



**SUOMI-FINLAND**  
(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**



F1000095579B

(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU**  
**UTLÄGGNINGSSKRIFT** 95579

C (45) **Patentti myönnetty**  
**Patent meddelat 26 02 1996**

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 07K 16/18, 19/00, 7/08, G 01N 33/68

(21) Patentihakemus - Patentansökning 882018

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 29.04.88

(24) Alkupäivä - Löpdag 29.04.88

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 03.11.88

(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. -  
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 15.11.95

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

02.05.87 DE 3714634 P

(71) Hakija - Sökande

1. Hoechst Aktiengesellschaft, 6230 Frankfurt am Main 80, Germany, (DE)
2. Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., Bunsenstrasse 10, 3400 Göttingen, Germany, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Brocks, Dietrich, Goethering 9, 6200 Wiesbaden, Germany, (DE)
2. Timpl, Rubert, Julius-Haerlinstrasse 3, 8035 Gauting, Germany, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Immunologinen menetelmä intaktin prokollageenipeptidin (tyyppi III) ja prokollageenin (tyyppi III) määrittämiseksi selektiivisesti elimistönesteistä ja väline sen toteuttamiseksi**  
**Förfarande för selektiv immunolog bestämning av intakt prokollagen peptid (typ III) och prokollagen (typ III) i kroppsvätskor och medel för utförande av detta**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 4940 (G 01N 33/16), EP A 89008 (G 01N 33/54)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää, jossa immunisoimalla eläimiä peptidillä, jolla on sekvenssi

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

ja joka on sidottu immunogeeniseen proteiiniin, muodostetaan vasta-aineita, joiden avulla voidaan määrittää selektiivisesti prokollageenipeptidi (tyyppi III) samoin kuin prokollageeni (tyyppi III) elimistönesteistä. Keksintö koskee myös kyseisiä vasta-aineita, immunogeeniseen proteiiniin sidottuja peptidisekvenssin sisältäviä yhdisteitä sekä niiden käyttöä.

Uppfinningen berör ett förfarande där man, genom att immunisera djur med en peptid med sekvenssen. I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P, som är bunden till ett immunogent protein, bildar antikroppar med vars hjälp man selektivt kan bestämma prokollagenpeptid (typ III) såväl som prokollagen (typ III) i kroppsvätskor. Uppfinningen berör också ifrågavarande antikroppar, föreningar som innehåller den till immunogent protein bundna peptidsekvensen, samt användningen av dessa föreningar.

Immunologinen menetelmä intaktin prokollageenipeptidin (tyyppi III) ja prokollageenin (tyyppi III) määrittämiseksi selektiivisesti elimistönesteistä ja väline sen toteuttamiseksi

5

Prokollageenipeptidi (tyyppi III) on kollageenin (tyyppi III) aminoterminaalinen propeptidi, joka pilkkoutuu solun ulkopuolisesti prokollageenimolekyylin (tyyppi III) erittymisen jälkeen. Radioimmunologisella määritysmenetelmällä, jota kuvataan EP-julkaisussa 4940, voidaan määrittää tämän prokollageenipeptidin pitoisuus elimistönesteissä. Seerumin peptidipitoisuuden tunteminen antaa tietoa sidekudossairauksien, esimerkiksi maksasairauksien aktiivisuudesta [Rohde, H. et al., Eur. J. Clin. Invest. 9 (1979) 451 - 459].

10

15

Prokollageenipeptidin (tyyppi III) tarkka selektiiviinen määrittäminen seerumista ja muista elimistönesteistä ei kuitenkaan ole mahdollista tähän mennessä kuvatuilla menetelmillä, koska polyklonaaliset vastaaineet, joita käytetään näissä menetelmissä, reagoivat erilaisten seerumissa esiintyvien antigeenien, jotka ovat osaksi prokollageenipeptidin (tyyppi III) hajoa- mistuotteita, kanssa vaihtelevalla, alemmalla affiniteetillä [Niemelä, O. et al., Clin. Chim. Acta 124 (1982) 39 - 44]. Tämä johtaa siihen, etteivät seerumista ja muista elimistönesteistä saatavat laimennuskäyrät ole yhdensuuntaisia pelkästä prokollageenipeptidistä (tyyppi III) saadun kalibrointikäyrän kanssa ja kustakin tuntemattomasta näytteestä täytyy siten määrittää antigeenipitoisuus useasta laimennoksesta antigeenipitoisuuden määrittämiseksi laimennuskäyrien 50 %:n leikkauskohdan avulla.

20

25

30

35

Tämän menetelmän lisäheikkoutena on se, että vasta-aineen ja rotan tai hiiren antigeenin välisen heikon ristireaktiivisuuden takia ei ole ollut mahdol-

lista määrittää näiden lajien elimistönesteiden antigeenipitoisuutta.

Menetelmällä, jota ovat kuvanneet Schuppan et al. [J. Hepatol. 3 (1986) 27 - 37], voidaan määrittää antigeenipitoisuus rotan seerumissa. Tälläkin menetelmällä on kuitenkin se sama ihmisseerumille tarkoitettun menetelmän yhteudessa kuvattu haittapuoli [Niemelä et al., Clin. Chim. Acta 124 (1982) 39 - 44], että eri elimistönesteiden inhibitiokäyrät eivät ole yhdensuuntaisia.

EP-hakemusjulkaisun 0 089 008 mukaisen menetelmän avulla on mahdollista ratkaista tämä tekninen ongelma käyttämällä vasta-aineita, joilla on vertailukelpoinen affiniteetti intaktin prokollageeni-peptidin (tyyppi III) ja sen pilkkoutumistuotteen Col 1 suhteen. Tällä menetelmällä määritetään intakti ja pilkkoutunut prokollageeni-peptidi (tyyppi III) yhdessä, mikä kuitenkin johtaa diagnostisen lausunnon epätarkkuuteen, koska normaali- ja potilasryhmät voivat olla voimakkaasti päällekkäisiä.

Yllättävästi on nyt havaittu, että käyttämällä peptidiä, jolla on tietty aminohapposekvenssi, voidaan saada immunisointia varten vasta-aineita, joiden avulla on mahdollista määrittää intakti prokollageeni-peptidi (tyyppi III) spesifisesti. Näiden vasta-aineiden avulla voidaan yllättävästi määrittää prokollageeni-peptidin (tyyppi III) pitoisuus myös rotan tai hiiren elimistönesteistä, mikä on hyödyksi fibrosuppressiivisten aineiden tutkimisessa eläinkokein.

Keksintö koskee siten menetelmää aminoterminaalisen prokollageeni-peptidin (tyyppi III) määrittämiseksi immunologisesti vasta-aineiden avulla, jolle menetelmälle on tunnusmerkillistä, että

a) eläimet immunisoidaan peptidillä, jolla on sekvenssi

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P,

ja joka on sidottu immunogeeniseen proteiiniin,

b) otetaan seerumista talteen vasta-aineet, jotka reagoivat intaktin aminoterminaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) kanssa ja

5 c) määritetään aminoterminaalisen prokollageeni-peptidin (tyyppi III) ja prokollageenin (tyyppi III) määrä muodostuneen antigeeni - vasta-aine-kompleksin kautta.

Keksintö koskee lisäksi vasta-aineita, joita muodostuu immunisoitaessa eläimiä edellä mainitulla peptidillä, joka on sidottu immunogeeniseen proteiiniin.

10 Seuraavassa kuvataan yksityiskohtaisesti keksintöä, erityisesti sen edullisia suoritusmuotoja. Keksintö määritellään lisäksi patenttivaatimuksissa.

Vasta-aineiden valmistamiseksi immunisoidaan eläimiä, edullisesti jyrsijöitä, kuten esimerkiksi kaniineja tai marsuja, tai vuohia tai lampaita sopivaan immunogeeniseen proteiiniin kytketyllä peptidillä, jolla on sekvenssi

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P,

15 täydellisen apuaineen läsnä ollessa. Erityisen edullisesti käytetään kaniineja. Immuunivastetta voimistetaan toistetulla sekundaari-injektioilla, esimerkiksi 4-8 viikon kuluttua. Immunisoitumisen onnistuminen tarkistetaan määrittämällä vasta-ainepitoisuus radioimmunologisella sitoutumistestillä (R. Timpl ja L. Risteli, *Immunochemistry of the extracellular matrix*, vol. 1, H. Furthmayr Ed. 20 1982, s. 199).

25 Soveltuvia proteiineja, joihin mainittu peptidi voidaan liittää, ovat kaikki immunogeeniset proteiinit. Edullisesti käytetään hemosyaniinia, albumiinia tai polylyysiiniä. Peptidi voidaan valmistaa alan ammattimiesten tuntemin menetelmin, kuten esimerkiksi menetelmillä, joita kuvaavat G. Barany ja A. B. Merrifield (*The Peptides*, 30 vol. 2, Academic Press 1980, s. 3 - 254) tai E. Brown, R. C. Sheppard ja B. J. Williams [*J. Chem. Soc. Perkin Transact. 1* (1983) 1161].

Keksinnön mukaisia vasta-aineita voidaan käyttää seerumina tai puhdistettuina erilaisissa immunologisissa menetelmissä mukaan luettuina radioimmuunimääritysten kaikki muodot, esimerkiksi sekventiaalisissa kyllästys-analyyseissa tai tasapainoanalyyseissä, leimaamisessa kloramiini T:llä tai Bolton - Hunter-reagenssilla [Felber, Meth. Biochem. Anal. 22 (1974) 1; Shelley et al., Clin. Chem. 19 (1975) 1467] samoin kuin muissa kompetitiivisissa sitoutumismäärityksissä, kuten fluoresenssi-, entsyymi-, kemiluminesenssi- tai muissa immuunimäärityksissä. Vasta-aineita voidaan siten käyttää immunologisissa menetelmissä kudoksissa ja elimistönesteissä esiintyvän prokollageenipeptidin (tyyppi III) eristämiseksi ja karakterisoimiseksi samoin kuin määrittämiseksi kvantitatiivisesti. Kvantitatiivisen määrityksen tekemiseksi käytetään alan ammattimiesten sinänsä tuntemia menetelmiä, joissa nestemäinen näyte, joka sisältää prokollageenipeptidiä (tyyppi III), saatetaan reagoimaan keksinnön mukaisen vasta-aineiden kanssa ja määritetään prokollageenipeptidin (tyyppi III) määrä muodostuneen antigeeni - vasta-aine-kompleksin kautta. Tällöin ei ole merkitystä sillä seikalla, onko prokollageenipeptidi (tyyppi III) vielä kytkeytyneenä prokollageenin (tyyppi III) aminopäähän vai ei. Keksinnön mukaiset vasta-aineet eivät tunnista immunologista määritystä tähän asti häirinneitä prokollageenipeptidin (tyyppi III) hajoamistuotteita, erityisesti Col 1:ä.

Keksintöä valaistaan tarkemmin seuraavissa esimerkeissä. Prosenttisuudet ovat painoprosentteina, ellei toisin mainita.

Esimerkki 1

Peptidi-hemosyaniinikonjugaattiyhdisteen valmistus

100 mg hemosyaniinia [dialysoitu vettä (5 x 3 l)  
vastaan ja kylmäkuivattu sitten] liuotetaan veteen (3 ml),  
5 ja lisätään 24 mg peptidiä I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P .  
Huoneen lämpötilassa sekoittaen lisätään 2 tunnin aika-  
na annoksittain kaikkiaan 1 g. N-sykloheksyyli-N'-[2-(4-  
morfolinyyli)-etyyli]karbodi-imidi-metyyli-p-tolueenisul-  
fonaattia. Kun reaktioseosta on sekoitettu yön yli, sitä  
10 dialysoidaan 24 tuntia vettä (5 x 10 l) vastaan, ja eris-  
tetään tuote sitten kylmäkuivaamalla. Saadaan 137 mg kon-  
jugaattiyhdistettä.

Esimerkki 2

Radioimmunisitoutumistesti

15 300  $\mu$ l esimerkin 1 mukaisesti valmistetulla kon-  
jugaatilla immunisoidun kaniinin antiseerumia, joka on  
laimennettu sopivalla tavalla, inkuboidaan yön yli liuok-  
sen (100  $\mu$ l) kanssa, joka sisältää prokollageenipepti-  
diä (tyyppi III) (1 ng proteiinia/100  $\mu$ l, valmistettu  
20 EP-julkaisun 4940 esimerkin 1 mukaisesti), joka on radio-  
leimattu  $^{125}$ I:llä. Muodostuneet antigeeni - vasta-aine-  
kompleksit saostetaan lisäämällä immunisointiin käytetyn  
lajin immunoglobuliini G:n vastaista toisen lajin anti-  
seerumia. Sentrifugoinnin ja supernatantin dekantoinnin  
25 jälkeen määritetään saostuneen radioaktiivisuuden määrä  
V-skintillaatiospektrometrillä.

Esimerkki 3

Radioimmunitesti

30 0,2 ml analysoitavaa näytettä tai prokollageeni-  
peptidi (tyyppi III) -standardia inkuboidaan lämpötilas-  
sa 4°C yön yli antiseerumin (0,1 ml:ssa puskuria) kanssa,  
jonka määrä on rajoitettu leimatun antigeenin määrän suh-  
teen. Kün on lisätty 0,1 ml  $^{125}$ I-leimattua prokollageeni-  
peptidin (tyyppi III) liuosta (sisältää 1 ng proteiinia),  
35 inkuboidaan 6 - 8 tuntia lämpötilassa 4°C. Muodostunut

antigeeni - vasta-aine-kompleksi saostetaan immunisointiin käytetyn lajin IgG:n vastaisella antiseerumilla. Sentrifugoinnin ja supernatantin dekantoinnin jälkeen määritetään saostunut radioaktiivisuus  $\gamma$ -skintillaatio-spektrometrillä.

Vertaamalla kalibrintikäyrään, jonka muodostamiseen on käytetty standardeja, joissa prokollageenipeptidin (tyyppi III) pitoisuus vaihtelee, voidaan määrittää prokollageenipeptidin (tyyppi III) pitoisuus tuntemattomassa liuoksessa.

#### Esimerkki 4

Keksinnön mukaisten vasta-aineiden kanssa reagoivien antigeenien molekyylipainojakakutuman määrittäminen esimerkiksi naudan tai sian seerumista

Seeruminäytteelle (1 ml) tehdään geelisuodatuskromatografinen erotus Sephacryl S 300<sup>®</sup>-pylväällä (1,6 x 130 cm), joka on tasapainotettu fosfaattipuskuroidussa fysiologisessa suolaliuoksessa (PBS), joka sisältää 0,04 % Tween 20:ä. Kustakin fraktiosta (2,8 ml) käytetään 0,2 ml esimerkin 3 mukaiseen radioimmuunitestiin.

Kuvio 1a esittää sian seerumin antigeenin eluoitumiskäyrää ja kuvio 1b naudan seerumin eluoitumiskäyrää verrattuna EP-julkaisun 4940 mukaisesti määritetyn antigeenin käyrään. Piikit 1/1a vastaavat intaktia prokollageenia (tyyppi III) tai pN-kollageenia (tyyppi III) (prokollageeni, josta puuttuu C-terminaalinen pää); piikit 2/2a vastaavat intaktia aminotermiinalista prokollageenipeptidiä (tyyppi III); piikit 3/3a vastaavat Col 1:ä samoin kuin aminotermiinalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) pilkkoutumistuotteita, joilla on sama molekyylipaino kuin Col 1:llä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä aminoterminaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) määrittämiseksi immunologisesti vasta-aineiden avulla, t u n n e t t u siitä, että

a) immunisoidaan eläimiä peptidillä, jolla on sekvenssi

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

10

ja joka on sidottu immunogeeniseen proteiiniin,

b) otetaan seerumista talteen vasta-aineet, jotka reagoivat intaktin aminoterminaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) kanssa ja

15 c) määritetään aminoterminaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) ja/tai prokollageenin (tyyppi III) määrä muodostuneen antigeeni - vasta-aine-kompleksin avulla.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että peptidi on sidottu hemosyaniiniin, albumiiniin tai polylyysiiniin.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immunisoidaan jyrsojaita, vuohia, lampaita tai kaniineja.

4. Vasta-aine aminoterminaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) immunologista määrittämistä varten, t u n n e t t u siitä, että se reagoi intaktin aminoterminaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) ja/tai intaktin prokollageenin (tyyppi III) kanssa, mutta ei Col 1 kanssa eikä aminoterminaalisen prokollageenipeptidin (tyyppi III) hajoamistuotteiden kanssa, joilla on sama molekyylipaino kuin Col 1-fragmentilla, ja se on saatavissa immunisoimalla eläimiä peptidillä, jolla on sekvenssi

35

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

ja joka on sidottu immunogeeniseen proteiiniin.



5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen vasta-aine,  
t u n n e t t u siitä, että peptidi on sidottu hemosya-  
niiniin, albumiiniin tai polylyysiiniin.

5 6. Patenttivaatimuksen 4 tai 5 mukainen vasta-aine,  
t u n n e t t u siitä, että immunisoidaan jyrsojaita,  
vuohia, lampaita tai kaniineja.

7. Yhdiste, t u n n e t t u siitä, että se koos-  
tuu peptidistä, jolla on sekvenssi

10

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

ja joka on sidottu immunogeeniseen proteiiniin, edullises-  
ti hemosyaniiniin, albumiiniin tai polylyysiiniin.

15 8. Patenttivaatimuksen 7 mukaisen yhdisteen käyttö  
antigeenina.

## Patentkrav

1. Förfarande för bestämning av aminoterminal pro-  
kollagenpeptid (typ III) immunologiskt med hjälp av anti-  
5 kroppar, k ä n n e t e c k n a t därav, att

a) djur immuniseras med en peptid med sekvensen

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

10 vilken bundits vid ett immunogent protein,

b) antikroppar som reagerar med intakt aminotermi-  
nal prokollagenpeptid (typ III) tas tillvara ur serumet  
och

15 c) mängden av aminoterminal prokollagenpeptid (typ  
III) och/eller prokollagen (typ III) bestäms medelst det  
bildade antigen - antikropp -komplexet.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -  
t e c k n a t därav, att peptiden bundits vid hemocyanin,  
albumin eller polylysin.

20 3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n -  
n e t e c k n a t därav, att man immuniserar gnagare,  
getter, lamm eller kaniner.

4. Antikropp för immunologisk bestämning av amino-  
terminal prokollagenpeptid (typ III), k ä n n e t e c k -  
25 n a d därav, att den reagerar med intakt aminoterminal  
prokollagenpeptid (typ III) och/eller intakt prokollagen  
(typ III) men inte med Col 1 eller nedbrytningsprodukter  
av aminoterminal prokollagenpeptid (typ III), vilka har  
30 samma molekylvikt som Col 1 -fragmentet, och kan fås genom  
att immunisera djur med en peptid med sekvensen

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

vilken bundits vid ett immunogent protein.

5. Antikropp enligt patentkrav 4, k ä n n e -  
t e c k n a d därav, att peptiden bundits vid hemocyanin,  
albumin eller polylysin.

5 n e t e c k n a d därav, att man immuniserar gnagare,  
getter, lamm eller kaniner.

7. Förening, k ä n n e t e c k n a d därav, att  
den består av en peptid med sekvensen

10

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

vilken bundits vid ett immunogent protein, fördelaktigt  
hemocyanin, albumin eller polylysin.

15 8. Användning av en förening enligt patentkrav 7  
som antigen.



