



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **175639**

(13) B

(51) Int Cl<sup>5</sup> C 07 K 7/08, 15/06, G 01 N 33/566, 33/68

Styret for det industrielle rettsvern

---

|                     |          |                        |                       |
|---------------------|----------|------------------------|-----------------------|
| (21) Søknadsnr      | 881904   | (86) Int. inng. dag og |                       |
| (22) Inng. dag      | 29.04.88 | søknadsnummer          |                       |
| (24) Løpedag        | 29.04.88 | (85) Videreføringsdag  |                       |
| (41) Alm. tilgj.    | 03.11.88 | (30) Prioritet         | 02.05.87, DE, 3714634 |
| (44) Utlegningsdato | 01.08.94 |                        |                       |

(71) Patentsøker      Hoechst AG, D-65929 Frankfurt am Main, DE  
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften eV,  
Bunsenstrasse 10, D-3400 Göttingen, DE  
(72) Oppfinner      Dietrich Brocks, Wiesbaden, DE  
Rupert Timpl, Gauting, DE  
(74) Fullmektig      Jan Helgerud, Bryns Patentkontor AS, Oslo

---

(54) Benevnelse      **Peptid, antistoff oppnådd ved hjelp av peptidet, en fremgangsmåte for immunologisk bestemmelse av intakt prokollagen peptid (type III) og anvendelse av peptidet**

(56) Anførte publikasjoner      Ingen

(57) Sammendrag      Ved immunisering av dyr med et peptid av sekvensen

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

bundet til et immunogent protein kan det utvinnes antistoffer, med hvis hjelp prokollagen peptid (type III) samt prokollagen type III kan bestemmes selektivt i kroppsvæsker.

Foreliggende oppfinnelse angår et peptid samt et antistoff, fremstilt ved immunisering av dyr med dette peptid, bundet til et immunogent protein.

5 Oppfinnelsen angår videre en fremgangsmåte for immunologisk bestemmelse av aminoterminalt prokollagen peptid (type III) er det aminoterminalle propeptid av kollagen (type III).

10 Til slutt angår oppfinnelsen anvendelsen av det ovenfor nevnte peptid.

15 Prokollagen peptid (type III) er det aminoterminalle propeptid av kollagen (type III), som avspaltes ekstracellulært efter sezernering av prokollagen (type III)-molekylet. Med en radioimmunologisk bestemmelsesmetode slik den er omtalt i EP-PS 4940 kan konsentrasjonen av dette prokollagen peptid bestemmes i kroppsvæsker. Kjennskapet til serumkonsentrasjonen av peptidet muliggjør uttalelser over aktiviteten av fibrotiske sykdommer, som f.eks. av leveren [Rohde, H. et al. "Eur. J. Clin. Invest." 9, 451-459 (1979)].

20 Den nøyaktige, selektive bestemmelse av prokollagen peptid (type III) i serum og andre kroppsvæsker er imidlertid ikke mulig med de hittil omtalte metoder, da de polyklonale antistoffer, som anvendes i disse metoder, reagerer med forskjellig lavere affinitet, med forskjellige i serum forekommende antigener, som delvis er avbygningsprodukter av prokollagen peptidet (type III) [Niemelä, O. et al. "Clin. Chim. Acta" 124, 39-44 (1982)]. Dette fører til at serumfortynningskurvene og fortynningskurvene av andre kroppsvæsker

25 ikke er parallelle til justeringskurver som oppstilles med rent prokollagen peptid (type III), og derfor må det fra hver ukjent prøve bestemmes antigeninnholdet i flere fortynninger for å fastslå antigenkonsentrasjonen over det 50% intercept

30 av fortynningskurven.

En ytterligere ulempe ved denne fremgangsmåten er at på grunn av en for liten kryssreaktivitet av antistoffet med rottehenholdsvis museantigener var det ikke mulig en bestemmelse av antigenkonsentrasjonen i kroppsvæsker av disse arter.

5 Ved hjelp av fremgangsmåten som er blitt beskrevet av Schuppan et al. ["J. Hepatol." 3, 27-37 (1986)] kan konsentrasjonen av antigenene bestemmes i rotteserum. Riktignok har denne fremgangsmåte de samme også ved metoden for  
10 humansera omtalte ulempe [Niemelä et al." Clin. Chim. Acta" 124, 39-44 (1982)] av de ikke parallelle inhibisjonskurver ved forskjellige kroppsvæsker.

Ved hjelp av fremgangsmåten ifølge EP-publikasjon 0089008 er  
15 det mulig å løse dette tekniske problem, idet det anvendes antistoffer som har for intakt prokollagen peptid (type III) og dets nedbygningsprodukt Col 1 sammenlignbar affinitet. Med denne fremgangsmåte bestemmes intakt og degradert prokollagen peptid (type III) sammen, hvilket imidlertid  
20 fører til unøyaktighet i den diagnostiske uttalelse, da normalkollektiv og pasientkollektiv kan overlapse sterkt.

Overraskende ble det nå funnet at ved anvendelse av et peptid med en bestemt aminosyresekvens kan det for immuniseringen  
25 fås antistoffer ved hjelp av hvilke det er mulig en spesifikk bestemmelse av det intakte prokollagen peptid (type III). Med disse antistoffer kan overraskende også prokollagen peptid (type III)-innholdet i kroppsvæsker av rotter eller mus bestemmes, hvilket er av nytte for den dyreeksperimentelle utprøving av fibrosuppressive stoffer.  
30

I henhold til dette angår foreliggende oppfinnelse et peptid, og dette peptid karakteriseres ved sekvensen

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

bundet til et immunogent protein.

Oppfinnelsen angår videre et antistoff som nevnt ovenfor, og dette antistoff karakteriseres ved at det reagerer med det intakte aminoterminal prokollagen peptid (type III) samt intakt prokollagen og pN-kollagen, dog ikke med Col 1 samt nedbrytningsprodukter av det aminoterminal prokollagen peptid (type III) med samme molekylvekt som Col 1.

Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte til immunologisk bestemmelse av aminoterminalt prokollagen peptid (type III) med antistoffer, og denne fremgangsmåte karakteriseres ved at

a) dyr immuniseres med et peptid med sekvensen

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

bundet til et immunogent protein,

b) fra serumet utvinnes antistoffene som beskrevet ovenfor, og

c) mengden av det aminoterminal prokollagen peptid (type III) og av prokollagen typen (III) bestemmes over det dannede antigen-antistoffkompleks.

Til slutt angår oppfinnelsen anvendelsen av det ovenfor beskrevne peptid som antigen.

Oppfinnelsen forklares nærmere nedenfor, spesielt i dens foretrukne utførelsesformer. Videre defineres oppfinnelsen i kravene.

Til fremstilling av antistoffer immuniseres dyr, fortrinnsvis gnagere, som for eksempel kaniner, marsvin eller geiter og sau med peptidet av sekvensen

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

koblet til et egnet immunogent protein i nærvær av komplett adjuvans. Spesielt foretrukket anvendes kaniner. Med gjentatte sekundær-injeksjoner, for eksempel i avstand på 4 til 8 uker, forsterkes immunsvaret. Resultatet av immuniseringen kontrolleres ved bestemmelsen av konsentrasjonen av antistoffer i den radioimmunologiske bindingsprøve [R. Timpl og L. Risteli, "Immunochemistry of the extracellular matrix", H. Furthmayr Ed., bind 1, 199 (1982)].

Egnede proteiner, hvortil det nevnte peptid kan være bundet, er alle immunogene proteiner. Fortrinnsvis anvendes hemocyanin, albumin eller polylysin. Peptidet kan fremstilles etter for fagfolk kjente metoder, som av G. Barany og A.B. Merrifield i "The Peptides", Bind 2, s. 3-254 (1980), Academic Press eller E. Brown, R.C. Sheppard og B.J. Williams, "J. Chem. Soc. Perkin Transact." 1, 1161 (1983).

Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan anvendes som serum eller rensset i forskjellige immunologiske fremgangsmåter, innbefattende alle former av radioimmunanalyser, for eksempel sekvensielle metningsanalyse eller likevektsanalyse, markering med kloramin T eller Bolton-Hunter-reagens [Felber, "Meth. Biochem. Anal." 22, 1 (1974), Shelley et al., "Clin. Chem." 19, 146 (1975)], samt i andre kompetitive bindingsanalyser, som fluorescens-, enzymimmunoanalyser, kjemiluminescens eller andre immunoanalyser. Antistoffene kan derved i immunologiske fremgangsmåter anvendes til isolering og karakterisering samt til kvantitativ bestemmelse av prokollagen peptid (type III) i vev og kroppsvæsker. Til kvantitativ bestemmelse går man fram etter de for fagfolk i og for seg kjente metoder, idet en flytende prøve som inneholder prokollagen peptid (type III) bringes til reaksjon med antistoffene ifølge oppfinnelsen, og mengden av prokollagen peptidet (type III) bestemmes over det dannede antigen-antistoff-komplekset. Derved spiller det ingen rolle om prokollagen peptidet (type III) dessuten er sammenknyttet eller ikke med aminoterminusen av kollagen (type III). De

hittil ved den immunologiske bestemmelse av forstyrrende nedbygningsprodukter av prokollagen peptidet (type III), spesielt Col 1, medomfattes ikke av antistoffene ifølge oppfinnelsen.

5

Oppfinnelsen skal forklares nærmere ved hjelp av noen eksempler, hvor prosentangivelsene er beregnet på vekt, hvis intet annet er angitt.

10

#### Eksempel 1

Fremstilling av peptid-hemocyanin konjugat-forbindelse.

15

100 mg hemocyanin (dialysert mot 5 x 3 l vann og derefter lyofilisert) oppløser man i 3 ml vann og tilsetter 24 mg av peptidet I-C-E-S-C-P-T-G-G-E-N-Y-S-P. Under omrøring ved værelsestemperatur tilsetter man i løpet av 2 timer i porsjoner tilsammen 1 g N-cykloheksyl-N'-[2-(4-morfolinyl)-etyl]karbodiimid-metyl-p-toluensulfonat. Etter omrøring natten over dialyserer man reaksjonsblandingen 24 timer mot tilsammen 5 x 10 l vann, og isolerer produktet derefter ved frysetørking. Man får 137 mg av konjugatforbindelsen.

20

#### Eksempel 2

25

Radioimmunbindingsprøve.

30

300 µl antiserum fra kaniner, immunisert med det ifølge eksempel 1 fremstilte konjugat, inkuberes i egnet fortynning natten over med 100 µl prokollagen peptid type III oppløsning (1 ng protein/100 µl, fremstilt som angitt i EP 4940, eksempel 1), som er markert radioaktivt med  $^{125}\text{J}$ . De dannede antigen-antistoff-komplekser utfelles ved tilsetning av en mot immunglobulin G av den til immunisering anvendte art rettede antiserum av en annen art. Etter sentrifugering og dekantering av det overstående bestemmes mengden av den utfelte radioaktivitet i  $\gamma$ -scintillasjonsspektrometer.

35

Eksempel 3

Radioimmunprøve.

0,2 ml av prøven som skal analyseres eller av prokollagen  
peptid (type III)-standarden inkuberes med en i relasjon til  
mengden av det markerte antigen limiterende mengde av  
antiserum (i 0,1 ml puffer) natten over ved 4°C. Etter  
tilsetning av 0,1 ml  $^{125}\text{J}$  markert prokollagen peptid (type  
III) (inneholder 1 ng protein) inkuberes 6-8 timer ved 4°C.  
De dannede antigen-antistoff-komplekser utfelles ved hjelp av  
et mot IgG av den til immunisering anvendte art rettet  
antiserum. Etter frasentrifugering og dekantering av det  
overstående bestemmes den utfelte radioaktivitet i  $\gamma$ -  
scintillasjonsspektrometer.

Ved sammenligning med en justeringskurve, til hvis oppstill-  
ing det ble anvendt standarder med forskjellige konsentra-  
sjoner av prokollagen peptid (type III), kan derefter  
konsentrasjonen av prokollagen peptid (type III) bestemmes i  
den ukjente oppløsning.

Eksempel 4

Bestemmelse av molekylvektsfordeling av det med antistoffene  
ifølge oppfinnelsen reagerende antigen i serum av for  
eksempel storfe og av svin.

1 ml serum oppdeles pr. gelfiltreringskromatografi over en  
"Sephacryl S 300"-søyle (1,6 x 130 cm), ekvilibrent i  
"phosphate buffered saline" PBS med 0,04% Tween 20. Hver 0,2  
ml av fraksjonene (hver 2,8 ml) anvendes i radioimmunprøven  
ifølge eksempel 3.

Fig. 1a viser elueringsprofilen av antigenet fra svineserum,  
fig. 1b elueringsprofilen av antigenet fra storfeserum  
sammenlignet til profilen av det ifølge EP 4940 bestemte  
antigen. Toppene 1/1a tilsvarende intakt prokollagen type III  
henholdsvis pN-kollagen type III (prokollagen, hvor den C-

175639

7

terminale ende mangler), toppene 2/2a tilsvareer intakt  
aminoterminalt prokollagen peptid type III, toppene 3/3a  
tilsvareer Col 1 samt nedbygningsprodukter av det aminoterm-  
inale prokollagen peptid type III med samme molekylvekt som  
Col 1.

5

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

Peptid, k a r a k t e r i s e r t v e d sekvensen

5

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

bundet til et immunogent protein.

10

2.

Antistoff, fremstilt ved immunisering av dyr med det i krav  
1 beskrevne peptid bundet til et immunogent protein,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet reagerer  
med det intakte aminoterminalt prokollagenpeptid (type III)  
15 samt intakt prokollagen og pN-kollagen, dog ikke med Col 1  
samt nedbrytningsprodukter av det aminoterminalt prokollagen  
peptid (type III) med samme molekylvekt som Col 1.

3.

20

Fremgangsmåte for immunologisk bestemmelse av aminoterminalt  
prokollagen peptid (type III), k a r a k t e r i s e r t  
v e d at

a) dyr immuniseres med et peptid med sekvensen

25

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

bundet til et immunogent protein,

30

b) fra serumet utvinnes antistoffene ifølge krav 2

c) mengden av det aminoterminalt prokollagen peptid  
(type III) og/eller prokollagen (type III) bestemmes  
over det dannede antigen-antistoff-kompleks.

35

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at peptidet er bundet til hemocyanin, albumin eller  
prolycin.

5

5.

Anvendelse av peptidet ifølge krav 1 som antigen.

10

15

20

25

30

35



