(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 641 T2** 2005.11.03

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 675 903 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 641.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/12539**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 907 102.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/014844**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.12.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **07.07.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.10.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **29.09.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.11.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 7/08**
G01N 33/53

(30) Unionspriorität:
998078 **28.12.1992** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Baylink, David Jeston, Redlands, Calif., US

(72) Erfinder:
gleich Anmelder

(74) Vertreter:
Vonnemann, Kloiber & Kollegen, 80796 München

(54) Bezeichnung: **METHODE ZUR MESSUNG DER KNOCHENRESORPTION**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Messen von Knochenresorptionsgeschwindigkeiten. Spezifischer betrifft es die Verwendung von Peptiden vom Typ-I-Kollagen-C-Telopeptid und Antikörpern, die für diese Peptide spezifisch sind, zum Messen spezifischer Urin- und Serumpeptide, die beim Abbau von Knochenkollagen erzeugt werden.

[0002] Osteoporose ist eine weit verbreitete Krankheit, die schätzungsweise 15–20 Millionen Menschen in den Vereinigten Staaten beeinträchtigt. Die Störung ist gekennzeichnet durch eine Abnahme von Knochenmasse, was zu einer Schwächung des Knochens führt. Der Grad der Abnahme kann stark genug sein, um zum spontanen Auftreten von Brüchen oder zu einem kleinen Trauma zu führen. Osteoporose ist am verbreitetsten bei post-menopausalen Frauen mit 25% der Frauen oberhalb eines Alters von 60, welche unter Rückgratstauchungsbrüchen leiden. Obwohl diese Brüche selten tödlich sind, sind andauernder Schmerz und Rückgratdeformierung eine Hauptquelle von Behinderungen bei Älteren. Andererseits verursachen Hüftbrüche nicht nur Schmerzen und Behinderung, sondern führen auch innerhalb von sechs Monaten des akuten Bruchs bei 15% der Patienten zum Tod. Jene 30% von Frauen mit Hüftbrüchen in der Zeit, wo sie das Alter von 90 erreichen, zeigen das Ausmaß dieses Problems. Obwohl meistens bei post-menopausalen Frauen, kann Osteoporose auch bei älteren Männern oder Amenorrhoen-Frauen auftreten. Die jährlichen Kosten zur Versorgung von Osteoporose-bezogenen Verletzungen werden auf 7 Milliarden Dollar geschätzt (Barnes, O. M., Science, 236: 914 (1987)).

[0003] Einige Verfahren existieren zum Bestimmen von Knochenmasse und daher zur Osteoporosediagnose. Unter diesen sind Einphotonenabsorptionsmessung, Dualphotonenabsorptionsmessung und quantitativ berechnete Tomographie. Obwohl sehr gut beim Aufzeigen der vorhandenen Knochehdichte, sind diese Verfahren nicht in der Lage, eine genaue Bestimmung der Knochenschwundgeschwindigkeit zu ergeben. Daher können gegenwärtige Verfahren nicht angewendet werden, um die Effizienz von Kurzzeittherapie für die Osteoporosebehandlung zu überwachen.

[0004] Ein Verfahren zum Bestimmen der gegenwärtigen Knochenschwundgeschwindigkeit wäre von großem Nutzen bei der Überwachung der Osteoporose. Ansätze, die derzeit für diesen Zweck verwendet werden, basieren auf dem Freisetzen spezifischer Aminosäuren oder Peptide von abgebautem Kollagen, dem am meisten in Knochen gefundenen Protein.

[0005] Typ-I-Kollagen ist einzigartig für Bindegewebe und ist ein Hauptbestandteil in Knochen. Jede Typ-I-Kollagenfaser besteht aus drei langen helikalen Polypeptidketten (zwei α1(I)-Ketten und eine α2(I)-Kette), welche dicht aneinander binden können. Die normale Synthese und Abbau dieses Kollagentyps kann während der Pathogenese von vielen Krankheitsarten einschließlich Osteoporose verändert sein. Da Knochen über das gesamte Leben hinweg ein metabolisch aktives Gewebe ist, könnten Indikatoren vom Typ-I-Kollagen-Umsatz nützlich als Marker bei metabolischer Knochenkrankheit sein.

[0006] Die Hauptmittel zum Einschätzen der metabolischen Geschwindigkeit von Knochenkollagen waren es, Urinexkretion von Hydroxyprolin zu quantifizieren, welches aus Kollagen-Proteinen abgeleitet ist. Unglücklicherweise erwies sich dieser Test als mühselig, mit einigen Fehlerquellen behaftet und nicht für Typ-I-Kollagen spezifisch Azria, Calcif. Tissue Int. 45: 7–11 (1989). Hydroxyprolin ist eine Aminosäure, die als Ergebnis von post-translationaler Modifikation von Prolin bei Kollagensynthese resultiert. Sie wird fast ausschließlich in Kollagen gefunden. Beim Abbau von Kollagen wird Hydroxyprolin in das Serum freigesetzt und aus dem Körper im Urin ausgeschieden. Es gibt hingegen Schwierigkeiten bei der Verwendung von Hydroxyprolin als Marker von Knochenresorption. Erstens wird Hydroxyprolin in allen Kollagenen gefunden, nicht Typ-I-Kollagen, dem im Knochen gefundenen Typ. Daher ist es nicht ein gänzlich für Knochen spezifischer Marker bzw. Markierung. Zweitens wird ein großer Anteil von aus Knochenabbau erzeugtem Hydroxyprolin durch die Leber metabolisiert und erscheint niemals im Urin. Schließlich schlug man vor, dass etwa 10% des Urinhydroxyprolins indikativ für Knochenbildung und nicht Resorption sind, wobei es bei der proteolytischen Bearbeitung von Prokollagen freigesetzt wird. Auf Grund dieser Probleme ist Hydroxyprolin kein verlässliches quantitatives Verfahren zur Analyse von Knochenresorption. Trotz dieser Rückschläge bleibt Urinhydroxyprolin die meistverwendete Markierung für Knochenresorption.

[0007] Hydroxylysin ist eine zweite für Kollagen und kollagenartige Peptide einzigartige Aminosäure. Ähnlich zu Hydroxyprolin wird Hydroxylysin durch post-translationale Modifizierung von Lysin bei Kollagensynthese er-

zeugt. Anders als Hydroxyprolin kann diese Aminosäure weiter durch Glycosylierung modifiziert werden, um Galaktosylhydroxylysin (GHyl) und Gucosylgalaktosylhydroxylysin (GGHyl) zu erzeugen. Obwohl Hydroxylysin in allen Kollagenen gefunden wird, ist das Verhältnis von GHyl zu GGHyl höher in Knochengewebe als bei anderen Kollagenen, während GGHyl höher bei der Haut ist. Das Urin-GGHyl : GHyl-Verhältnis in normalen Erwachsenen ist größer als 1,0, während in schnell wachsenden Kindern oder Patienten mit Knochenstörung wie Paget's Krankheit, eine Krankheit, die durch vergrößerte Knochenresorption gekennzeichnet ist, das Verhältnis von GGHyl zu GHyl kleiner als 1,0 ist. Anders als Hydroxyprolin werden Hydroxylysinglycoside nicht signifikant von Urinexkretion metabolisiert. Daher wurde geschätzt, dass Urinhydroxylysinglycoside für 50 bis 100% Kollagen-Abbau gegenüber 10 bis 25%, die für Hydroxyprolin geschätzt wurden, verantwortlich sein können. Obwohl das Potenzial zur Verwendung von Urinhydroxylysinglycosidverhältnisse als Marker für Knochenresorption groß ist, sind die vorhandenen Verfahren zu dessen Bestimmung mühselig, was dessen Messungen unpraktisch außerhalb eines klinischen Labors macht. Auf Grund der weit verbreiteten Natur von mit Knochenresorption verbundenen Krankheiten fehlt Tests, welche nicht durch Gemeindekliniklabors durchgeführt werden können, allgemeine klinische Anwendbarkeit.

[0008] Eine dritte Gruppe von als potenzielle Marker von Kollagenabbau vorgeschlagenen Verbindungen sind Pyridiniumvernetzungen. Pyridiniumvernetzungen sind von der Kondensation von drei Hydroxylysin- oder Lysinresten durch die Wirkung von Lysyloxidase abgeleitet. Von diesen Verbindungen wurde gezeigt, dass sie als Vernetzungen zwischen Kollagenketten dienen und sich beim Reifen von Kollagen bilden. Die chemischen Formen von Pyridiniumresten wurden identifiziert. Hydroxylysylpyrodinolin (LP), auch bezeichnet als Pyridinolin, wird vorwiegend in nicht-Knochenkollagen wie Knorpel gefunden. Lysylpyridinolin (LP), auch Deoxidpyridinolin genannt, ist wie die vorwiegend in Knochen und Zahn gefundene Form. Beim Kollagenabbau werden Pyridiniumvernetzungen freigesetzt und durch die Nieren entfernt. Beide Verbindungen sind natürlicherweise fluoreszent mit denselben Anregungs- und Emissionsspektren. Sie ermöglichen es ihnen, direkt vom Urin aufgelöst und untersucht zu werden. Unglücklicherweise involviert der Test extensive Hydrolyse von Urin, gefolgt durch Ionenaustauschchromatographie und Hochdruckflüssigchromatographie mit umgekehrter Phase. Obwohl dieses Verfahren reproduzierbare Ergebnisse liefert, ist es mühselig und stellt sich nicht zum Messen von großen Anzahlen von klinischen Proben zu Verfügung.

[0009] Ein enzymgebundener Immuntest, um HP-Urin zu messen, wurde berichtet (Robins, Biochem J., 207: 617–620 (1982)). Dieser Ansatz verwendete polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der gegen freies HP erzeugt wurde, das an das Rinderserumalbumin konjugiert worden ist. Unter Verwendung dieses Ansatzes war Robbins in der Lage, Unterschiede zwischen HP-Pegeln im Urin von normalen Erwachsenen und Patienten mit Arthritisgelenkkrankheiten zu zeigen. Obwohl Robbins in der Lage war, HP-Pegel im Urin bei Konzentrationen zu zeigen, die proportional zur Geschwindigkeit von Gelenkknorpel-Resorption war, konnte die Erhöhung bei HP aus Knorpelabbau allein resultieren und daher konnte keine verlässliche Information auf Knochenresorption von diesem Ansatz erhalten werden.

[0010] Andere Immunoassays bzw. -tests zum Messen von sowohl HP als auch LP sind entwickelt worden, Robins, Biochem J., 207: 617–620 (1982). Dieser Ansatz reagiert nur mit freien Vernetzungen und reagiert nicht mit den peptidgebundenen Vernetzungen und ist daher keine genaue Abbildung von Resorption.

[0011] Hanson und Eyre, J. Bone & Mineral Res. 6: (Suppl. 1) 251 (1991) und Risteli et al., J. Bone & Mineral Res. 6: (Suppl. 1) 251 (1991) haben die Entwicklung von Immuntests berichtet, die auf vernetzten Kollagenpeptiden basieren, gefunden entweder im Urin wie beschrieben von Hanson, US-Patent Nr. 4,973,666 oder freigesetzt aus menschlichem Femurknochen durch Enzymabbau. Beide diese Tests messen Pegel von pyridinolinvernetzten Kollagenpeptiden. Unglücklicherweise ist die Konzentration der Vernetzungen im Knochen nicht invariant. Die Konzentration von Vernetzungen im Knochen kann zwischen verschiedenen Knochentypen variieren und ferner zwischen dem Knochen verschiedener Subjekte. Das im Knochen gebildete Pyridinolin ist eine post-translationale Modifikation des Kollagenmoleküls. Diese post-translationale Änderung variiert mit dem Ernährungszustand des Patienten, mit dem Hormonzustand, mit dem Alter des Patienten und variiert beträchtlich von Patient zu Patient. Die Menge an Pyridinolin, die im Serum oder Urin erscheint, wird eine direkte Abbildung der Menge im Knochen sein. Daher hängen Urin- und Serumkonzentrationen von sowohl den Vernetzungen selbst als auch den vernetzten Kollagenpeptiden nicht nur von der Menge an Knochenresorption ab, sondern auch vom resorbierten Knochentyp und der Konzentration von Vernetzungen im Knochen. Diese Variablen begrenzen die klinische Verwendbarkeit von Tests, welche Pyridinolin oder pyridinolinvernetzte Peptide messen, da die Menge von Knochenresorption nicht bezogen auf Pyridinolin vorhersagbar gemessen wird.

[0012] EP 505,210A offenbart die Verwendung eines für Typ-I-Kollagen-carboxydaminales Telopeptid spezifischen Antikörpers beim Testen auf die Gegenwart oder den Pegel von Typ-I-Kollagen-Abbauprodukten einer

Probe, welche bekannt oder vermutet wird, dieses Abbauprodukt zu enthalten.

[0013] Was benötigt wird, ist ein Ansatz, der ein Abbauprodukt von Kollagen misst, welches nicht durch Diät, Hormonstatus, Alter oder Krankheit beeinflusst wird. Dieses Verfahren sollte eines sein, das an Körperflüssigkeiten wie Serum oder Urin angewandt werden kann. Das Verfahren sollte auch sensitiv und in der Lage sein, schnell Knochenresorptionsgeschwindigkeiten zu bestimmen, so dass man es dazu verwenden kann, um verschiedene therapeutische Maßnahmen zu bewerten. Die vorliegende Erfindung erfüllt dieses und andere Bedürfnisse.

Zusammenfassung der Erfindung

[0014] Es wird ein Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit eines C-Telopeptids von Typ I-Kollagen in einem Individuum offenbart, umfassend: (a) das Inkubieren unter Bedingungen, die zur Bildung von Immunkomplexen führen, (i) einer Probe dieses Individuums, von welcher man vermutet, dass sie C-Telopeptid von Typ I-Kollagen enthält und (ii) einem C-Telopeptid-Antikörper, welcher immunologisch reaktiv mit einem Epitop ist, das in der Sequenz Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ-ID Nr. 1) enthalten ist, welches Epitop immunologisch mit einem Epitop von C-Telopeptid von Typ I-Kollagen kompetitiv ist, und (iii) einem Peptid, welches immunologisch an den Antikörper bindet, und welches markiert wird, um ein detektierbares Signal des Peptids zu ergeben, das sechs bis fünfzig Aminosäuren hat und ein Epitop hat, welches in der Sequenz Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ-ID Nr. 1) enthalten ist, worin dem Peptid Pyridinolin-Kreuzvernetzungen fehlen und worin dieses Peptid immunologisch mit C-Telopeptid von Typ I-Kollagen konkurriert; und (b) das Detektieren dieser Markierung und daraus die Bestimmung der Anwesenheit des C-Telopeptids von Typ I-Kollagen in dem Individuum.

[0015] Weiterhin wird ein Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit eines C-Telopeptids von Typ I-Kollagen in einem Individuum offenbart, umfassend: (a) das Inkubieren unter Bedingungen, die zur Bildung von Immunkomplexen führen (i) von einer Probe dieses Individuums, von welcher man vermutet, dass sie C-Telopeptid vom Typ I-Kollagen enthält und (ii) einen C-Telopeptid-Antikörper, welcher immunologisch reaktiv mit einem Epitop ist, das in der Sequenz Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ-ID Nr. 1) enthalten ist, welches Epitop immunologisch mit einem Epitop von C-Telopeptid vom Typ I-Kollagen kompetitiv ist, und (b) entweder gleichzeitig mit oder nach der Inkubation der Probe mit dem Antikörper, das Inkubieren eines an eine feste Phase gebundenen Peptids, wobei das Peptid den Antikörper immunologisch bindet, wobei das Peptid sechs bis fünfzig Aminosäuren hat und ein Epitop hat, welches in der Sequenz Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ-ID Nr. 1) enthalten ist, worin dem Peptid Pyridinolin-Kreuzverbindungen fehlen und worin dieses Peptid immunologisch mit C-Telopeptid von Typ I-Kollagen kompetitiert; (c) die Trennung von Immunkomplexen, welche an die Festphase gebunden sind, von ungebundenen Substanzen; Inkubieren der getrennten Immunkomplexe, die an die Festphase mit einem zweiten Antikörper gebunden sind, welcher an den C-Telopeptid-Antikörper bindet und markiert wird, um ein detektierbares Signal zu ergeben; (e) Detektieren des Signals entweder gebunden an die Festphase oder in Lösung verbleibend; und (f) daraus Bestimmung der Anwesenheit des C-Telopeptids von Typ I-Kollagen in dem Individuum.

[0016] Ein Testkit zur Bestimmung der Anwesenheit eines C-Telopeptids vom Typ I-Kollagen in einem Individuum wird auch offenbart, worin der Kit umfasst: einen C-Telopeptid-Antikörper, der immunologisch mit einem Epitop reaktiv ist, das in der Sequenz Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ-ID Nr. 1) enthalten ist, welches Epitop immunologisch kompetitiv mit einem Epitop von C-Telopeptid von Typ I-Kollagen ist, und ein Peptid, welches immunologisch an den Antikörper bindet, wobei das Peptid, das sechs bis fünfzig Aminosäuren hat und ein Epitop hat, welches in der Sequenz Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ-ID Nr. 1) enthalten ist, worin dem Peptid Pyridinolin-Kreuzverbindungen fehlen und worin dieses Peptid immunologisch mit C-Telopeptid vom Typ I-Kollagen konkurriert, einem Marker von Typ-I-Kollagen-Abbau in einem Individuum folglich als sensitiver und spezifischer Indikator für Knochenresorption dient. Tests für das C-Telopeptid finden eine Vielzahl von Anwendungen, einschließlich Verwendung bei der Diagnose von metabolischen Knochenstörungen wie Osteoporose oder post-menopausaler Knochenschwund Überwachen der Effizienz von therapeutischen, auf die Behandlung solcher Störungen geplanten Maßnahmen, Bestimmen des Ausmaßes von Ungleichgewichten zwischen Knochenbildung und Resorption, Knochenzerstörung aus Paget's Krankheit oder Malignitäten bzw. Tumoren.

[0017] Diese Ansätze der vorliegenden Erfindung setzen C-Telopeptide von humanem Typ-I-Kollagen und

Antikörper ein, die für diese Peptide spezifisch sind. Spezieller umfassen die Peptide der Erfindung 6 bis 50 Aminosäuren und haben wenigstens ein Epitop, welches immunologisch mit dem nativen C-Telopeptid vom Typ-I-Kollagen konkurriert. Das (die) Epitop(e) ist in der Sequenz Asp-Phe-, Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ ID NR.: 1) enthalten. Die Peptide werden typischerweise ferner wenigstens ein Cys- und/oder Tyr-Rest an den N- oder T-Restenden umfassen, um Konjugation zur Markierung und dergleichen zu erleichtern. Entweder polyklonale oder monoklonale Antikörper werden geliefert, welche spezifisch an ein Peptid der Erfindung binden und so eine Vielzahl von Immuntestformaten ermöglichen. Insbesondere nützlich sind Radiolmmuntests und enzymgebundene Immunosorbenstests, um einfach Pegel von C-Telopeptid vom Typ-I-Kollagen in einer Probe wie Urin, Serum oder Plasma zu bestimmen, die von einem Individuum von Interesse erhalten wurde.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0018] Fig. 1 veranschaulicht die mittlere Serumkonzentration von C-Telopeptid, gemessen durch Verfahren der vorliegenden Erfindung in Erwachsenen und Kindern.

[0019] Fig. 2 veranschaulicht das mittlere Urin-C-Telopeptid- (in Milligramm) zu Kreatin-(in Mikrogramm)-Verhältnis in normalen Erwachsenen und Kindern.

Beschreibung der spezifischen Ausführungen

[0020] Diese Erfindung ergibt einen Immuntest für C-Telopeptid in humanem Typ-I-Kollagen unter Verwendung eines synthetischen Peptids wie dem Antigen. Das verwendete Peptid basiert auf einem kurzen Peptid, das aus Urin eines Patienten mit Paget's Krankheit von dem Knochen gereinigt wurde. Eines der Merkmale dieser Krankheit ist die vergrößerte Knochenresorption. Das in den Urin dieser Patienten exkretierte Peptid ist ein 18-Aminosäurenpeptid, das vom proteolytischen Abbau vom Typ-I-Kollagen erzeugt wird. Es besteht aus den Aminosäuren 1036 bis 1053 der α1(I)-Kette. Das für diese Erfindung verwendete synthetische Peptid besteht aus denselben achtzehn Aminosäuren mit Addition eines Tyrosin und eines Cystein am aminoterminalen Ende des ersten Peptids. Der Zweck dieser Addition von zwei Aminosäuren ist es, eine Stelle zum Binden des Peptids an ein Trägerprotein zu ergeben, zur Immunisierung von Tieren zur Antikörperproduktion und um eine Stelle zum radioaktiven Markieren des Peptids zu ergeben. Eine Ausführung des C-Telopeptids dieser Erfindung ist in SEQ ID Nr.: 1 veranschaulicht.

[0021] Die vorliegende Erfindung ergibt einen C-Telopeptid-Typ-I-Kollagentest, um ein Abbauprodukt von Kollagen zu messen, das unabhängig von der Menge von Pyridinolin im Knochen ist. Darüber hinaus ist die Konzentration dieses C-Telopeptids im Kollagen einheitlich, da dieses C-Telopeptid in Typ-I-Kollagen-Molekülen vorliegt. Daher eliminiert dieser Test den Hauptnachteil von Pyridinolin oder Pyridinolinpeptidtests, welcher die Variabilität des Pyridinolingehalts im Knochen unter verschiedenen Patienten ist.

[0022] Die vorliegende Erfindung ergibt C-Telopeptide, die von Prokollagen-alpha(α)1-Kette vom Typ-I-Kollagen abgeleitet sind, zur Verwendung in Zusammensetzungen und Verfahren zur Diagnose, Screening bzw. Absuchen und Überwachung von Knochenbildung bei einem Individuum. Die Peptide und/oder Antikörper dazu sind nützlich in Tests, um den Gehalt an Typ-I-Kollagen-Abbau zu bestimmen und ergeben daher eine spezifische und sensitive Bestimmung der Knochenresorption.

[0023] Die Peptide der vorliegenden Erfindung sind abgeleitet von der C-Telopeptid-Region von α1(I)-Kette vom Typ-I-Kollagen. Das C-Telopeptid erstreckt sich von den Resten 1036 bis 1053 der α1(I)-Kette vom Typ-I-Kollagen, wobei die Nummerierung gemäß Tromb et al., Biochem. J. 254: 919–922 (1988) ist. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung werden daher Peptide geliefert, welche von 6 bis 50 Aminosäuren enthalten und welche wenigstens ein Epitop enthalten, das immunologisch kompetitiv mit dem nativem C-Telopeptid ist. Für diese Peptide erzeugte Antikörper können verwendet werden, um direkt solche Peptide zu identifizieren, welche wenigstens ein Epitop enthalten, das immunologisch kompetitiv mit dem nativen C-Telopeptid ist unter Verwendung wohlbekannter Testverfahren. Kompetition bzw. Konkurrenz wird typischerweise auf Grund von spezifischen Bindungen durch den Antikörper an die Peptidepitope sein, aber in einigen Fällen kann auch sterische Hinderung bei Epitopkonformation zur Kompetition beitragen. Kompetionstyptests bestimmen typischerweise nicht den wirklichen Kompetitionsmechanismus.

[0024] Unter „C-Telopeptid von der α1(I)-Kette von Typ-I-Kollagen" (hiernach als C-Telopeptid bezeichnet) ist die angrenzende Kette gemeint, die wenigstens 6 Aminosäuresequenzreste von der C-Telopeptidregion der α-1(I)-Kette vom Typ-I-Kollagen enthält, manchmal wenigstens 8 oder 9 und manchmal 18, die von einer aus-

gewählten C-Telopeptidsequenz (Seq. ID Nr. 1), wie hierin ausgeführt, ausgewählt ist. Der Ausdruck „Peptid" wird in der vorliegenden Beschreibung verwendet, um eine Reihe von Aminosäuren zu bezeichnen, die miteinander durch Peptidbindungen zwischen den alpha-Amino- und Carboxylgruppen benachbarte Aminosäuren verknüpft sind.

[0025] Die Peptide können über chemische Synthese wie hiernach beschrieben oder durch rekombinante DNA-Technologie hergestellt werden. Das Peptid wird vorzugsweise im Wesentlichen frei von natürlich vorkommendem Typ-I-Kollagenproteinen und Fragmenten davon sein, die anders als das C-Telopeptid sind. Die Peptide können entweder in ihren neutralen (ungeladenen) Formen oder in ihren Formen vorliegen, welche Salze sind, und entweder frei von Modifikationen wie Glycosylierung, Seitenkettenoxidation oder Phosphorylierung oder diese Modifikationen enthaltend, unterliegend der Bedingung, dass die Modifikation nicht die Immunoreaktivität des wie hierin beschriebenen Peptids zerstört.

[0026] Wünschenswerterweise wird das Peptid so klein wie möglich sein, während es noch im Wesentlichen alles von der Immunoreaktivität eines größeren Peptids beibehält. Mit „Immunoreaktivität" ist die Fähigkeit eines Peptids der vorliegenden Erfindung gemeint, immunologisch mit C-Telopeptid der α1(I)-Kette vom Typ-I-Kollagen zu kompetitieren und/oder welche die Fähigkeit hat, wenn es als Immunogen verwendet wird, die Erzeugung von Antikörpern zu stimulieren, welche in der Lage sind, spezifisch am C-Telopeptid der α1(I)-Kette vom Typ-I-Kollagen zu binden.

[0027] Das immunoreaktive C-Telopeptid der vorliegenden Erfindung leitet sich von der C-terminalen Region, Aminosäure 1036 bis 1053 der α1(I)-Kette vom Typ-I-Kollagen ab. Eine repräsentative Peptid-Ausführung dieser Region ist das Peptid mit der folgenden Sequenz:

(SEQ ID Nr:1)

Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro

Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg

worin das Peptid optional an einem oder beiden N- und C-Enden wie gewünscht durch zusätzliche Aminosäuren von der α1(I)-Typ-I-carboxyterminalen Region zum Erleichtern des Verbindens zugegebenen Aminosäuren, Markierungen, anderen N- und C-terminalen Modifikationen, verknüpft mit Trägern, usw. flankiert und/oder modifiziert sein kann wie weiter hierin beschrieben. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform von SEQ ID Nr: 1 schließt der N-Terminus weiterhin Tyr-Cys-Reste zum passenden Markieren, Polymerisation über die Disulfidbrücken, Adsorption usw. ein, wie für eine spezielle Anwendung gewünscht. Daher hat ein aus SEQ ID Nr: 1 modifiziertes Peptid die Sequenz:

[SEQ ID Nr:2]

Cys-Tyr-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-

Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg

und wird detaillierter in den Beispielen unten beschrieben.

[0028] Wie oben erwähnt können zusätzliche Aminosäuren an die Enden eines Peptids zu gefügt werden, um erleichterte Peptidverknpüfung aneinander zum Kuppeln an ein Vehikel bzw. Carrier oder größeres Peptid zur Modifikation der physikalischen oder chemischen Eigenschaften des Peptids usw. zu ergeben. Eine oder mehrere Aminosäuren wie Tyrosin, Cystein, Lysin, Glutamin- oder Asparaginsäure oder dergleichen können am C- oder N-Terminus des Peptids eingeführt werden. Zusätzlich kann eine Peptidsequenz von der nativen menschlichen C-Telopeptidsequenz der α1(I)-Kette vom Typ I modifiziert werden mit aminoterminaler Acylierung, zum Beispiel Acetylierung oder Thioglycolsäureamidierung, carboxyterminale Amidierung, zum Beispiel Ammoniak, Methylamin usw. In einigen Fällen können diese Modifikationen Stellen zum Verknüpfen an einen Träger oder ein anderes Molekül ergeben.

[0029] Man wird verstehen, das die Peptide der vorliegenden Erfindung oder Analoga davon, welche Immunoreaktivität mit dem C-Telopeptid der α1(I)-Typ-I-Kollagenkette haben, wie notwendig modifiziert werden können, um andere gewünschte Attribute zu ergeben, zum Beispiel verbesserte Immunoreaktivität (wie vergrößerte Immunokompetition mit nativem Protein), verbesserte Adsorption an eine feste Phase, usw., während die Monoreaktivität des unmodifizierten Proteins erhöht oder zumindest nicht wesentlich vermindert wird, welches von der nativen Prokollagensequenz abgeleitet ist. Zum Beispiel können die Peptide verschiedenen Änderungen unterliegen wie Einschüben, Deletion und Substitution entweder konservativ oder nicht konservativ, wo

solche Änderungen bestimmte Vorteile bei deren Gebrauch bieten können. Unter konservativen Substitutionen ist Ersetzen eines Aminosäurerests mit einem anderen gemeint, welcher biologisch und/oder chemisch ähnlich ist, zum Beispiel ein hydrophober Rest durch einen anderen oder ein polarer Rest durch einen anderen. Die Substitutionen schließen Kombinationen ein wie Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; und Phe, Tyr. Gewöhnlich wird der Teil der Sequenz, welcher vorgesehen ist, um ein immunoreaktives Prokollagenepitop im Wesentlichen zu mimen, nicht über mehr als etwa 20% der nativen Prokollagensequenz abweichen, außer, wo zusätzliche Aminosäuren an irgendeinem Ende zum Zweck des Modifizierens der physikalischen oder chemischen Eigenschaften des Peptids angefügt werden können, zum Beispiel zum Erleichtern von Verknüpfung oder Kopplung und dergleichen.

[0030] Mit identifizierten unterschiedlichen Peptiden der Erfindung, welche immunoreaktiv mit dem C-Telopeptid sind, kann es in einigen Fällen wünschenswert sein, zwei oder mehrere Peptide in einer Zusammensetzung oder Beimischung zu vereinen. Die Peptide in der Zusammensetzung können identisch oder verschieden sein und sie sollten zusammen äquivalente oder größere Immunoreaktivität als die Peptide selbst (das Peptid selbst) ergeben. Zum Beispiel können unter Verwendung der hier beschriebenen Verfahren zwei oder mehr Peptide verschiedene oder überlappende immunoreaktive Epitope derselben oder unterschiedlicher C-Telopeptidsequenzen definieren, welche Peptide in einem Cocktail kombiniert sein können, um verstärkte Immunoreaktivität zu ergeben.

[0031] Die Peptide der Erfindung können über Verknüpfung kombiniert werden, um Polymere zu bilden. Wenn dasselbe Peptid mit sich selbst verknüpft wird unter Bildung eines Homopolymers, ist eine Vielzahl wiederholender epitoper Einheiten anwesend. Wenn sich die Peptide unterscheiden, zum Beispiel ein Cocktail, verschiedene, der Prokollagenregionen darstellt, werden Heteropolymere mit wiederholenden Einheiten geliefert. Zusätzlich zu kovalenten Verknüpfungen sind auch nicht kovalente Verknüpfungen, die in der Lage sind, intermolekulare und intrastrukturelle Bindungen zu ergeben, durch die vorliegende Erfindung vorgesehen.

[0032] Verknüpfungen für Homo- oder Heteropolymere oder zum Verknüpfen an Carrier können in einer Vielzahl von Wegen geliefert werden. Zum Beispiel können Cysteinreste an beiden Amino- und Carboxyenden angefügt werden, wo die Peptide kovalent über kontrollierte Oxidation der Cysteinreste gebunden sind. Ebenso anwendbar ist eine Anzahl heterobifunktioneller Reagenzien, welche eine Disulfidverknüpfung an einem funktionellen Gruppenende erzeugen und eine Peptidverknüpfung an dem anderen einbeziehen, einschließlich N-Succidimidyl-3-(2-Pyridyldithio)-Proprionat (SPDP). Dieses Reagens erzeugt eine Disulfidverknüpfung unter sich selbst und einem Cysteinrest eine Amidbindung über die Aminogruppe an einem Lysin oder andere freie Aminogruppe an dem anderen. Eine Vielfalt solcher disulfid-/amidbildenden Reagenzien ist bekannt. Siehe zum Beispiel Immuno Rev. 62: 185 (1982). Andere funktionale Kopplungsreagenzien bilden einen Thioether eher als eine Disulfidverknüpfung. Viele dieser thioetherbildenden Reagenzien sind kommerziell verfügbar und schließen reaktive Ester von 6-Maleimidocapronsäure, 2-Bromessigsäure, 2-Iodessigsäure, 4-(N-Maleimidomethyl)Cyclohexan-1-Carboxysäure und dergleichen ein. Die Carboxylgruppen können durch ihre Kombination mit Succinimid oder 1-Hydroxy-2-Nitro-4-Sulfonsäure-Natriumsalz aktiviert werden. Ein speziell bevorzugtes Kopplungsreagens ist Succinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl)-Cyclohexan-1-Carboxylat (SMCC). Natürlich wird man verstehen, dass Verknüpfen nicht die Immunoreaktivität irgendeiner der verknüpften Gruppen wesentlich beeinflussen soll.

[0033] Wie oben erwähnt, können Aminosäurearme am C- und/oder N-Terminus des Peptids oder Oligopeptids vorgesehen sein. Wenn vorhanden, werden die Arme gewöhnlich wenigstens eine Aminosäure sein und können 50 oder mehr Aminosäuren, häufiger 1 bis 10 Aminosäuren und bevorzugt weniger als 5 Aminosäuren zum Erleichtern der Synthese sein. Die Arme können einer Vielzahl von Zwecken dienen wie Beabstandungsmittel, Anheften von Peptiden an ein Vehikel bzw. Carrier, Immobilisieren von Proteinen an eine feste Phase, usw.. Um nützliche Funktionalitäten zum Verknüpfen an ein Vehikel bzw. Carrier, feste Phase oder um höhergeordnete Strukturen wie Dimere, Trimere oder andere Multimere zu bilden, können Aminosäuren wie Tyrosin, Cystein, Asparaginsäure oder dergleichen am C- oder N-Terminus des Arms oder Peptids vorgesehen sein. Um Epitopaussetzung und/oder Radiomarkieren zu verstärken, ist die Anwesenheit von 1 bis 10 Aminosäuren am C- oder N-Terminus von besonderem Interesse, bevorzugter 1 bis 5 Aminosäuren und am bevorzugtesten etwa 1 bis 3. Besonders bevorzugte Ausführungen bestimmter hier beschriebener Peptide werden erhalten, wenn zwei Aminosäuren als ein Arm, im Allgemeinen als ein N-Terminus angefügt werden mit vorzugsweise Cystein als N-terminalem Rest des Arms. In beispielhaften Ausführungen sind die Beabstandungsreste zwischen dem Peptid und der funktionellen Endgruppe Gly. Ein terminaler Cys-Rest kann auch durch eine Disulfidverknüpfung an einen dithio- oder thiofunktionalisierten Träger oder eine Thioetherverknüpfung an einen aktivierten Olefinträger verknüpft werden.

[0034] Die Peptide der Erfindung können in einer großen Vielfalt von Wegen hergestellt werden. Auf Grund ihrer relativ kurzen Größe können die Peptide in Lösung oder an einem festen Träger in Übereinstimmung mit konventionellen Techniken hergestellt werden. Verschiedene automatische Synthesizer sind kommerziell verfügbar und können in Übereinstimmung mit bekannten Protokollen verwendet werden. Siehe zum Beispiel Stewart und Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2d. ed., Pierce Chemical Co. (1984); Tam et al., J. Am. Chem. Soc. 105: 6442 (1983); Merrifield, Science 232: 341–347 (1986); und Barany und Merrifield, The Peptides, Gross und Meienhofer, eds., Academic Press, New York, pp. 1–284 (1979). Kurze Peptidsequenzen oder Bibliotheken überlappender Peptide, gewöhnlich von 6 bis zu etwa 30–50 Aminosäuren, welche den ausgewählten, hierin beschriebenen Regionen entsprechen, können direkt synthetisiert und gescreent bzw. abgesucht werden in Screeningtests, die vorgesehen sind, um immunoreaktive Peptide zu identifizieren mit immunodominanten Epitopen des C-Telopeptids der α1(I)-Kette vom Typ-I-Kollagen.

[0035] Alternativ kann die rekombinante DNA-Technologie eingesetzt werden, worin eine Nukleotidsequenz, welche ein α1(I)-Typ-I-carboxyterminales Peptid der Erfindung kodiert, in einen Expressionsvektor eingefügt, transformiert oder transfiziert in eine geeignete Wirtszelle und unter Bedingungen kultiviert wird, die zur Expression geeignet sind. Diese Vorgänge sind allgemein im Stand der Technik bekannt, wie allgemein beschrieben, z. B. in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); Ausubel et al., (ed.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., New York (1987), und U.S. Pat. Nr. 4,237, 224, 4,273,875, 4,431,739, 4,363,877 und 4,428,941. Fusionsproteine, welche eine oder mehrere Peptidsequenzen der Erfindung umfassen, können daher verwendet werden, um die Determinanten von C-Telopeptid der α1(I)-Kette vom Typ-I-Kollagen zu zeigen.

[0036] Da die Kodierungssequenz für Peptide einer hier vorgeschlagenen Länge können durch chemische Techniken synthetisiert werden kann, zum Beispiel das Phosphotriesterverfahren von Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103: 3185 (1981), kann die Modifikation einfach durch Substituieren der geeigneten Base(n) durch jene gemacht werden, die die native Peptidsequenz kodieren. Die kodierende Sequenz kann dann durch geeignete Verknüpfer geliefert werden und in Expressionsvektoren ligiert werden, die im Stand der Technik verfügbar sind und den Vektoren, die verwendet werden, um geeignete Wirte zu transformieren, um das gewünschte Fusionsprotein zu erzeugen. Eine Anzahl solcher Vektoren und geeigneter Wirtssysteme ist heute verfügbar. Zur Expression der Fusionsproteine wird die Kodierungssequenz mit handhabbar verknüpften Start- und Stopcodons, Promoter- und Terminierungsregionen und gewöhnlich einem Replizierungssystem versehen, um einen Expressionsvektor zur Expression in der gewünschten Wirtszelle zu ergeben. Zum Beispiel werden Promotorsequenzen, die mit Bakterienwirten kompatibel sind, in Plasmiden vorgesehen, die passende Schnittstellen zum Einfügen der gewünschten kodierenden Sequenz haben. Die resultierenden Expressionsvektoren werden in geeignete Bakterienwirte transformiert. Natürlich können Hefe- oder Säuegetierzellwirte auch benutzt werden unter Einsatz geeigneter Vektoren und Kontrollsequenzen.

[0037] Die Peptide und Antikörper der vorliegenden Erfindung und Zusammensetzungen davon finden insbesondere Anwendung als diagnostische Reagenzien. Zum Beispiel kann ein Peptid, wie hierin beschrieben, und/oder Antikörper für das Peptid verwendet werden, um die Knochenresorptionsgeschwindigkeit in einem Individuum zu bestimmen. Diagnostische Tests zur Knochenresorption, oft in Verbindung mit Knochenbildungstests, können verwendet werden, um die Nettoknochenbilanz in einem Individuum zu bestimmen. Eine Erhöhung bei Knochenresorption ohne eine adäquate ausgleichende Erhöhung einer Knochenbildung kann zu Osteoporose oder anderen Knochenstörungen führen. Die Menge freien C-Telopeptids in einem speziellen Individuum kann über einen Zeitraum überwacht werden und Fortschreiten oder Zurückgehen der Knochenresorption bestimmt werden. Proben von einem Individuum können auch mit relativen Pegeln bestimmt aus einer Gruppe von ähnlichen Patienten bestimmt werden und die Variation davon als Marker von Krankheiten mit Fortschreiten oder Rückgang verwendet werden. Daher können die diagnostischen Tests, die hier geliefert werden auch verwendet werden um das Ansprechen eines Individuums auf eine spezielle Behandlungsmaßnahme für eine knochenresorptionsbezogene Störung zu bewerten, um das Behandlungsprotokoll zu modifizieren oder eine Prognose für ein beeinträchtigtes Individuum zu etablieren. Zusätzlich kann man Diagnosetests verwenden, um vorherzusagen, welche Individuen bei wesentlichem Risiko zum Entwickeln von Knochenresorptionsstörungen wie zum Beispiel Osteoporose sein werden.

[0038] Gereinigte polyklonale oder monoklonale Antikörper, welche an die Peptide der Erfindung binden, finden auch Verwendung bei der Immunocytochemie wie Immunoaffinitätsreinigung von der α1(I)-Kette vom Typ-I-Kollagen, wo Immunoreinigungstechniken im allgemeinen im Stand der Technik bekannt sind und angepasst werden können unter Verwendung von Antipeptid-Antikörpern, die beschrieben sind, um die α1(I)-Kette vom Typ-I-Kollagen in im Wesentlichen reiner Form wie gewünscht zu isolieren. Patientenproben können auf die Anwesenheit von C-Telopeptid unter Verwendung der gegen die Peptide hergestellten Antikörper in Wes-

tern Blot-Techiken auch analysiert werden, welche in dem US-Patent Nr. 4,452,901 beschrieben sind. Antikörper und Peptide der Erfindung können in einer großen Vielzahl von anderen Tests Verwendung finden, zum Beispiel Screening bzw. Absuchen genetischer Bibliotheken und dergleichen.

[0039] Wie vom Fachmann erkannt werden wird, sind zahlreiche Typen von Immunoassays zum Gebrauch in der vorliegenden Erfindung verfügbar. Zum Beispiel direkte oder indirekte Bindungstests, Kompetitivtests, Sandwichtests und dergleichen, wie sie allgemein beschrieben sind, zum Beispiel in U.S. Patent-Nr. 4,642,285; 4,376,110; 4,016,043; 3,879,262; 3,852,157; 3,850,752; 3,839,153; 3,791,932 und Harlow und Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, N. Y. (1988).

[0040] Die zu testenden Proben können abgeleitet sein aus extrazellulärem Fluid, Zellkomponenten oder Zellprodukten, einschließlich, aber nicht begrenzt auf Zellen und Zellkultur-Überstände, Zellextrakte, Gewebeextrakte, Wundfluide, Urin, Blut, Plasma, Serum, Fraktionen davon, aber Urin ist insbesondere bevorzugt. Da von dem C-Telopeptid vermutet wird, dass es extrazellulär von den α1(I)-Ketten vom Typ-I-Kollagen gespalten wird, wird typischerweise die biologische Probe ein extrazelluläres Fluid oder davon abgeleitet sein.

[0041] Die Peptid- und Antikörperzusammensetzungen können unmarkiert oder markiert abhängig von deren Anwendungen verwendet werden. Unter „Markierung" ist ein Molekül gemeint, welches direkt oder indirekt ein detektierbares Signal ergibt. Verschiedene Markierungen können eingesetzt werden wie die Radionukleide (zum Beispiel ^{125}I, ^{131}I, ^{3}H, ^{14}C), Enzyme, Fluoreszenzstoffe, Chemilumeszenzstoffe, Enzymsubstrate, Cofaktoren oder Inhibitoren, Partikel (zum Beispiel Magnetpartikel), Kombinationen von Liganden und Rezeptoren (zum Beispiel Avidin und Biotin), Farbstoffe oder dergleichen. Zusätzlich können die Peptide und Antikörper daran in einer Vielzahl von Wegen zum Binden einer spezifischen Oberfläche modifiziert werden wie eine Mikrotiterplatte, Glas- oder Latexkügelchen, Röhren, Filter, chromatographische Oberfläche, Nitrozellulosepapier, Zellulose, Silicagel oder dergleichen die spezifische Weise, in welcher Peptide und Antikörper an eine andere Verbindung oder Festphasenoberfläche zugefügt werden können, finden eine reiche Veranschaulichung in der Literatur. Siehe zum Beispiel US Patente Nr. 4,371,515; 4,487,715 und darin genannte Patente. Wie oben erwähnt werden Reagenzien wie p-Maleimidobenzoesäure, p-Methyldithiobenzoesäure, Maleinsäureanhydrid, Succinsäureanhydrid, Glutaraldehyd, heterobifunktionelle Kreuzvernetzer und dergleichen gewöhnlich für solche Zwecke verwendet.

[0042] In einem Testformat wird die Menge an C-Telopeptid einer biologischen Probe in einem Kompetitionstyptest durch Messen des Ausmaßes bestimmt, in dem C-Telopeptid in der Probe mit einem Peptid der vorliegenden Erfindung zum Binden an Antikörper, die für dieses Peptid spezifisch sind, kompetitiert bzw. verdrängt. Obwohl einige kompetitive Testformate bekannt sind, lässt man in einem Fluidphasenkompetitionstest wie einem Radioimmuntest Antikörper und Peptide (markiert oder in der Lage, markiert zu werden) intakt in einem gepufferten System unter Bedingungen wechselwirken, die zur Immunkomplexbildung führen. Eine Probe, von der man vermutet, dass sie C-Telopeptid enthält, wird dann zugegeben und man lässt im Allgemeinen das System das Gleichgewicht erreichen. Man kann einen optionalen Waschschritt verwenden, um gebundene Reagenzien von ungebundenen zu trennen, um Sensitivität oder Spezifität zu verstärken. Die aus der Inkubation resultierenden Immunkomplexe werden anschließend detektiert, wobei die bestimmte Menge an Markierung proportional zur Menge markierter Peptide der Erfindung ist, die an diesen Antikörper gebunden sind.

[0043] Alternativ kann die Probe zuerst mit dem Antikörper inkubiert werden und anschließend oder gleichzeitig mit einem markierten Peptid der Erfindung inkubiert werden.

[0044] In einem Festphasenkompetitionstyp-Immuntest wird der primäre Antikörper, welcher immunologisch reaktiv mit einem in der Sequenz der SEC ID Nr: 1, enthaltenen Isotop ist, wo das Isotop immunologisch kompetitiv mit einem Epitop des C-Telopeptids ist, kovalent oder nicht kovalent an ein Vehikel bzw. Carrier gebunden, typischerweise eine unlösliche Festphase wie ein Mikrotiterloch. Die zu testende biologische Probe wird mit dem Antikörper unter Bedingungen inkubiert, die zur Immunkomplexbildung führen und entweder gleichzeitig oder aufeinanderfolgend mit wenigstens einem der markierten Peptide der Erfindung auch unter Bedingungen kontaktiert, die zur Immunkomplexbildung führen. Spezifisch gebundene Markierung wird dann detektiert und die Gegenwart oder Menge von C-Telopeptid in der Probe bestimmt. Typischerweise ist die Menge von markiertem Peptid, das an die Antikörper gebunden ist, proportional (invers) zur Menge von C-Telopeptid in der Probe. Trennschritte (zum Beispiel physikochemisch oder immunologisch) und Waschschritte können notwendig sein, um spezifisches Binden gegenüber dem Hintergrund zu unterscheiden.

[0045] In einem ELISA-Immuntesttyp wird erneut eine Vielfalt von Formaten vorgesehen. In einem Verfahren wird das Peptid der Erfindung an eine Festphase, zum Beispiel Mikrotiterloch durch Adsorption, Vernetzung

usw. gebunden. Eine Testprobe wie Urin oder Plasma wird mit den Antipeptid-Antikörpern der Erfindung inkubiert und das Gemisch in ein peptidbeschichtetes Loch angeordnet und inkubiert. Antikörper, welcher nicht durch C-Telopeptid gebunden ist, in der Probe, wird an das Peptid in der festen Phase gebunden. Nach einem Trennungsschritt kann die Gegenwart und Menge gebundener Antikörper bestimmt werden zum Beispiel unter Verwendung eines markierten sekundären Antikörpers wie Antikaninchen-IgG/IgM, wenn die primären Antikörper als Kaninchen-Antiserum erzeugt werden oder ein markiertes, für Immunkomplexe spezifisches Protein, wie S. aureus Protein A oder Protein G und ein passendes Farbsubstrat, wenn notwendig.

[0046] Kits können auch zum Gebrauch mit rekombinanten oder synthetischen C-Telopeptiden oder Antikörpern der vorliegenden Erfindung beim Bestimmen von Pegeln von Knochenresorption in einem Individuum geliefert werden. Daher können die Subjektpeptidzusammensetzungen für gewöhnlich in lyophilisierter Form in einem Behälter entweder allein oder in Verbindung mit Zuatzreagenzien geliefert werden wie als C-Telopeptidspezifische Antikörper, Markierter und/oder Antikörper und dergleichen. Die Peptide und Antikörper, welche an eine Markierung konjugiert oder unkonjugiert sein können, sind in den Kits mit Puffern wie Tris, Phsophat, Carbonat, usw., Stabilisatoren, Bioziden, Inertproteinen, zum Beispiel Serumalbumin oder dergleichen enthalten. Häufig wird es wünschenswert sein, einen inertes Streckmittel oder Hilfsstoff einzuschließen, um die aktiven Inhaltsstoffe zu verdünnen, wo der Hilfsstoff in Form von etwa 1 bis 99% der Gesamtmenge vorliegen kann. Andere Antikörper, die in der Lage sind, C-Telopeptid und Peptide der Erfindung zu binden, werden in einem Test eingesetzt, sie werden typischerweise in einem getrennten Gefäß vorliegen.

[0047] Monoklonale Antikörper für diagnostische Verwendungen, welche an das C-Telopeptid und Peptide der vorliegenden Erfindung binden, können durch eine Vielzahl von Mitteln erzeugt werden. Die Erzeugung von monoklonalen Maus-Antikörpern ist wohlbekannt und kann zum Beispiel vervollständigt werden unter Immunisierung des Tiers mit einem rekombinanten oder synthetischen Peptidmolekül oder einem ausgewählten Teil davon (zum Beispiel einem epitopen Bereich, welcher mit einem Epitop des C-Telopeptids kompetiert bzw. verdrängt). Antikörper erzeugende Zellen, die aus dem immunisierten Tier erhalten worden sind, werden immortalisiert und gescreent bzw. abgesucht oder zuerst abgesucht bzw. gescreent für zum Beispiel die Produktion von Antikörpern, welche in einem Kompetitionstest unter Verwendung von Peptiden und C-Telopeptid in einer Probe wirkt, und dann immortalisiert. Antisera (polyklonale Antikörper) oder monospezifische Antikörper sind typischerweise von nicht humanem Ursprung wie Kaninchen, Ziege, Maus usw. und können durch Immunisieren mit geeigneten Peptiden hergestellt werden, welche oft an einen Carrier bzw. Vehikel, zum Beispiel KLH bzw. Schlüssellochnapfsehneckenhämocyanin (Keyhole Limpet Hämocyanin) oder Rinderserumalbumin zur verstärkten Immunogenität konjugiert werden. Die Herstellung von Antikörpern auf diese Weise ist im Stand der Technik wohlbekannt wie beschrieben in Harlow and Lane, Supra.

[0048] Die folgenden Beispiele sind veranschaulichend und keinesfalls begrenzend angeboten.

Beispiel 1

Messung von C-Telopeptid in Kindern und Erwachsenen

[0049] Dieses Beispiel veranschaulicht Herstellung und Verwendung von Antikörpern zur Detektion von C-Telopeptid in einem Humanserum. Die Tests zeigten, dass die C-Telopeptidpegel in Kindern höher sind als in Erwachsenen.

[0050] Antikörper gegen die C-Telopeptidquelle wurden erzeugt. Weiße Neuseeland-Kaninchen und Hartley-Meerschweinchen wurden durch monatliche intradermale Injektion von 50 µg gereinigtem C-Telopeptid, emulgiert in Titermax Adjuvans CytRX Corporation, Norcross, GA 30092, emulgiert. Serumproben wurden in regelmäßigen Zeiträumen zum Test auf Antikörpertiter entnommen. Obwohl alle Tiere Antikörper gegen das Peptid entwickeln, variierten die Titer der individuellen Tiere. Ein Kaninchen und ein Meerschweinchen, welche die höchsten Antikörpertiter entwickelten, wurden für aufeinander folgende Charakterisierungen verwendet.

[0051] Die polyklonalen wie oben verwendeten Antikörper wurden in Radioimmuntests (RIA) verwendet, um C-Telopeptidpegel I in normalen Erwachsenen und Kindern zu bestimmen. Das Verdünnungsmittel für alle RIA-Verfahren war 0,05 mol/l Natriumborat, pH 8,4, versetzt mit 0,1% BSA und 0,05% Natriumazid. Die Endantiserumverdünnung, die bei den Tests verwendet wurde, war 1 : 5000, eine Verdünnung, die ausreichend ist, um 25% zugegebenen Tracer bzw. Nachweiser zu bilden. Nach Über-Nacht-Inkubation bei 4°C wurde die Trennung durch Zugabe von 100 µl einer 1 : 20-Verdünnung von Nicht-Immunserum, 400 µl einer 1 : 20-Verdünnung von Ziegen-Anti-IgG und 200 µl Polyethylenglycol 8000, 8% Gewicht/Volumen in destilliertem Wasser vollbracht. Die Proben wurden sorgfältig gemischt und für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Nie-

derschläge wurden durch Zentrifugation pelettiert und der Überstand dekantiert. Die Werte wurden unter Verwendung des Log-logit-Verfahrens von Rodbart et al., „Data Processing for Radioimmunoassays: An Overview" in Clinical Chemistry and Immunochemistry Chemical Bases and Applications in Disease, Natelson, Pesce, and Dietz, eds., American Association of Clinical Chemists Washington, DC, 1978, S. 477–497 bestimmt.

[0052] Menschlicher Urin und Serum von 11 normalen Erwachsenen und 15 normalen Kindern wurden bei zufälligen Zeiten über den Tag hinweg gesammelt. Die Alter der Erwachsenen reichten von 23 bis 46 Jahre, während jene der Kinder von 9 bis 15 Jahren reichten. Die Sera wurden in Portionen geteilt und gefroren bei –70°C gelagert, bis sie getestet wurden. Jede Portion wurde einmal getestet und dann verworfen. Urin wurde von normalen Erwachsenen und Kindern gesammelt und gefroren bei –20°C gelagert, bis er verwendet wurde. Serumproben wurden mit Kaninchen-Antiserum getestet und Urinproben wurden mit Meerschweinchen-Antiserum getestet.

[0053] Die Mittelwerte von C-Telopeptid, die im Serum von normalen Erwachsenen und Kindern gefunden wurden, sind in **Fig. 1** gezeigt. Die in Erwachsenen gefundene Menge war 1,03 ± 0,41 ng/ml, während jene in Kindern gefundene 8,00 ± 3,37 war. Das Urin-C-Telopeptid-zu-Kreatinin-Verhältnis war auch 67% höher in Kindern als in Erwachsenen. Die signifikanten Vergrößerungen in Serum- und Urinpegeln des Peptids in Kindern reflektieren die größere Geschwindigkeit von Knochenumbildung in wachsenden Kindern. Weiterhin wird die Unterscheidungskraft des Tests, um zwischen diesen metabolischen Bedingungen zu unterscheiden, durch Z-Treffer-Analyse angezeigt (Serum-Z-Treffer = 14,6; Urin-Z-Treffer = 5,1). Die Z-Treffer-Quote wurde berechnet wie beschrieben in „Basic Medical Statistics", Anita K. Bahn, Grune & Stratton, N. E. 1972.

Beispiel 2

Messung von C-Telopeptid bei Osteoporose

[0054] Urin-C-Telopeptid-Pegel wurden von Patienten mit klinischer Osteoporose und normalen Patienten bestimmt. Die C-Telopeptidpegel wurden wie in Beispiel 1 unter Verwendung von Meerschweinchen-Antiserum bestimmt. Das Urin-C-Telopeptid-zu-Kreatinin-Verhältnis wurde bestimmt und man fand, dass es signifikant höher in Osteoporose-Patienten als in normalen Patienten war (3,4 gegenüber 2,35; Z-Treffer-Quote –3,65). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 unten angegeben.

Tabelle 1
Osteoporose gegenüber Kontrolle

Subjekt	C-Telo	CRT	C-Telo/CRT
Normal	ng/mL	mg/mL	ng/m
VMP	4,31	2,17	1,99
NIC	3,05	1,36	2,24
DI	4,51	1,74	2,59
AKT	3,89	1,51	2,58
osteoporotisch			
MC	1,80	0,53	3,40
VM	3,36	1,26	2,67
DM	2,67	0,64	4,17
IT	3,38	1,08	3,13
MM	2,93	0,65	4,51
GF	2,93	1,03	2,84
Mittel normal		2,35	
STD		0,25	
Mittel OP		3,45	
STD		0,67	
Z-Treffer			
Normal gegenüber OP		-3,65	

[0055] Obwohl die obige Erfindung in einigen Details durch Veranschaulichungen und Beispiele zum Zwecke der Klarheit des Verständnisses beschrieben worden ist, wird es klar sein, dass bestimmte Änderungen und Modifikationen in der Reichweite der anliegenden Ansprüche ausgeführt werden können.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) Anmelder: Baylink, David J.

(ii) Titel der Erfindung: KNOCHENRESORPTIONSTEST

(iii) ANZAHL VON SEQUENZEN: 3

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Townsend and Townsend

(B) STRASSE: One Market Plaza, Steuart Street Tower

(C) STADT: San Francisco

(D) BUNDESSTAAT: CA

(E) LAND: USA

(F) ZIP: 94105-1492

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIUMTYP: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatibel

(C) BETRIEBDSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) AKTUELL ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDENUMMER: US

(B) ANMELDEDATUM:

(C) KLASSIFIKATION:

(viii) ANWALTS-/VERTRETERINFORMATION:

(A) NAME: Parmelee, Steven W.

(B) REGISTERNUMMER: 31,990

(C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: 14508-5

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION;

(A) TELEFON: (206) 467-9600

(B) TELEFAX: (415) 543-5043

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr:1:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) TYPE: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr:1:

Asp Phe Ser Phe Leu Pro Gln Pro Pro Gln Glu Lys Ala His Asp Gly
1 5 10 15

Gly Arg

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr:2:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:2:

Cys Tyr Asp Phe Ser Phe Leu Pro Gln Pro Pro Gln Glu Lys Ala His
1 5 10 15

Asp Gly Gly Arg
20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr:3:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr:3:

Xaa Asp Phe Ser Phe Leu Pro Gln Pro Pro Gln Glu Lys Ala His Asp
1 5 10 15

Gly Gly Arg Xaa
20

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit eines C-Telopeptids von Typ I-Kollagen in einem Individuum, umfassend
(a) das Inkubieren unter Bedingungen, die zur Bildung von Immunkomplexen führen,
(i) von einer Probe dieses Individuums, von welcher man vermutet, dass sie C-Telopeptid von Typ I-Kollagen enthält und

(ii) einem C-Telopeptid-Antikörper, welcher immunologisch reaktiv mit einem Epitop ist, das in der Sequenz Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ-ID Nr. 1) enthalten ist, welches epitop immunologisch mit einem Epitop von C-Telopeptid von Typ I-Kollagen kompetitiv ist, und
(iii) einem Peptid, welches immunologisch an den Antikörper bindet, und welches markiert wird, um ein detektierbares Signal des Peptids zu ergeben, das sechs bis fünfzig Aminosäuren hat und ein Epitop hat, welches in der Sequenz Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ-ID Nr. 1) enthalten ist, worin dem Peptid Pyridinolin-Kreuzverbindungen fehlen und worin dieses Peptid immunologisch mit C-Telopeptid von Typ I-Kollagen konkurriert; und
(b) das Detektieren dieser Markierung und daraus die Bestimmung der Anwesenheit des C-Telopeptids von Typ I-Kollagen in dem Individuum.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Peptid die Sequenz

Xaa-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-

Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg-Xaa (SEQ-ID Nr. 3),

hat, worin jedes Xaa optional vorliegt und wenn es vorliegt Cys oder Tyr ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Probe, Antikörper und Peptid gleichzeitig inkubiert werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Inkubation des Peptids mit der Probe und dem Antikörper einer ersten Inkubation der Probe mit dem Antikörper folgt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Antikörper an einem Träger immobilisiert wird.

6. Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit eines C-Telopeptids von Typ I-Kollagen in einem Individuum, umfassend:
(a) das Inkubieren unter Bedingungen, die zur Bildung von Immunkomplexen führen
(i) von einer Probe dieses Individuums, von welcher man vermutet, dass sie C-Telopeptid vom Typ I-Kollegen Kollagen enthält und
(ii) einen C-Telopeptid-Antikörper, welcher immunologisch reaktiv mit einem Epitop ist, das in der Sequenz Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ-ID Nr. 1) enthalten ist, welches epitop immunologisch mit einem Epitop von C-Telopeptid vom Typ I-Kollagen kompetitiv ist, und
(b) entweder gleichzeitig mit oder nach der Inkubation der Probe mit dem Antikörper, das Inkubieren eines an eine feste Phase gebundenen Peptids, wobei das Peptid den Antikörper immunulogisch bindet, wobei das Peptid sechs bis fünfzig Aminosäuren hat und ein Epitop hat, welches in der Sequenz Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ-ID Nr. 1) enthalten ist, worin dem Peptid Pyridinolin-Kreuzverbindungen fehlen und worin dieses Peptid immunologisch mit C-Telopeptid von Typ I-Kollagen kompetiert;
(c) die Trennung von Immunkomplexen, welche an die Festphase gebunden sind, von ungebundenen Substanzen;
(d) Inkubieren der getrennten Immunkomplexe, die an die Festphase mit einem zweiten Antikörper gebunden sind, welcher an den C-Telopeptid-Antikörper bindet und markiert wird, um ein detektierbares Signal zu ergeben;
(e) Detektieren des Signals entweder gebunden an die Festphase oder in Lösung verbleibend; und
(f) daraus Bestimmung der Anwesenheit des C-Telopeptids von Typ I-Kollagen in dem Individuum.

7. Verfahren nach Anspruch 6, worin das Peptid die Sequenzen

Xaa-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-

Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg-Xaa (SEQ-ID Nr. 3),

hat, worin jedes Xaa optional vorliegt und wenn es vorliegt Cys oder Tyr ist.

8. Testkit zur Bestimmung der Anwesenheit eines C-Telopeptids vom Typ I-Kollagen in einem Individuum, worin der Kit umfasst: einen C-Telopeptid-Antikörper, der immunologisch mit einem Epitop reaktiv ist, das in der Sequenz Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ-ID Nr. 1) enthalten ist, welches epitop immunologisch kompetitiv mit einem Epitop von C-Telopeptid von Typ I-Kollagen ist, und
ein Peptid, welches immunologisch an den Antikörper bindet, wobei das Peptid, das sechs bis fünfzig Amino-

säuren hat und ein Epitop hat, welches in der Sequenz Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg (SEQ-ID Nr. 1) enthalten ist, worin dem Peptid Pyridinolin-Kreuzverbindungen fehlen und worin dieses Peptid immunologisch mit C-Telopeptid vom Typ I-Kollagen konkurriert.

9. Testkit nach Anspruch 8, worin das Peptid die Sequenz

Xaa-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Pro-

Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg-Xaa (SEQ-ID Nr. 3),

hat, worin jedes Xaa optional vorliegt und wenn es vorliegt Cys oder Tyr ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

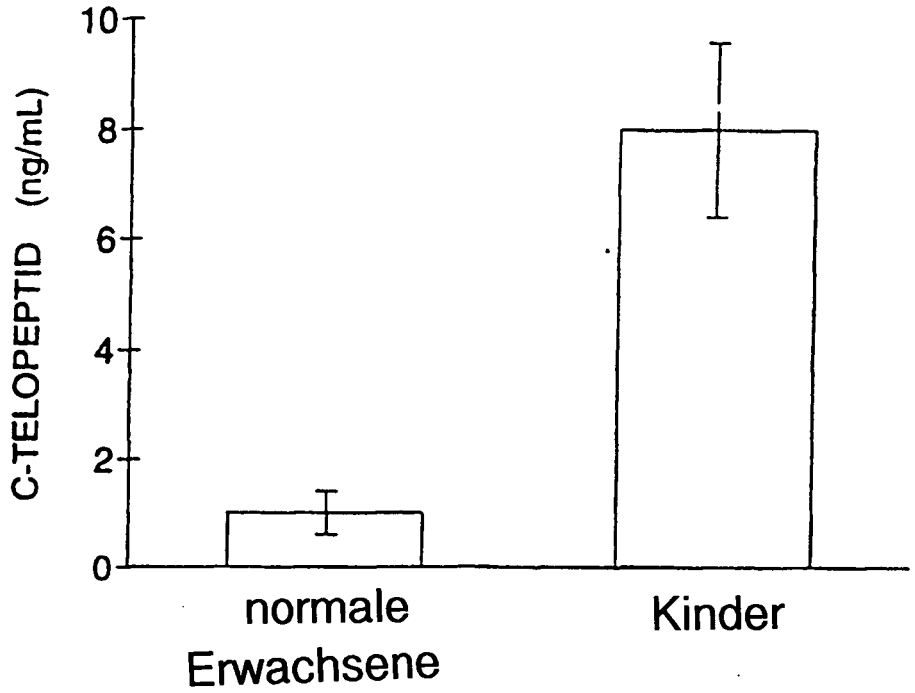

FIG. 1

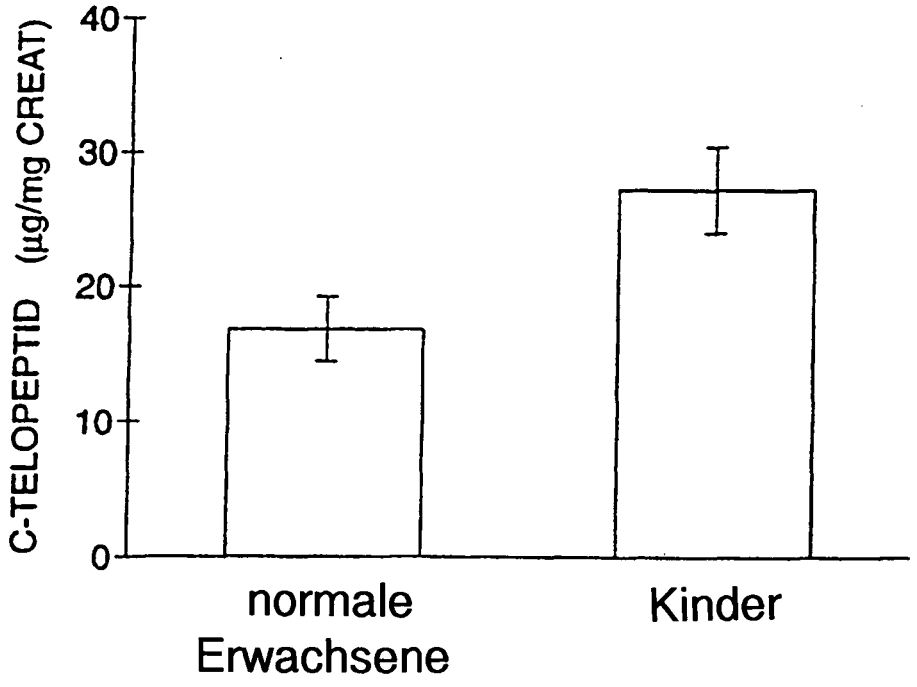

FIG. 2