



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 114 064**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **93917678 .0**
86 Fecha de presentación : **28.07.1993**
87 Número de publicación de la solicitud: **0659276**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.1995**

54 Título: **Inmunoanálisis para la detección de colágeno o de fragmentos de colágeno.**

30 Prioridad: **29.07.1992 DE 4225038**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.05.1998**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.11.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.11.2008**

73 Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE

72 Inventor/es: **Naser, Werner;**
Huber, Erasmus;
Seidel, Christoph y
Essig, Ulrich

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 114 064 T5

DESCRIPCIÓN

Inmunoanálisis para la detección de colágeno o de fragmentos de colágeno.

5 El invento se refiere a un inmunoanálisis competitivo para la detección de colágeno del tipo I.

10 El colágeno constituye una importante proteína estructural en el tejido conjuntivo de la piel, los cartílagos y los huesos. Se conocen 11 tipos, los cuales constan en cada caso de tres cadenas. Cada tipo se compone de 1 - 3 diferentes cadenas, las cuales son designadas como $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (E. Miller y colaboradores en *Methods in Enzymology* 144, *Structural and Contractile Proteins* (proteínas estructurales y contráctiles), compilador L. Cunningham, Academic Press Inc. 1987, páginas 3 - 41). Una propiedad característica del colágeno maduro de determinados tejidos, tales como especialmente huesos o cartílagos, es el entrecruzamiento de fibras situadas unas junto a otras mediante hidroxilisil-piridinolina o lisil-piridinolina (D. Fujimoto y colaboradores, *J. Biochem* 83 (1978), 863-867; D. Eyre y colaboradores, *Ann. Rev. Biochem* 53 (1984), 717-748 y D. Eyre, *Methods in Enzymology* 144 (1987), 115-139). Estos entrecruzamientos se pueden utilizar como marcadores bioquímicos para la detección específica de colágeno (Z. Gunja-Smith y colaboradores, *Biochem. J.* 197 (1981), 759-762). Al degradarse el colágeno extracelular, los derivados de hidroxilisil-piridinolina o lisil-piridinolina, que contienen cadenas laterales de péptidos, o los derivados de piridinolina libres con radicales lisilo o hidroxilisilo, tal como se describen en el documento de patente PCT WO 91/10141, llegan a líquidos corporales tales como sangre u orina. La detección de estos compuestos en líquidos corporales proporciona por lo tanto indicaciones acerca de la degradación de colágeno extracelular, tal como aparece ésta p. ej. en el caso de la osteoporosis y como consecuencia de tumores del tejido óseo. Para la detección de tales hidroxilisil- o lisil-piridinolinas con cadenas laterales de péptidos, se describieron en el documento WO 89/12824 anticuerpos monoclonales, que se habían obtenido por inmunización con correspondientes fragmentos de colágeno entrecruzados, los cuales se pueden aislar a partir de la orina. También en el caso del procedimiento descrito en el documento WO 91/08478, la detección de colágeno se efectúa a través de un anticuerpo contra productos de degradación de colágeno naturales, es decir entrecruzados que han sido producidos *in vivo*.

20 Una desventaja de estos péptidos aislados a partir de fuentes naturales consiste en que no está presente en el ensayo ninguna fuente segura para una producción reproducible de los antígenos o participantes en la fijación. Otra desventaja de los péptidos aislados a partir de fuentes naturales la constituye el peligro de una contaminación con material infeccioso.

30 Se pueden obtener antígenos definidos p. ej. mediante síntesis química de un péptido, que corresponde a un epítipo del antígeno. Si para ello se utilizan péptidos pequeños con un peso molecular de aproximadamente 700 - 1.500 D, se necesita la fijación a una molécula de soporte, a fin de obtener un antígeno con efecto inmunógeno. Mediante la fijación a la molécula de soporte no se debe modificar en tal caso la estructura del epítipo. El acoplamiento a la molécula de soporte se efectúa por lo tanto hasta ahora preferiblemente en los extremos de la cadena del péptido a una distancia suficiente de la supuesta zona con epítipo (*Laboratory Technics in Biochemistry and Molecular Biology, Synthetic Polypeptides as Antigens* (técnicas de laboratorio en bioquímica y biología molecular, polipéptidos sintéticos como antígenos), compiladores R.H. Burdon y P.H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam, Nueva York, Oxford, 1988, páginas 95 - 100).

45 Un problema que se plantea al efectuar la síntesis química de un antígeno definido, que corresponde a un producto natural de degradación de colágeno entrecruzado, lo constituye la estructura de la hidroxilisil- o lisil-piridinolina que resulta del entrecruzamiento, cuya síntesis química no se ha conseguido hasta ahora.

50 Fue misión del presente invento, por lo tanto, poner a disposición un antígeno definido para la producción de anticuerpos contra colágeno del tipo I o de fragmentos de colágeno de este tipo, para su empleo como participantes específicos en la fijación del anticuerpo contra colágeno o fragmentos de colágeno en un inmunoanálisis competitivo y como material de patrón para el establecimiento de una curva patrón o de calibración en un inmunoanálisis competitivo para la detección de colágeno o de fragmentos de colágeno del tipo I.

55 Hasta ahora, siempre se partía del supuesto de que para la detección de colágeno o de productos de degradación de colágeno en una muestra, sería necesario detectar las estructuras de entrecruzamiento de péptidos, de por sí o denominados entrecruzados, que se formaban por el entrecruzamiento de los radicales hidroxilisilo o lisilo, puesto que esta estructura de hidroxilisil- o lisil-piridinolina es característica para un colágeno. Ejemplos de tales métodos de detección se describen en los documentos WO 89/12824, WO 91/08478, WO 89/04491 y WO 91/10141.

60 Se encontró por fin, sorprendentemente, que para la resolución de la misión antes mencionada es suficiente utilizar un antígeno definido, un participante en la fijación o material de patrón, que contiene un péptido lineal sintético, que corresponde a una secuencia de la zona del extremo de N, lineal y no helicoidal, de colágeno del tipo I o a la secuencia SEQ ID NO 1 de la zona del extremo de C no helicoidal de colágeno del tipo I y no contiene ningún entrecruzamiento con hidroxilisil- o lisil-piridinolina. Las ventajas en el caso de utilizarse péptidos lineales sintéticos para su utilización como participantes en la fijación en inmunoanálisis, como material de patrón o como inmunógeno en la producción de anticuerpos, consiste en que estos péptidos, en contraposición con péptidos procedentes de fuentes naturales, se pueden preparar de manera reproducible en una estructura exactamente definida. Además de ello, un inmunoanálisis, en el que se emplean tales péptidos sintéticos cortos, muestra una menor susceptibilidad a perturbaciones.

ES 2 114 064 T5

Es objeto del invento, por lo tanto, un inmunoanálisis competitivo para la detección de colágeno del tipo I o de fragmentos de colágeno de este tipo en una muestra, el cual está caracterizado porque un partícipe en la fijación, que contiene un péptido lineal sintético, que contiene un péptido lineal sintético, que corresponde a una secuencia de la zona del extremo de N, lineal y no helicoidal, de colágeno del tipo I, o a la secuencia SEQ ID NO 1 de la zona del extremo de C no helicoidal de colágeno del tipo I y no contiene ningún entrecruzamiento con hidroxilisil- o lisil-piridinolina, se incubaba con un anticuerpo, que es capaz de fijar al péptido lineal sintético, y con la muestra, y se determina de manera apropiada la fijación del anticuerpo al partícipe en la fijación.

Otro objeto del invento es la utilización de un antígeno que contiene un péptido lineal sintético, que corresponde a una secuencia de la zona del extremo de N no helicoidal de colágeno del tipo I o a la secuencia SEQ ID NO 1 de la zona del extremo de C no helicoidal de colágeno del tipo I y no contiene ningún entrecruzamiento con hidroxilisil- o lisil-piridinolina, como material de patrón para el establecimiento de una curva patrón o de calibración en un inmunoanálisis competitivo para la detección de colágeno del tipo I o de fragmentos de colágeno de este tipo

Como péptidos lineales sintéticos son apropiadas todas las secuencias conexas de aminoácidos de la zona del extremo de N no helicoidal de colágeno del tipo I o la secuencia SEQ ID NO 1 de la zona del extremo de C no helicoidal de colágeno del tipo I, que no contiene ningún entrecruzamiento con hidroxilisil- o lisil-piridinolina. Estas zonas son conocidas a partir de los artículos de Chu y colaboradores, *Nature* 310, 337-340 (1984), Click y colaboradores, *Biochemistry* 9, 4.699-4.706 (1970), Morgan y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 245, 5.042-5.048 (1970), y Bernard y colaboradores, *Biochemistry* 22, 5.213-5.223 (1983). Preferiblemente, se utilizan péptidos a base de por lo menos 5 aminoácidos, de modo especialmente preferido a base de por lo menos 8 aminoácidos. En tal caso no es necesario que la secuencia abarque la zona del entrecruzamiento. Sin embargo, se puede solapar muy bien asimismo con esta zona. En ningún caso, sin embargo, se presenta en el péptido sintético un entrecruzamiento con hidroxilisil- o lisil-piridinolina. El péptido con la secuencia mostrada en SEQ ID NO 1, procedente de la zona del extremo de C de la cadena $\alpha 1$ de colágeno, es especialmente apropiado.

La concentración de productos de degradación de colágeno es un marcador de diagnóstico importante para la magnitud de una osteolisis. Con ayuda de los péptidos lineales sintéticos es posible llevar a cabo un inmunoanálisis competitivo para la detección de colágeno o de fragmentos de colágeno. Sorprendentemente, se ha puesto de manifiesto que estos péptidos compiten muy bien con los fragmentos de colágeno, que se presentan en muestras naturales tales como plasma, suero u orina, en cuanto a anticuerpos contra estos fragmentos de colágeno y por consiguiente hacen posible un ensayo competitivo. Tales anticuerpos contra colágeno o productos de degradación de colágeno son obtenibles comercialmente, por ejemplo en el estuche (kit) de radioinmunoanálisis de telopéptidos ICTP [¹²⁵I] de la Entidad Orion Diagnostica, Finlandia. Sin embargo, se pueden también conforme al invento mediante el péptido lineal sintético. El documento WO-A 90/08915 describe un ensayo para la detección de colágeno del tipo IX, mediante un anticuerpo monoclonal, que había sido producido mediante péptidos sintéticos, que constituyen secuencias del dominio globular NC 4. Las condiciones en el caso de colágeno del tipo IX no se pueden comparar con las de colágeno del tipo I; especialmente, en el dominio globular no aparece en el caso de colágeno del tipo IX ningún entrecruzamiento característico. En el documento EP-A-0298210 se utiliza para la inmunización de animales una secuencia de péptidos, a fin de obtener anticuerpos que reconozcan al procolágeno del tipo III. El procolágeno no constituye ningún marcador de diagnóstico para la osteolisis.

Para su empleo en un inmunoanálisis competitivo, el péptido lineal sintético se puede utilizar directamente como partícipe en una fijación, que está unido a una fase sólida, o también se puede acoplar a un segundo componente. El acoplamiento al segundo componente se efectúa preferiblemente a través de los aminoácidos en los extremos de N y C del péptido lineal. Eventualmente entre el péptido y el segundo componente se puede insertar además un espaciador. El segundo componente puede servir por ejemplo para acoplar el péptido indirectamente a una fase sólida. Ejemplos de ello son conocidos por un experto en la materia. Preferiblemente, el péptido es acoplado a albúmina de suero bovino y el producto del acoplamiento es fijado por adsorción a una fase sólida, por ejemplo a un tubo de material sintético. El péptido puede ser también unido covalentemente a biotina. La adhesión a la fase sólida se efectúa entonces a través de la fijación a avidina o estreptavidina, que a su vez se había fijado a la fase sólida. El segundo componente puede servir también como soporte para varios péptidos, por ejemplo en un inmunoanálisis de inhibición turbidimétrica competitiva (TINIA), estando acoplados varios péptidos por ejemplo a albúmina, inmunoglobulinas, β -galactosidasa, polímeros tales como polilisina o moléculas de dextrano tal como se describen en el documento EP-A-0.545.350, o partículas tales como látex. Preferiblemente, se acoplan de 30 a 40 moléculas de péptidos por cada molécula de soporte. El péptido puede estar acoplado también a un componente que constituye una marcación. Ejemplos de todas estas variantes de ensayo son conocidos por un experto en la materia.

En la realización de los ensayos, el anticuerpo puede ser incubado de modo simultáneo o consecutivo con la muestra así como con el partícipe en la fijación, que contiene el péptido lineal sintético. A continuación, de un modo usual, se determina la cantidad del anticuerpo fijado o no fijado. Como variantes de ensayo competitivas para la determinación de la cantidad de anticuerpos fijados o no fijados pueden servir por ejemplo ensayos de aglutinación, tales como el TINIA, o los principios de FPIA (inmunoanálisis de polarización con fluorescencia) (W. Dandliker y colaboradores, *J. Exp. Med.* 122 (1965), 1.029), de EMIT (inmunoanálisis multiplicado de enzimas) (Gunzer y colaboradores, *Kontakte III* (1980), 3-11) y de CEDIA (Henderson y colaboradores, *Clinical Chemistry* 32 (1986), 1.637-1.641). Los péptidos conformes al invento se han manifestado como especialmente apropiados para la utilización como partícipes definidos en la fijación para la competición con la muestra en cuanto a la fijación a los anticuerpos. Es especialmente preferido el péptido lineal sintético con la secuencia que se muestra en SEQ ID NO 1.

ES 2 114 064 T5

Después de la determinación de la magnitud de la fijación del anticuerpo al participe en la fijación, que constituye una medida de la cantidad de antígeno en la muestra, se puede determinar la cantidad exacta de antígeno en la muestra de un modo usual por comparación con un patrón tratado de igual manera.

5 Como patrón se pueden utilizar productos de degradación de colágeno aislados a partir de un material natural. Estos se distinguen sin embargo naturalmente por una determinada fluctuación. Se ha manifestado más apropiado como material de patrón un antígeno, que contiene el péptido lineal sintético conforme al invento. El antígeno del patrón puede constar en tal caso solamente de este péptido o también de este péptido, que está acoplado a un soporte apropiado, que sirve por ejemplo para obtener la mejor solubilidad en agua del péptido. Para la preparación del material de patrón a partir del péptido y del soporte, se sintetiza el péptido lineal, que corresponde a una secuencia de la zona del extremo de N no helicoidal de colágeno del tipo I, o a la secuencia SEQ ID NO 1 de la zona del extremo de C no helicoidal de colágeno del tipo I, y no contiene ningún entrecruzamiento con hidroxilisil- o lisil-piridinolina, y se une a la molécula de soporte a través de su aminoácido del extremo de N ó C mediante métodos apropiados de acoplamiento. Se pueden unir uno o varios péptidos por cada molécula de soporte. Eventualmente, el acoplamiento puede efectuarse a través de un espaciador. Para determinadas finalidades, tales como por ejemplo para ensayos de aglutinación, puede ser ventajoso fijar a una molécula de soporte varios péptidos conformes al invento de diferentes secuencias, sobre todo en el caso de que se empleen en el ensayo anticuerpos policlonales, que no habían sido producidos con ayuda del antígeno conforme al invento y por consiguiente reconocen la mayor parte de las veces a varios epítotos.

20 Como anticuerpos en el inmunoanálisis competitivo se pueden utilizar los anticuerpos ya conocidos contra productos de degradación de colágeno. Son apropiados también los anticuerpos, que se habían obtenido con ayuda de un antígeno que contiene el péptido sintético lineal conforme al invento.

25 Para la inmunización, los péptidos sintéticos lineales, que corresponden a una o varias secuencias de la zona del extremo de C ó N no helicoidal de colágeno del tipo I, deben ser fijados a una proteína de soporte apropiada, tal como por ejemplo hemocianina de lapa de bocallave, albúmina de suero bovino o edestina. Para la producción de estos antígenos o inmunógenos, se sintetizan químicamente de un modo usual en primer lugar los péptidos lineales. A continuación, se efectúa el acoplamiento de los péptidos sintéticos con las proteínas de soporte antes mencionadas, a través del grupo amino del extremo de N, mediante el éster N-hidroxi-succinimídico de ácido maleinimido-hexanoico. Se ha puesto de manifiesto que para la producción de anticuerpos, que son apropiados para la realización competitiva del ensayo, se adecuan especialmente péptidos lineales sintéticos con la secuencia que se muestra en SEQ ID NO 1, 2 ó 3.

35 Con los antígenos, que contienen un péptido lineal sintético, que corresponde a una secuencia de zona del extremo de C ó N no helicoidal de colágeno del tipo I, es posible obtener anticuerpos, que reconocen no solamente al péptido conforme al invento sino también a los productos de degradación de colágeno, que se presentan en líquidos corporales.

40 La producción de anticuerpos contra colágeno o fragmentos de colágeno, se puede efectuar mediante inmunización con un antígeno conforme al invento y aislamiento del anticuerpo deseado a partir del suero de los animales inmunizados según procedimientos conocidos. Preferiblemente, el aislamiento del anticuerpo deseado se efectúa a través de inmunoadsorción a un péptido que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO 1, 2 ó 3, acoplado a una proteína de soporte, preferiblemente a Sepharose.

45 La producción de anticuerpos monoclonales contra colágeno o fragmentos de colágeno se puede efectuar mediante inmunización con un antígeno conforme al invento, inmortalización de las células esplénicas (de bazo) de los animales inmunizados, clonación de las células esplénicas inmortalizadas, que producen los anticuerpos deseados, y aislamiento del anticuerpo a partir de las células clonadas o a partir del material sobrenadante de cultivo de estas células.

50 La inmunización se efectúa en los animales utilizados usualmente para ello; preferiblemente, se utilizan ratones o conejos.

55 La inmortalización de las células esplénicas de los animales inmunizados se efectúa según procedimientos habituales para un experto en la materia, tales como p. ej. la técnica del hibridoma (Köhler y Milstein, Nature 256 (1975), 495 - 497) o por transformación con el virus de Epstein-Barr (= transformación con EBV). Para la detección de las células inmortalizadas, que producen los deseados anticuerpos, se incuba una muestra del material sobrenadante de cultivo en un usual inmunoanálisis con el antígeno conforme al invento, utilizado para la inmunización, y se investiga si un anticuerpo se fija a este antígeno.

60 Los anticuerpos policlonales y monoclonales no solamente reaccionan con el hapteno conforme al invento utilizado para la inmunización, sino que igualmente reaccionan bien con colágeno, así como con los productos naturales de degradación de colágeno que son encontrados en líquidos corporales.

65 Los anticuerpos se pueden utilizar por lo tanto en los procedimientos antes descritos de detección para la determinación de colágeno o de fragmentos de colágeno.

Los anticuerpos policlonales o monoclonales se pueden utilizar para la determinación de la osteolisis por incubación del anticuerpo con una muestra de tejido y determinación del producto de degradación de colágeno que se fija al anticuerpo.

ES 2 114 064 T5

El invento se explica con mayor detalle mediante los siguientes Ejemplos en vinculación con los protocolos de secuencias.

- 5 La SEQ ID NO 1 muestra la secuencia de un péptido conforme al invento a base de 9 aminoácidos, significando Xaa un aminoácido cualquiera.
- La SEQ ID NO 2 muestra la secuencia de un péptido comparativo a base de 16 aminoácidos.
- 10 La SEQ ID NO 3 muestra la secuencia de un péptido comparativo a base de 10 aminoácidos.

Ejemplo 1

Síntesis de péptidos (Ejemplo comparativo)

15 Los péptidos que presentan una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos de colágeno, con las secuencias mostradas en los protocolos de secuencias SEQ ID NO 2 y 3, se preparan mediante síntesis de péptidos en fase sólida con fluorenil-metiloxi-carbonilo (Fmoc) en a) un sintetizador de péptidos Labortec SP 640 o b) un sintetizador de péptidos Zinsser Analytic SMPS 350.

20 a) *Preparación de acetyl-Ser-Ala-Gly-Phe-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-amida (SEQ ID NO 2)*

25 En el orden de sucesión indicado se emplean en cada caso 4,0 equivalentes de los siguientes Fmoc-derivados de aminoácidos:

- Lys con grupo protector terc.-butiloxycarbonilo
- 30 Glu con grupo protector éster terc.-butílico
- Gln sin grupo protector de la cadena lateral
- Pro sin grupo protector de la cadena lateral
- 35 Pro sin grupo protector de la cadena lateral
- Gln sin grupo protector de la cadena lateral
- 40 Pro sin grupo protector de la cadena lateral
- Leu sin grupo protector de la cadena lateral
- Phe sin grupo protector de la cadena lateral
- 45 Ser con grupo protector terc.-butil-éter
- Phe sin grupo protector de la cadena lateral
- 50 Asp con grupo protector éster terc.-butílico
- Phe sin grupo protector de la cadena lateral
- Gly sin grupo protector de la cadena lateral
- 55 Ala sin grupo protector de la cadena lateral
- Ser con grupo protector terc-butyl-éter
- 60 Acetil anhídrido de ácido acético

Los aminoácidos o derivados de aminoácidos son disueltos en N-metil-pirrolidona.

65 El péptido es sintetizado junto a 3 g de 4- (2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi-resina (Tetrahedron Letters 28 (1987), 2.107) con una carga de 0,87 mmol/g (JACS 95 (1973), 1.328). Las reacciones de acoplamiento se llevan a cabo durante 60 minutos en lo referente al Fmoc-derivado de aminoácido con 4,4 equivalentes de dicitio-

ES 2 114 064 T5

clohexil-carbodiimida y 4,8 equivalentes de N-hidroxi-benzotriazol en dimetilformamida como medio de reacción. El éxito del acoplamiento se controla mediante el ensayo de Kaiser (Anal. Biochem 34 (1970), 595) en la resma sintética lavada con isopropanol. Si en este caso se establece una conversión química todavía incompleta, esta conversión es completada mediante acoplamiento posterior según las condiciones antes indicadas. Después de cada etapa de síntesis se separa el grupo Fmoc mediante piperidina al 20% en dimetilformamida en el transcurso de 20 minutos. La carga en la resina se determina mediante adsorción de UV (ultravioletas) del grupo fulveno puesto en libertad después de cada tratamiento con piperidina. Después de la síntesis, la carga es todavía de 0,68 mmol/g.

La puesta en libertad del péptido desde la resina sintética y la separación de los grupos protectores inestables frente a ácidos se efectúa con 80 ml de ácido trifluoroacético, 5 ml de etanoditiol, 2,5 g de fenol, 2,5 ml de m-cresol y 5 ml de agua en 60 minutos a la temperatura ambiente.

La solución de reacción es concentrada a continuación en vacío. El residuo es recogido en diisopropil-éter, agitado enérgicamente durante 1/2 - 2 horas y luego separado por filtración. A continuación, el material es purificado previamente mediante una cromatografía de penetrabilidad en gel en presencia de Sephadex G15, utilizándose como agente de elución ácido acético al 0,5%. El material bruto obtenido es a continuación separado por filtración y aislado mediante una cromatografía de líquido de alto rendimiento (HPLC) preparativa en presencia de Nucleosil RP18 (columna de 40 mm x 250 mm, 300 Å, 5 µm) a través de un gradiente de desde 100% del tampón A (agua, ácido trifluoroacético al 0,1%) hasta 100% del tampón B (60% de acetonitrilo, 40% de agua, 0,1% de ácido trifluoroacético) en el transcurso de 120 minutos. La identidad del material eluido es comprobada mediante espectrometría de masas con bombardeo por átomos rápidos (FAB-MS).

b) Preparación de Ala-Gly-Phe-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln (SEQ ID NO 3)

El péptido fue preparado junto a 30 mg de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi-resina SA 5030 de la entidad Advanced Chemtech con una carga de 0,47 mmol/g. De los siguientes Fmoc-derivados de aminoácidos se acoplaron dos veces en cada caso 140 µmol en común cada vez con 140 µmol de 1-hidroxi-benzotriazol en dimetilformamida (DMF) y 10 µmol de N,N-diisopropil-carbodiimida en DMF, con el péptido fijado a la fase sólida, que se ha de constituir:

| | |
|-----|---------------------------------------------------------|
| Glu | con grupo protector tritilo |
| Ser | con grupo protector terc.-butilo |
| Asp | con grupo protector terc.-butilo |
| Pro | |
| Leu | |
| Phe | > en cada caso sin grupo protector de la cadena lateral |
| Gly | |
| Ala | |

Los períodos de tiempo de acoplamiento fueron de 30 y 40 minutos. El período de tiempo de separación fue de 20 minutos y se llevó a cabo con una solución de piperidina al 50% en DMF. Las etapas de lavado se llevaron a cabo con DMF ocho veces después de cada etapa de reacción. La puesta en libertad del péptido se efectuó por tratamiento de la resina, que ha sido separada del disolvente por filtración y lavada con diclorometano y metanol, con 1 ml de una solución de ácido trifluoroacético al 90%, tioanisol al 3%, etanoditiol al 3% y tiocresol al 3% en el transcurso de 20 minutos y 140 minutos. El producto se precipitó por adición de 15 ml de diisopropil-éter frío al material filtrado reunido y se aisló por filtración. El residuo se disolvió en un ácido acético al 50% y se liofilizó. Se obtuvieron 8 mg de un liofilizado de color blanco con una pureza de 79% según la HPLC. La identidad fue confirmada mediante espectrometría de masas con FAB.

60 Ejemplo 2

Activación de péptidos (Ejemplo comparativo)

El péptido preparado según el Ejemplo 1a) fue activado mediante acilación con maleinimido-hexanoil-N-hidroxi-succinimida (MHS). Para esto, se disuelven 0,1 mmol del péptido en 20 ml de un tampón fosfato de potasio 0,1 mmol/l de pH 7,5, se mezclan con una solución de 0,1 mmol de MHS en 6 ml de dioxano y se agitan durante 20 min a 20°C. A continuación se ajusta a pH 4 el valor del pH con ácido acético glacial y la mezcla de reacción se liofiliza

ES 2 114 064 T5

inmediatamente. El material liofilizado se disuelve en 5 ml de agua y se purifica a través de una HPLC preparativa en una columna con Waters Delta-Pak® C18 (100 Å, 15 µm, de 50 x 300 mm) a través de un gradiente de elución de desde 100% del tampón A (agua, ácido trifluoroacético al 0,1%) hasta 100% del tampón B (99,9% de acetonitrilo, 0,1% de ácido trifluoroacético).

5

Ejemplo 3

Producción de inmunógenos por acoplamiento de péptidos activados a proteínas de soporte (Ejemplo comparativo)

10

Se describe el acoplamiento de péptidos activados a hemocianina de lapa de bocallave (KLH de Keyhole Limpet Hemocyanine), albúmina de suero bovino (RSA, de Rinderserumalbumin) y β-galactosidasa (βGal). Para el acoplamiento de los péptidos activados con MHS según el Ejemplo 2 es necesario que la proteína de soporte lleve grupos SH libres. La βGal ya tiene a éstos de modo natural, y por lo tanto no necesita de ningún tratamiento previo adicional. En los casos de KLH y RSA los grupos NH₂ de la cadena lateral ε-amino de radicales de lisina son derivatizados por tratamiento con N-succinimidil-S-acetil-tiopropionato (SATP) y con ello son transformados en grupos SH.

15

Se obtiene por consiguiente una proteína de soporte, que presenta un número de grupos SH elevado con relación al estado nativo. Para ello, a una solución de 1,39 g de KLH en 500 ml de un tampón de fosfato de potasio 0,1 mol/l, de pH 8,5, se le añaden gota a gota en el transcurso de 20 min 113,51 mg de SATP (disueltos en 10 ml de dioxano). Después de haber agitado durante 30 min a 20°C, el valor del pH de la solución de reacción se ajusta posteriormente a pH 8,5 con lejía de sosa 0,1 mol/l y se agita durante otras 24 horas. A continuación, la solución es aumentada de concentración hasta 100 ml con ayuda de una celda Amicon (con membrana YM10), es dializada 3 veces cada vez durante 24 (3 x 24) horas, en cada caso frente a 3 l de un tampón de fosfato de potasio 0,1 mol/l de pH 8,5 y cloruro de sodio 0,05 mol/l, y a continuación es liofilizada.

20

25

Para la separación del grupo protector S-acetilo, se disuelven 481 mg del liofilizado de KLH-SATP en 20 ml de un tampón de fosfato de potasio 0,1 mol/l de pH 8,5 y cloruro de sodio 0,05 mol/l, se mezclan con 0,5 ml de una solución de hidroxilamina 1 mol/l recientemente preparada, y se agita durante 90 min a 20°C.

30

7,23 mol del péptido activado, obtenido a partir del Ejemplo 2, en 4 ml de agua se añaden a la proteína de soporte derivatizada y se agitan a 20°C durante 20 horas. A continuación, la solución turbia se dializa 2 veces frente a 1 l de un tampón de fosfato de potasio 0,1 mol/l, de pH 8,5, y cloruro de sodio 0,05 mol/l. El material dializado se centrifuga, el material sobrenadante transparente se separa por decantación y se liofiliza.

35

Ejemplo 4

Producción de anticuerpos policlonales contra fragmentos lineales de colágeno (Ejemplo comparativo)

40

En cada caso 5 corderos fueron inmunizados de manera en sí conocida con el inmunógeno del Ejemplo 3. Los inmunógenos contenían el péptido con la secuencia mencionada en SEQ ID NO 2, que corresponde a los aminoácidos números 892 hasta 907 en la secuencia de la cadena α de colágeno del tipo I. Como proteína de soporte sirvió KLH o β-galactosidasa. Los animales fueron inmunizados a intervalos mensuales con los inmunógenos en adyuvante completo de Freund. La dosis fue de 500 µg por cada animal y cada inmunización. A los cuatro meses después de la primera inmunización se extrajeron muestras de sangre y los anticuerpos obtenidos se comprobaron en cuanto a reacción con fragmentos de colágeno.

45

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 114 064 T5

ELISA para la detección de la reacción de los antisueros con fragmentos de colágeno

Se utilizaron el material y los reactivos siguientes:

| Placas de microtitulación Maxisorp F96, entidad Nunc | |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tampón de revestimiento | carbonato de sodio 50 mM de pH 9,6 NaN ₃ al 0,1 % |
| Tampón de incubación: | Fosfato de sodio 10 mM de pH 7,4 Tween 20 al 0,1 % NaCl al 0,9 % Albúmina de suero bovino al 1 % |
| Solución de sustrato: | ABTS®, Boehringer Mannheim GmbH, N° de catálogo 857424. Para el refuerzo de la señal se añadieron a la solución 2 mg/ml de vainillina. |
| Solución de lavado: | Tween 20 al 0,1 % NaCl al 0,9 %. |

Las cavidades de las placas de titulación fueron llenadas en cada caso con 100 μ l de una solución, que contenía 10 μ g/ml de fragmentos de colágeno en un tampón de revestimiento. Los fragmentos de colágeno se prepararon correspondientemente a los datos que se presentan en el documento de solicitud de patente europea EP-A 0.505.210, mediante digestión del colágeno humano procedente de huesos, con una proteasa. Después de una incubación durante una hora a la temperatura ambiente mediando sacudimiento, se lavó tres veces con la solución de lavado.

Los antisueros fueron diluidos con el tampón de incubación a 1 : 4.000 y se incubaron en cada caso 100 μ l en las cavidades de la placa de microtitulación durante una hora mediando sacudimiento a la temperatura ambiente. A continuación las cavidades se lavaron tres veces con una solución de lavado.

Un conjugado de peroxidasa de rábano rústico con anticuerpos de conejo contra la parte Fc de IgG de cordero, se diluye en el tampón de incubación hasta llegar a la concentración de 12,5 mU/ml y los pocillos de la placa de microtitulación se cargan en cada caso con 100 μ l de aquél. Después de una incubación durante una hora, mediando sacudimiento a la temperatura ambiente, las placas de titulación se lavan tres veces con una solución de lavado.

Se añaden a ello 100 μ l de una solución de sustrato y se incuban, hasta que se haga manifiesto un desarrollo de color (10 - 60 minutos). La extinción se determina como medición de diferencias a 405 y 492 nm.

Los sueros de la mayor parte de los animales pusieron de manifiesto una intensa reacción con los fragmentos de colágeno situados sobre la fase sólida. El suero de un animal no inmunizado manifestó en iguales condiciones solamente una débil señal de medición. Los resultados están representados en la Tabla 1.

TABLA 1

| β -galactosidasa | | KLH | |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Animal n° | Extinción | Animal n° | Extinción |
| 1 | 1,05 | 1 | 1,16 |
| 2 | 1,18 | 2 | 2,62 |
| 3 | 1,49 | 3 | 1,28 |
| 4 | 0,48 | 4 | 1,42 |
| 5 | > 2,70 | 5 | 1,81 |

ES 2 114 064 T5

Ejemplo 5

Determinación de colágeno, así como de sus productos de degradación en líquidos corporales, por medio de un ensayo competitivo (Ejemplo comparativo)

5

Las cavidades de una placa de microtitulación, que tiene 96 de ellas, se revisten durante una noche a 4°C según el documento EP-A 0.344.578 con estreptavidina (100 μ l de una solución de 1 μ g/ml en PBS) y los sitios de fijación inespecíficos, todavía libres, se bloquean mediante incubación con 300 μ l de BSA (albúmina de suero bovino, 10 mg/ml) durante 2 horas a la temperatura ambiente.

10

El decapeptido con la secuencia mostrada en SEQ ID NO 3, que se había preparado según el Ejemplo 1b), es biotinilado en el extremo de amino con el éster N-succinimídico de ácido D-biotinil- ϵ -amido-caproico (Boehringer Mannheim, N° de catálogo 1008960) de acuerdo con los datos del fabricante. El péptido biotinilado es disuelto en PBS (solución salina tamponada con fosfato de Phosphate Buffered Saline), Tween 20 al 0,05%, BSA al 1% en una concentración de 10 ng/ml, y por incubación durante 1 hora de 100 μ l por cada cavidad es fijado en la placa de microtitulación revestida con estreptavidina. A continuación de ello, el péptido no fijado se elimina lavando tres veces con PBS y Tween 20 al 0,05%.

15

En cada caso 150 μ l de la muestra a investigar (suero, plasma o un patrón) se incuban con 150 μ l del anticuerpo según el Ejemplo 4 durante 2 horas a 37°C (o durante una noche a 4°C). En cada caso 100 μ l de esta tanda se añaden al decapeptido fijado en las cavidades de la placa de microtitulación y se incuban durante 60 minutos a 37°C. En tal caso solamente el exceso de anticuerpo del antisuero, todavía no fijado después de la incubación con la muestra, se puede fijar al decapeptido inmovilizado.

20

Después de lavar tres veces con PBS/Tween 20 al 0,05% se detecta el anticuerpo fijado por subsiguiente incubación con un conjugado de IgG anti-conejo y POD (Boehringer Mannheim GmbH n° de catálogo 1238850) y ABTS® (1 mg/ml).

25

Con el ensayo (ensayo competitivo MTP) se sometieron a medición 164 sueros de pacientes. Los resultados fueron puestos en relación con los datos que se habían determinado con un radioinmunoanálisis (RIA). Este RIA de ICTP (telopéptidos de ICTP [¹²⁵I de Orion Diagnostica, Finlandia) se basa en fragmentos entrecruzados de colágeno, que son preparados y aislados mediante digestión enzimática y procedimientos bioquímicos. A partir de la Figura 1 se desprende por tanto que el procedimiento aporta unos valores de medición que se correlacionan bien con los valores del RIA, es decir que el procedimiento proporciona datos clínicamente relevantes. Se determinó un coeficiente de correlación de 0,959.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Inmunoanálisis competitivo para la detección de colágeno del tipo I o de fragmentos de colágeno de este tipo en una muestra, **caracterizado** porque

un partícipe en la fijación, que contiene un péptido lineal sintético, y que corresponde a una secuencia de la zona del extremo de N no helicoidal de colágeno del tipo I o a la secuencia SEQ ID NO 1 de la zona del extremo de C no helicoidal de colágeno del tipo I y no contiene ningún entrecruzamiento con hidroxilisil- o lisil-piridinolina,

10 se incuba con un anticuerpo, que es capaz de fijar al péptido lineal sintético,

y con la muestra,

15 y se determina de manera apropiada la fijación del anticuerpo al partícipe en la fijación.

2. Utilización de un antígeno, que contiene un péptido lineal sintético, y que corresponde a una secuencia de la zona del extremo de N no helicoidal de colágeno del tipo I o a la secuencia SEQ ID NO 1 de la zona del extremo de C no helicoidal de colágeno del tipo I y no contiene ningún entrecruzamiento con hidroxilisil- o lisil-piridinolina, como material de patrón para el establecimiento de una curva patrón o de calibración en un inmunoanálisis competitivo para la detección de colágeno o de fragmentos de colágeno del tipo I.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 114 064 T5

LISTA DE SECUENCIAS

(2) INFORMACIÓN ACERCA DE SEQ ID NO: 1:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 9 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

15

Xaa Phe Asp Phe Ser Phe Leu Pro Xaa
1 5

20

(2) INFORMACIÓN ACERCA DE SEQ ID NO 2.

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 16 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal
30 (ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

35

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

40 (2) INFORMACIÓN ACERCA DE SEQ ID NO 3:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 13 aminoácidos
45 (B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE LA MOLÉCULA: Péptido
50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

55

Cys Gly Ser Ala Gly Phe Asp Phe Ser Phe Leu Pro Gln
1 5 10

60

65