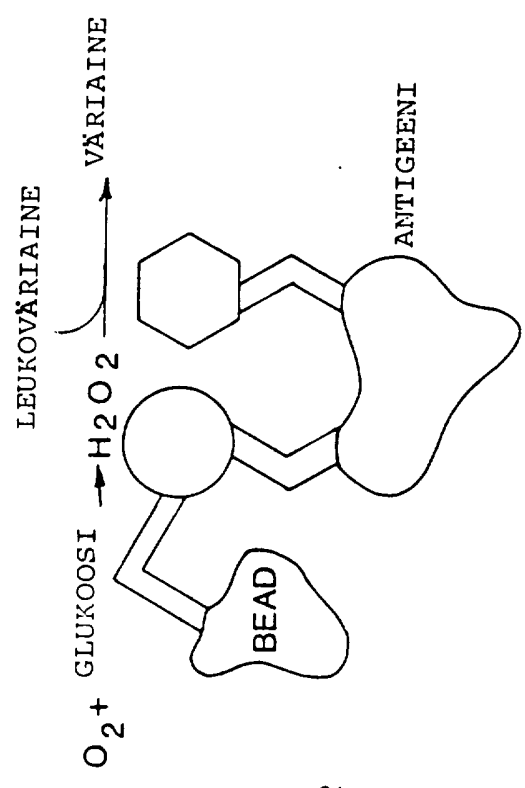
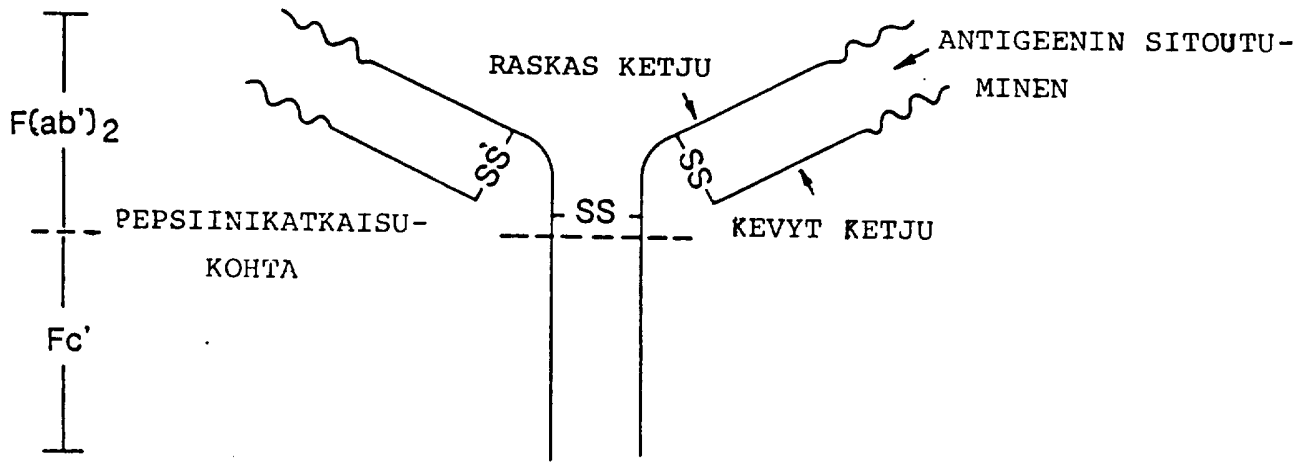


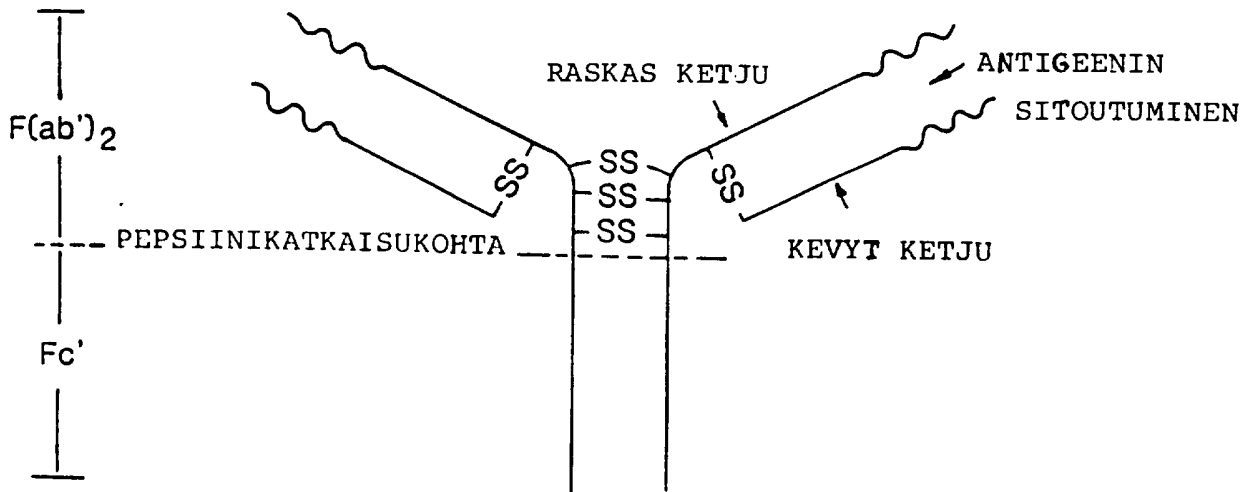
FIG. 2

FIG. 4

IMMUNOGLOBOLIINIMOLEKYyli



KANIININ IgG₁



HIIREN IgG₁

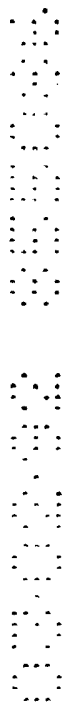


FIG. 6

MENETELMÄ MONOKLONAALISEN Fab'-FRAGMENTIN UUDELLEEN-

YHDISTÄMISEKSI SELEKTIIVISESTI

