



Republik  
Österreich  
Patentamt

(11) Nummer: **AT 403 098 B**

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 896/95  
(22) Anmeldetag: 29. 5.1995  
(42) Beginn der Patentdauer: 15. 3.1997  
(45) Ausgabetag: 25.11.1997

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> : **G01N 33/68**  
G01N 33/53

(56) Entgegenhaltungen:  
WO 94/29341A1

(73) Patentinhaber:  
MYCOMED AUSTRIA GMBH  
A-4021 LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).

(72) Erfinder:  
BERG JÜRIG DR.  
LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).  
BODENTEICH ANGELIKA DR.  
LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).  
WIDERNA MARGOT MAG.  
LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).  
CUTHBERTSON ALAN DR.  
OSLO (NO).

(54) **ANTIKÖRPER ZUM NACHWEIS UND ZUR UNTERSCHIEDUNG VON VERKÜRZTEN UND NICHT VERKÜRZTEN FORMEN VON CHEMOKINEN**

(57) Gegenstand dieser Erfindung sind zum einen Antikörper, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie selektiv am aminoterminalen Ende an ein nicht verkürztes Chemokin binden, zum anderen Antikörper, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie selektiv am aminoterminalen Ende eines am aminoterminalen Ende verkürzten Chemokins binden.

**AT 403 098 B**

Chemokine sind Polypeptide mit einem Molekulargewicht von etwa 7000 Dalton. Diese Proteine sind an der Entwicklung entzündlicher Reaktionen beteiligt, insbesondere an der Anlockung von Zellen, die an entzündlichen Prozessen beteiligt sind, in Geweberegionen, in denen entzündliche Prozesse initiiert oder unterhalten werden. Des weiteren wurde gezeigt, daß Chemokine die an der Entzündung beteiligten Zellen

aktivieren und deren Wachstum fördern. Dies gilt auch für Zellen der Hämatopoese.

Die Familie dieser Proteine wird in zwei Unterfamilien eingeteilt. Die erste Unterfamilie enthält solche Chemokine, die zwischen den ersten beiden Cysteinen eine einzige beliebige Aminosäure (AS) eingefügt haben (C-X-C). Dieser C-X-C-Unterfamilie gehören u. a. "Melanoma Growth Stimulatory Activity (MGSA) oder GRO-Protein- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , Interleukin-8 und IP-10 an. Die murinen Homologe sind u. a. KC-Genprodukt und das "Macrophage Inflammatory Protein-2" (MIP-2).

Die zweite Unterfamilie enthält solche Chemokine, bei denen die ersten beiden Cysteine direkt nacheinander in der AS-Sequenz zu liegen kommen (C-C). Dieser C-C-Unterfamilie gehören u. a. RANTES, "Monocyte Chemotactic Protein-1" (MCP-1) und "Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ " (MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ ) an. Die murinen Homologe sind u. a. JE-Genprodukt und murines "Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ " (MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ ).

Die meisten Vertreter dieser beiden Chemokin-Unterfamilien setzen sich als sekretierte Proteine zunächst aus circa 60-80 AS zusammen. Verkürzungen durch proteolytische Enzyme z.B. am aminoterminalen Ende z.B. um vier AS führen zu Chemokinformen, die eine vielfaches höhere Chemokin-artige Aktivität besitzen.

Um zwischen verkürzten und nicht verkürzten Chemokinen einfach und damit rasch unterscheiden zu können, wurden Antikörper als "Werkzeuge" geschaffen, die spezifisch die verkürzten und spezifisch die nicht-verkürzten Formen dieser Chemokine erkennen.

Gegenstand der Erfindung sind daher zum einen Antikörper, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie selektiv am aminoterminalen Ende an ein nicht verkürztes Peptid binden, zum anderen Antikörper, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie selektiv am aminoterminalen Ende eines am aminoterminalen Ende verkürzten Peptids oder Proteins oder irgendeines Chemokins binden.

Dieses Peptid kann unter anderem eines der folgenden sein:

MGSA, Gro- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , IL-8, IP-10, KC-Genprodukt, Macrophage Inflammatory Protein-2, RANTES, Monocyte Chemotactic Protein-1, Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  und -1 $\beta$ , JE-Genprodukt und murines Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  und -1 $\beta$  oder irgend ein anderes Protein der C-X-C oder C-C Chemokinfamilie.

Für die Herstellung der Antikörper wird von der bekannten Aminosäuresequenz des Chemokins (trunkiert oder reif) ein Peptid über die Aminosäuren (2-8)-20 bzw. 1-20 durch Festphasensynthese hergestellt. Dabei werden die in der ursprünglichen Aminosäuresequenz vorkommenden Cysteine durch Alanine ersetzt. Das Peptid wird an ein Lysin-Gerüst, das aus 6-Lysin-Molekülen besteht, gekoppelt und so octamerisiert, um ein Multiples Antigenes Peptid (MAP) zu erhalten. Dieses MAP wird in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gelöst und mit vollständigem Freund's Adjuvant zu einer Emulsion vermischt. Kaninchen (Chinchilla Bastards) oder Meerschweinchen werden vorerst mit 1 mg bzw. 0.2 mg (Meerschweinchen) MAP-Emulsion subkutan immunisiert. Alle folgenden Immunisierungen erfolgen mit unvollständigem Freund's Adjuvant anstelle von vollständigem Freund's Adjuvant wobei 0.5 mg bzw. 0.1 mg (Meerschweinchen) Antigen appliziert werden. Auf diese Weise werden die Tiere in 4 bis 6 wöchigem Abstand dreimal bis viermal geimpft.

Anschließend wird der Titer der Serumbindung an das MAP und ebenso an ein synthetisches Chemokin, das um die entsprechende Anzahl der Aminosäuren verkürzt wurde (biologisch aktivere Form) mittels ELISA bestimmt und das Resultat mittels Westernblotmethode, also SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, nachfolgender Übertragung auf eine Filtermembran und Inkubation mit verdünntem Serum oder gereinigter Antikörperlösung bestätigt.

Um größere Mengen an Serum für die Antikörperreinigung zu erhalten, werden die Tiere ausgeblutet und das Serum durch Zentrifugieren des koagulierten Blutes gerinntet. Anschließend werden die Antikörper durch Protein-A-Affinitätschromatographie aus dem Serum isoliert.

Bei der weiteren Charakterisierung der so gewonnenen Antikörper wurde überraschenderweise gefunden, daß sie mit hoher Spezifität das bei der Immunisierung verwendete Chemokin binden, und daß nur ein unbedeutender Teil der Bindung auch an die jeweils andere Form des Chemokins erfolgte.

Beispiele1.) Polyklonale Antikörper gegen das am aminoterminalen Ende um 4 Aminosäuren trunkeerte gro-β (AS 5-73)

5

Für die Herstellung dieser Antikörper wurde von der bekannten Aminosäuresequenz des gro-β ein MAP über die Aminosäuren 5-20 hergestellt, Tiere wie oben beschrieben immunisiert und die Antikörper gewonnen. Diese wurden mittels ELISA und Western blot auf ihre Spezifität hin getestet.

## 10 1.1.) Polyklonale Meerschweinchen Antikörper (gp208)

Fig. 1 zeigt die mittels ELISA getestete spezifische Bindung des polyklonalen Antikörpers gp208 gegen Des4-gro-β und das MAP (gro-β 5-20) und die unbedeutende Kreuzreaktion des gp208 mit rekombinatem gro-β (AS 1-73). Der Titer gegen Des4-gro-β ist  $1:10^6$ , während der Titer für die Bindung an rekombinantes gro-β nur  $1:10^2$  beträgt.

15

Die gp208 Antikörper wurden zur Bestätigung im Westernblot in einer Verdünnung von  $1:10^4$  getestet. Dabei zeigte sich nur spezifische Bindung an Des4-gro-β und das MAP (gro-β 5-20) nicht jedoch an rekombinantes gro-β.

## 20 1.2.) Polyklonale Kaninchen Antikörper (R28)

Fig. 2 zeigt die mittels ELISA getestete spezifische Bindung des polyklonalen Antikörpers R28 gegen Des4-gro-β und das MAP (gro-β 5-20) und die unbedeutende Kreuzreaktion des R28 mit rekombinatem gro-β (AS 1-73). Der Titer gegen Des4-gro-β ist  $1:10^5$  während der Titer für die Bindung an rekombinantes gro-β nur  $1:10^2$  beträgt.

25

Die R28 Antikörper wurden zur Bestätigung im Westernblot in einer Verdünnung von  $1:10^4$  getestet. Dabei zeigte sich nur spezifische Bindung an Des4-gro-β und das MAP (gro-β 5-20), nicht jedoch an rekombinantes gro-β.

30 2.) Polyklonale Antikörper gegen nicht-trunkiertes gro-β (AS 1-73)

Für die Herstellung dieser Antikörper wurde von der bekannten Aminosäuresequenz des gro-β ein MAP über die Aminosäuren 1-20 hergestellt, Tiere wie oben beschrieben immunisiert und die Antikörper gewonnen.

35

## 2.1.) Polyklonale Meerschweinchen Antikörper (gp202)

Fig. 3 zeigt die mittels ELISA getestete spezifische Bindung des polyklonalen Antikörpers gp202 gegen rekombinantes gro-β und das MAP (gro-β 1-20) und die unbedeutende Kreuzreaktion des gp202 mit Des4-gro-β. Der Titer gegen rekombinantes gro-β ist  $1:10^5$  während der Titer für die Bindung an Des4-gro-β nur  $1:10^3$  beträgt.

40

Die gp202 Antikörper wurden zur Bestätigung im Westernblot in einer Verdünnung von  $1:10^4$  getestet. Dabei zeigte sich nur spezifische Bindung an rekombinantes gro-β und das MAP (gro-β 1-20) nicht jedoch an Des4-gro-β.

45

## 2.2.) Polyklonale Kaninchen Antikörper (R25)

Fig. 4 zeigt die mittels ELISA getestete spezifische Bindung des polyklonalen Antikörpers R25 gegen rekombinantes gro-β und das MAP (gro-β 1-20) und die unbedeutende Kreuzreaktion des R25 mit Des4-gro-β MAP (gro-β 5-20). Der Titer gegen rekombinantes gro-β ist  $1:10^5$  während der Titer für die Bindung an Des4-gro-β nur  $1:10^3$  beträgt.

50

Die R25 Antikörper wurden zur Bestätigung im Westernblot in einer Verdünnung von  $1:10^4$  getestet. Dabei zeigte sich nur spezifische Bindung an rekombinantes gro-β und das MAP (gro-β 1-20) nicht jedoch an Des4-gro-β.

55

Verwendete Abkürzungen in den Zeichnungen:

	blocking reagent:	BSA (Bovine Serum Albumin) als Blockierungsreagens
	lysine core:	Lysinkern des MAP
5	gro- $\beta$ 5-20 MAP:	MAP über AS 5-20 des gro- $\beta$
	gro- $\beta$ 1-20 MAP:	MAP über AS 1-20 des gro- $\beta$
	rec. gro- $\beta$ :	rekombinantes gro- $\beta$ (AS 1-73)
	Des4 gro- $\beta$ :	trunkiertes gro- $\beta$ (AS 5-73)
	hIL-8:	rekombinantes IL-8 (human)
10	hPF4:	rekombinanter Plättchen-Faktor 4 (human)

### Patentansprüche

- 15 1. Ein Antikörper, **dadurch gekennzeichnet**, daß er selektiv an ein nichtverkürztes Chemokin bindet, jedoch nicht an das entsprechende verkürzte Chemokin.
- 20 2. Ein Antikörper nach Anspruch 1, wobei er an die nicht verkürzte Form von MGSA, Gro- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , IL-8, IP-10, KC-Genprodukt, Macrophage Inflammatory Protein-2, RANTES, Monocyte Chemotactic Protein-1, Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  und -1 $\beta$ , JE-Genprodukt und murines Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  und -1 $\beta$  oder andere Proteine der C-X-C oder C-C Chemokinfamilie bindet.
3. Ein Antikörper, **dadurch gekennzeichnet**, daß er an ein am aminoterminalen Ende um 2-8 AS verkürztes Chemokin bindet, jedoch nicht an das entsprechende nicht verkürzte Chemokin.
- 25 4. Ein Antikörper nach Anspruch 3, wobei er an die verkürzte Form von MGSA, Gro- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , IL-8, IP-10, KC-Genprodukt, Macrophage Inflammatory Protein-2, RANTES, Monocyte Chemotactic Protein-1, Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  und -1 $\beta$ , JE-Genprodukt und murines Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  und -1 $\beta$  oder andere Proteine der C-X-C oder C-C Chemokinfamilie bindet.
- 30 5. Verwendung der Antikörper nach Anspruch 1 oder 3 zur Unterscheidung von verkürzten und nicht verkürzten Formen von Chemokinen in Zellkulturüberständen, Körperflüssigkeiten oder in Gewebeextrakten von Menschen oder anderen Säugerorganismen.

Hiezu 4 Blatt Zeichnungen

35

40

45

50

55

Fig. 1

gp208: Spezifische Bindung an Des-4-gro-β

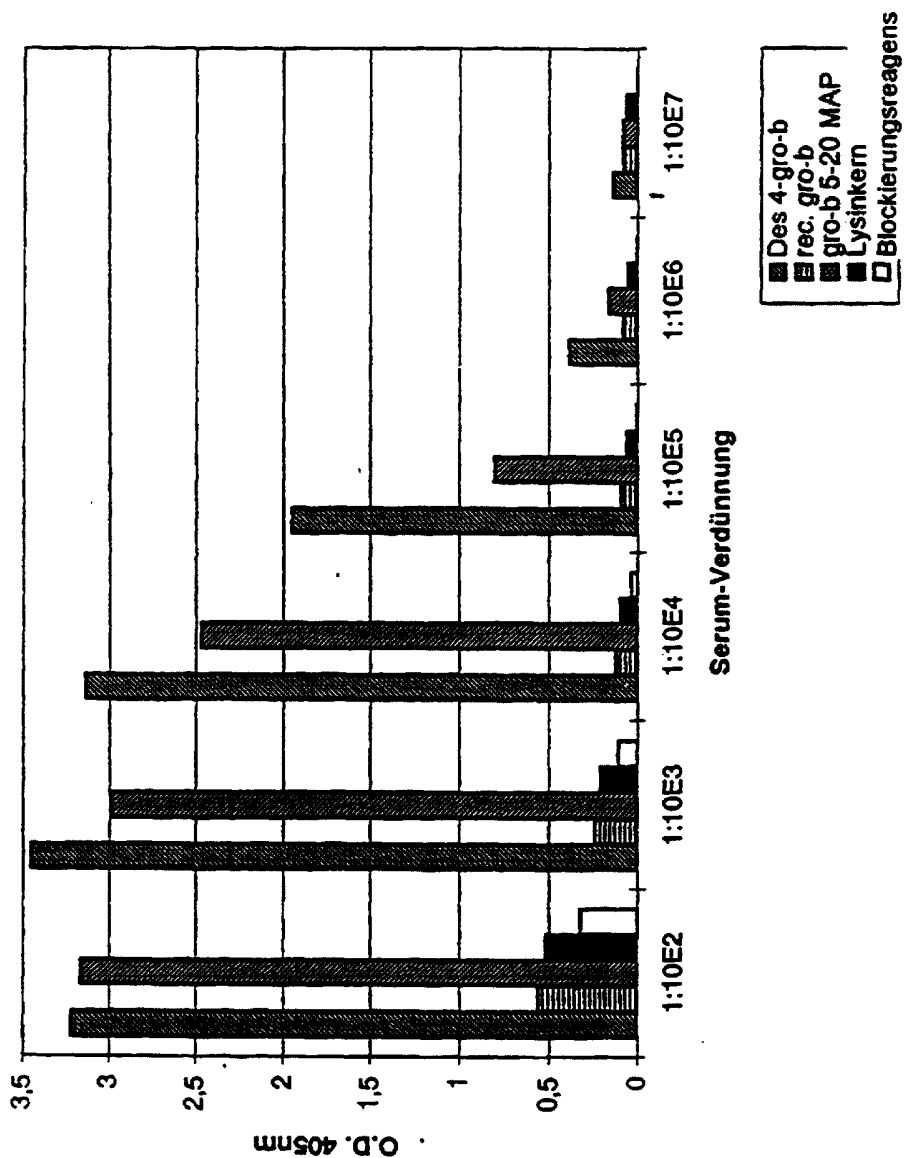


Fig. 2

R28: Spezifische Bindung an Des-4-gro- $\beta$

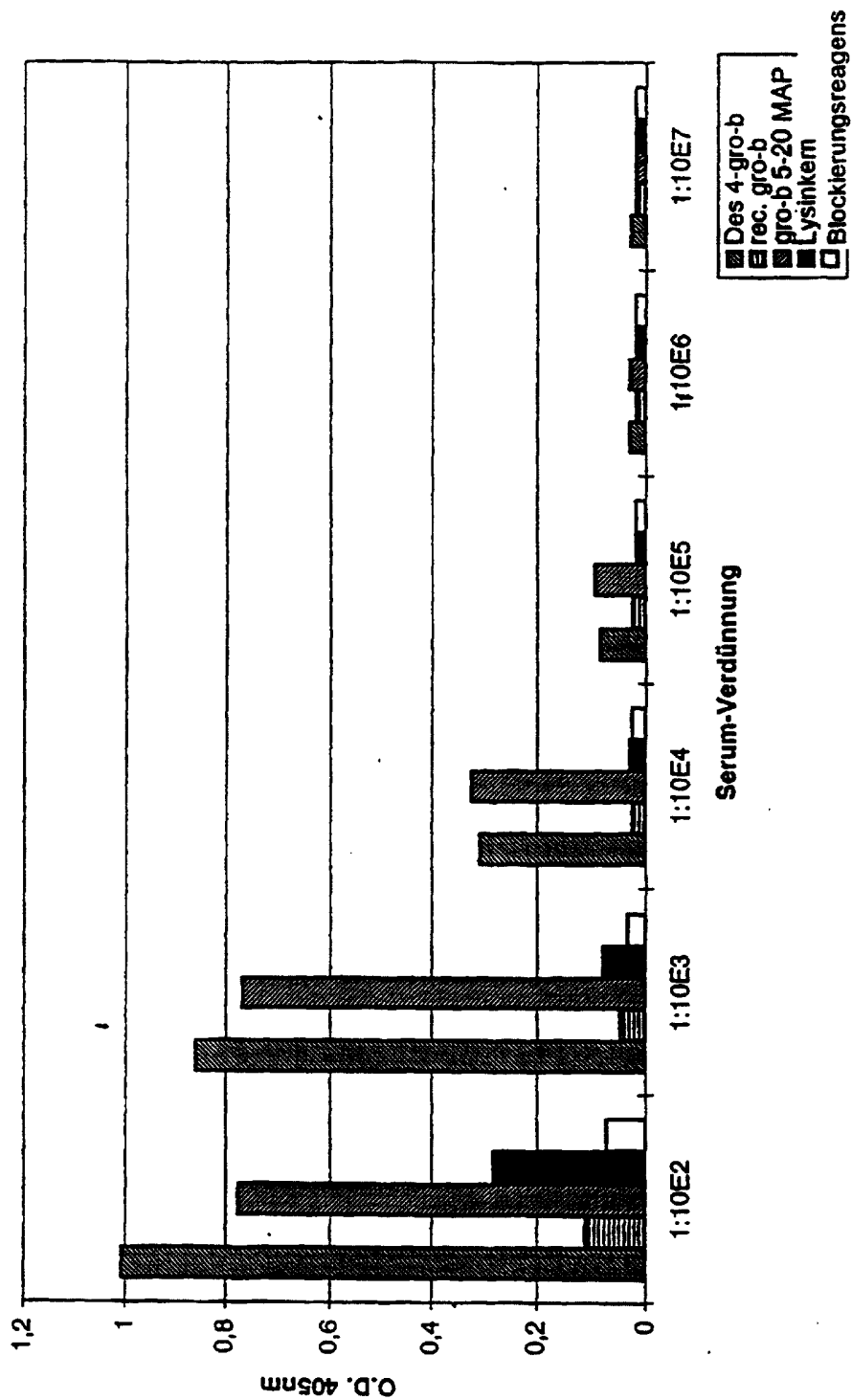


Fig. 3  
gp202: Spezifische Bindung an gro-b 1-73

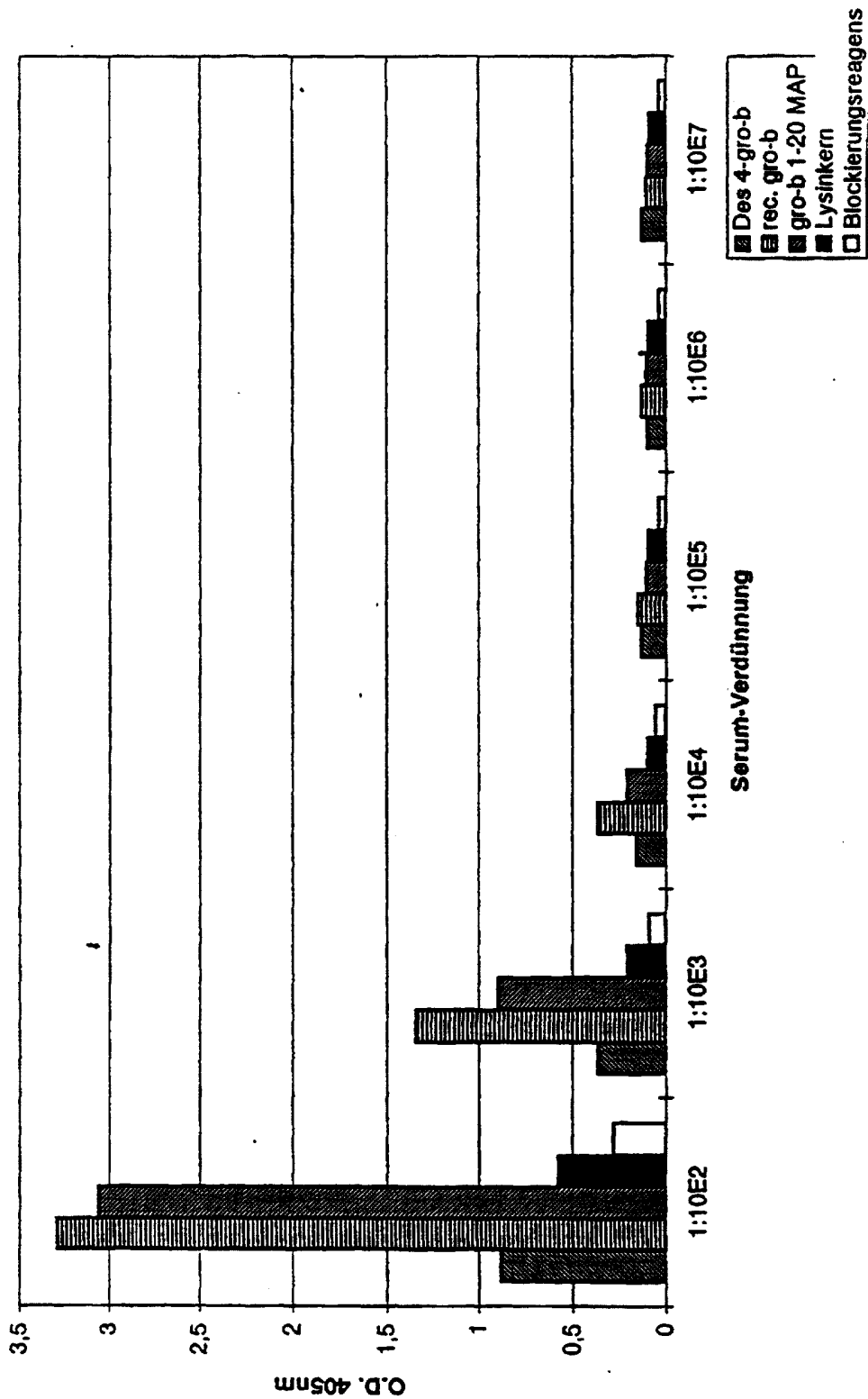


Fig. 4  
R25: Spezifische Bindung an gro- $\beta$  1-73

