



Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentsøgning nr.: 1360/86

(51) Int.Cl.5

G 01 N 33/53

(22) Indleveringsdag: 24 mar 1986

G 01 N 33/68

(24) Løbedag: 23 jul 1985

(41) Alm. tilgængelig: 24 mar 1986

(44) Fremlagt: 14 sep 1992

(86) International ansøgning nr.: PCT/AU85/00165

(86) International indleveringsdag: 23 jul 1985

(85) Videreførelsesdag: 24 mar 1986

(30) Prioritet: 24 jul 1984 AU 6188/84

(71) Ansøger: \*Coselco Mimotopes Pty. Ltd.; Cnr. Duerdin and Martin Streets; Clauton 3168; State of Victoria, AU

(72) Opfinder: Hendrik Mario \*Geysen; AU

(74) Fuldmægtig: Lehmann & Ree A/S

(54) Fremgangsmåde til bestemmelse af en sekvens af monomerer, der er ækvivalent med en epitop på et antigen

(56) Fremdragne publikationer

1360-86

(57) Sammendrag

En monomersekvens, som er en topologisk ækvivalent <sup>til</sup> med den epitop, der er komplementær til en særlig paratop på et antistof, som er af interesse, detekteres eller bestemmes ved,

1. at der syntetiseres en flerhed af catamerpræparationer; idet hver af catamerpræparationerne består af en flerhed af catamerer, i hvilke sammensætningen i én eller flere udvalgte positioner i hver catamer er kendt, og sammensætningen i de øvrige positioner udgøres tilfældigt af elementer fra en defineret gruppe af monomerer; og flerheden af catamerpræparationer omfatter præparationer, i hvilke sammensætningen i de udvalgte positioner varieres systematisk til at indeholde elementer fra en defineret monomergruppe;
2. at hver i flerheden af catamerpræparationer kontaktes med antistoffet, som er af interesse; og
3. at forekomst eller fravær af binding mellem hver i denne flerhed af catamerpræparationer og det givne antistof detekteres eller bestemmes til indicering af en delsekvens af mimotoperne til paratopen af det givne antistof.

DK 107074 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til påvisning eller bestemmelse af en sekvens af monomere molekyler, som er topologisk ækvivalent med den epitop, der er komplementær til en særlig paratop på et antistof, som er af interesse.

5

De nedenfor anførte betegnelser, der anvendes i denne beskrivelse, har følgende betydninger:

10 Epitop: den specifikke overflade af et antigenmolekyle, som tegnes af det område, hvor der forekommer gensidig virkning med et antistofmolekyle.

15 Catamer: et polymermolekyle, der har en nøjagtigt fastlagt sekvens, og som dannes ved kondensationen af et nøjagtigt antal småmolekyler. Bemærk at denne betegnelse omfatter molekyler, til hvilke der anvendes forskellige typer af kondensationsreaktioner til at forene de små molekyler. Et tal, der er sat foran ordet "catamer", angiver, at catameren dannes ved kondensation af det anførte antal af små molekyler, f.eks. betegner 8-catamer, at catameren er sammensat af 8  
20 småmolekyler. Eksempler på catamerer omfatter et hvilket som helst givet peptid og et hvilket som helst givet oligo-saccharid.

25 Monomer: et molekyle fra gruppen af småmolekyler, der kan kondenseres sammen til dannelse af en catamer. Gruppen af monomerer omfatter, men er ikke begrænset til, f.eks. gruppen af almindelige L-aminosyrer, gruppen af D-aminosyrer, gruppen af syntetiske aminosyrer, gruppen af nucleotider og gruppen af pentoser og hexoser.

30 Peptid: en catamer, i hvilken de små molekyler er  $\alpha$ -aminosyrer, som er bundet sammen ved peptidbindinger. I forbindelse med nærværende beskrivelse må det forstås, at aminosyrerne kan være den L-optiske isomer eller den D-optiske isomer.

35 Mimotop: catamer, som i mindst én af sine konformationer har et overfladeområde med den ækvivalente molekyltopologi til den epitop, af hvilken den er en efterligning.

Komplementær: betegner tilpasningen af de reagerende overflader på en antistofparatop og dens specielle epitop til hinanden. Disse

overflader må passe sammen ved binding af antistofparatopen med dens epitop. Derfor kan paratopen og dens epitop beskrives som komplementære, og ydermere er kontaktoverfladernes karakteristika komplementære til hinanden.

5

Paratop: det forbindende sted på et antistof, der er komplementært til en bestemt epitop.

Det er allerede velkendt:

- 10 1. at et antigen er et makromolekyle, såsom et protein eller polysaccharid, som almindeligvis, men ikke nødvendigvis, er fremmed for et menneske eller dyr, og som, når det indføres i det menneskelige- eller dyriske legeme, stimulerer enten et humoralt eller cellulært immunrespons eller begge;
- 15 2. at det specifikke område på antigenet, hvortil antistoffer bindes, er kendt som epitopen;
3. at der kan være mere end én epitop på et antigenmolekyle;
4. at legemets almindelige humorale respons på et antigen er at producere antistoffer mod de forskellige epitoper på antigenet;
- 20 hver af de individuelle antistoffer er et monoklonalt antistof, der definitionsmessigt fremstilles af en cellegruppe, som stammer fra multiplikationen og differentiationen af en enkelt B-cellestamfader;
- 25 5. at paratopen af et antistofmolekyle defineres som molekyløverfladen af det antistofforbindende sted, som udgør kontaktoverfladen mellem epitop og antistoffet;
6. at der mod en given epitop af antigenet kan produceres mere end ét antistof, som er forskellig i deres paratoper; hver paratop kan karakteriseres ved sin specificitet til den komplementære epitop; og
- 30 7. at de antistoffer, der produceres som respons på en antigen udfordring, yderligere kan karakteriseres ved, at visse kan neutralisere direkte ved binding med antigenet, andre kan danne aggregater, som makrofagsystemet kan tage sig af, og atter andre kan være ude af stand til at fremvise nogen som helst
- 35 målelige biologiske virkninger.

Det er formålet med den foreliggende opfindelse at påvise eller bestemme den ene eller flere korte monomersekvenser, som ækivalerer

med en epitop på et antigen således, at disse sekvenser kan bindes til det samme antistof som epitopen. Disse catamerer vil være epitopens mimotoper. Denne viden er uvurderlig ved fremstilling af syntetiske catamervacciner mod sygdomme og ved fremstilling af meget  
5 specifikke diagnostiske og terapeutiske midler.

Dette formål opnås med fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved,

- 10 1) at der syntetiseres en flerhed af catamerpræparater, som hver består af en flerhed af catamerer, hvorhos hver catamer udgøres af elementer fra en defineret gruppe af monomerer, og hvor:
  - 15 i) sammensætningen i hver catamer er kendt og konstant i to eller flere positioner for hver catamer i catamerpræparatet, og
  - 20 ii) sammensætningen i hver af de øvrige positioner i hver catamer udgøres af tilfældigt indførte elementer fra den definerede gruppe af monomerer, hvorhos flerheden af catamerpræparater omfatter præparater, hvori sammensætningen i de udpegede positioner varieres systematisk med hensyn til forekomst af elementer fra den definerede gruppe af monomerer,
- 25 2) at hvert catamerpræparat fra denne flerhed af catamerpræparater bringes i kontakt med det antistof, som er af interesse,
- 30 3) at forekomst eller fravær af binding mellem hvert catamerpræparat i denne flerhed af catamerpræparater og det omhandlede antistof påvises eller bestemmes,
- 35 4) at der ud fra den kendte sammensætning i de to eller flere udpegede positioner i hvert af de catamerpræparater, som udviser binding til det omhandlede antistof, bestemmes en delsekvens af monomerer, der er topologisk ækvivalent med en epitop, som er komplementær til en speciel paratop i det foreliggende antistof,
- 5) at der syntetiseres en yderligere flerhed af catamerpræparater,

i hvilke hver catamer i initielt udpegede positioner omfatter den under ovenstående punkt 4 bestemte delsekvenssammensætning og mindst én yderligere position som en udpeget position, hvorefter

5

- 6) ovenstående trin 2, 3 og 4 gentages for denne yderligere flerhed af catamerpræparater.

Den mest almindelige gruppe af små molekyler, som kan kondenseres sammen til dannelse af en catamer, er gruppen af  $\alpha$ -aminosyrer. Andre molekyler, som er forenelige med den valgte kemi, kan dog anvendes. For eksempel kan  $\beta$ -aminosyrer med fordel anvendes til tilføjelse af en ekstra -C-afstandsbinding på nøjagtigt kontrollerede positioner i catameren.

15

Procedurerne ifølge trin 5-6 kan gentages indtil alle positioner i hvert catamerpræparat er blevet angivet; og alle deducerede mimotoper kan derefter syntetiseres ud fra deres relative evne til at reagere med det antistof, som er af interesse, til bestemmelse af hvilke mimotoper, der er de bedste for den epitop, der svarer til det givne antistof.

25

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er baseret på den idé, at et givet antistof vil reagere specifikt med en catamer, som er mimotop for den epitop, mod hvilken antistoffet er rettet. Den hviler endvidere på den erkendelse, at moderne immunologiske metoder tillader påvisning af reaktion mellem et antistof og dets epitop, når begge er til stede i meget små mængder. Binding er blevet påvist, når et antistof og dens epitop er til stede i mængder på ca. 1 pmol. Derfor vil et antistof, hvis det præsenteres for en blanding af catamerer, blandt hvilke der er en mimotop til dets epitop, ses at reagere med blandingen ved at binde specifikt til mimotopen. Mimotopernes identitet udledes ud fra den kendte monomersammensætning på de angivne positioner for reaktion med catamerpræparater. En komplet mimotop vil forventes at være én eller anden kombination af de reagerende bestanddele, der udledes på denne måde.

30

35

Det fremgår, at fremgangsmåden ifølge nærværende opfindelse ikke kræver forudgående information om antigenets natur, og i særdeleshed

kræver den ingen forkundskab om den monomersekvens, der udgør antigenet. I virkeligheden er det ikke nødvendigt for udøvelse af nærværende opfindelse at kende oprindelsen eller identiteten af det antigen, mod hvilket antistoffet er rettet. Ydermere forudsætter opfindelsen ikke nogen antagelse om den epitop, der stimulerer produktionen af det særlige antistof. Fremgangsmåden vil identificere mimotoper af usammenhængende såvel som sammenhængende epitoper. Det vil forstås, at på grund af selve naturen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan den anvendes på et hvilket som helst antigen, som delvis eller totalt er ikke-proteinagtigt, og hvis epitoper kan efterlignes med en passende catamer. Mimotoper kan eller kan ikke fremstilles ud fra enheder af samme gruppe af monomerer, som udgør antigenet.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse udføres fortrinsvis ved screening af en flerhed af syntetiserede catamerpræparater mod et antistof, som er af interesse. Antistoffet vil ideelt være et monoklonalt antistof, som kan fremstilles ved enhver af de sædvanlige fremgangsmåder. Polyklonalt antiserum fra mennesker og dyr kan anvendes, hvis en monoklonal antistofkilde ikke står til rådighed; dog kan analyser af de resulterende data herved kompliceres, idet de observerede reaktioner kan hidrøre fra mere end ét monoklonalt antistof. Ved anvendelse af polyklonalt antiserum, kan det være nødvendigt at reducere antistoffets uensartethed ved anvendelse af metoder, der er velkendt for fagfolk inden for området, f.eks. iso-elektrisk fokusering, HPLC-baseret kromatografi eller affinitetskromatografi.

Til rådighed værende indikationer tyder på, at en epitop kan efterlignes af en catamer, der er ca. 8 monomere lang, når monomererne stammer fra gruppen af  $\alpha$ -aminosyrer. 8-Catamerens evne til at være mimotop for epitopen er ikke kritisk afhængig af enhver position, der har en særlig monomer. Det må dog forstås, at den foreliggende opfindelse ikke er begrænset til sekvenser, der er dannet af 8 monomerer.

Den flerhed af catamerpræparater, der kræves syntetiseret ved udøvelse af nærværende opfindelse, kan fremstilles ved en hvilken som helst af de kendte fremgangsmåder til catamersyntese. Den

foretrukne fremgangsmåde, når monomererne er aminosyrer, er at anvende fastfasemetoden, der er beskrevet i beskrivelsen til australsk patentansøgning nr. 25429/84, hvor hver blanding af catamerer syntetiseres på en polyethylenbærer.

5

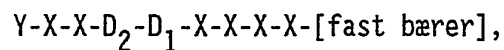
Det følgende er en detaljeret beskrivelse af en udførelsesform for den foreliggende opfindelse:

A. Syntese af en flerhed af catamerpræparater

10

Den foretrukne måde at udøve nærværende opfindelse på er, som anført ovenfor, at syntetisere catamererne på en fast bærer. I denne udførelsesform vil flerheden af catamerer alle have den generelle formel:

15



20

hvor X betegner et element fra en gruppe af monomerer. Hvert catamerpræparat bør ideelt omfatte catamerer, i hvilke hver af 'X'-positionerne i catamerformlen repræsenterer et element fra gruppen af monomerer, således at hvert element i gruppen er til stede i catamerpræparatet i tilnærmelsesvis ækvimolære mængder. Det bemærkes, at den samme gruppe af monomerer ikke behøves anvendt i hver X-position. Y i den generelle formel betegner en endegruppe på catameren, og kan være, men er ikke begrænset til, f.eks. et hydrogenatom eller en acetylgruppe.  $D_1$  og  $D_2$  repræsenterer angivne positioner, som er besat af monomerer, der er kendte og kostante i hvert syntetiseret catamerpræparat, men som varieres systematisk mellem catamerpræparaterne. Det bemærkes, at den samme gruppe af monomerer ikke behøver anvendes i hver angiven position. Det skal også bemærkes, at når catamererne syntetiseres ud fra aminosyrer, kan catamererne kobles til den faste bærer ved deres -COOH-ender eller ved deres aminender.

25

30

35

Hvis "i" er antallet af elementer i gruppen af monomerer, der bindes i  $D_1$ -positionen, og "j" er antallet af elementer i gruppen af monomerer, der bindes i  $D_2$ -positionen, så vil der blive syntetiseret et totalt antal forskellige catamerpræparater på  $i \cdot j$ .

I den foreliggende udførelsesform forberedes bærestavene således, at

monomererne kan bindes til dem. Stavene udsættes derefter for reaktionsblandingen, der indeholder ethvert element af den gruppe af monomerer, der betragtes. Dette vil koble monomerer til den første X-position. Denne proces gentages tre gange til opnåelse af catameren Z-X-X-X-X-[fast bærer], hvor Z betegner den beskyttende gruppe, der passer til den pågældende gruppe af monomerer; eksempler på Z, når monomererne er aminosyrer, omfatter BOC- og Fmoc-grupper. Op til dette trin i udførelsen af fremgangsmåden er alle stave blevet behandlet på identisk måde.

10

Ved kobling til D<sub>1</sub>-positionen vil hver stav blive behandlet med en reaktionsblanding, der kun indeholder en enkelt monomer, såsom en beskyttet aminosyre eller lignende. I D<sub>1</sub>-positionen vil hver af de "i" monomerer blive koblet til "j" stave. Ved kobling til D<sub>2</sub>-positionen behandles hver stav igen med en reaktionsblanding, der kun indeholder en enkelt monomer, såsom en beskyttet aminosyre eller lignende. Hver af de "j" stave, som har en særlig monomer i D<sub>1</sub>-positionen, vil få en forskellig monomer koblet til D<sub>2</sub>-positionen. På denne måde vil enhver kombination af elementerne fra gruppen/grupperne af monomerer forekomme i de i·j stave. Koblingen af monomerer i de øvrige X-positioner er identisk med koblingen i de X-positioner, der er tættere på den faste bærer.

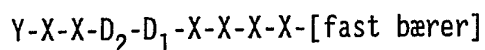
15

Efter syntese af flerheden af catamerpræparater fjernes eventuelle sidekædebeskyttende grupper fra catamerpræparaterne ved anvendelse af sædvanlige metoder, og de stavkoblede catamerer vaskes.

25

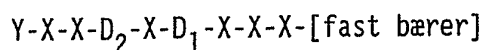
En foretrukket udførelsesform for opfindelsen er at syntetisere mere end ét sæt flerheder af catamerpræparater til hjælp ved analysen af data. Ud over syntetisering af catamerer med den generelle formel:

30

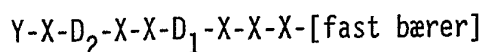


som beskrevet ovenfor, kan der således yderligere fremstilles grupper af catamerer med de generelle formler:

35



og



Det bemærkes, at andre generelle formler kan udvælges til syntese af andre sæt af catamerpræparater.

### B. Afprøvning af catamerpræparaterne

5

Flerheheden af catamerpræparater, der er fremstillet som under A ovenfor, kontaktes derefter med det særlige antistof, som er af interesse. Reaktionen mellem antistof og bestanddele af catamerpræparaterne kan derefter påvises ved en hvilken som helst af de sædvanlige metoder, f.eks. radioimmunanalyse (RIA). Den foretrukne fremgangsmåde til påvisning af til stede værelsen af antistof-mimotop-binding er imidlertid anvendelse af den velkendte ELISA-analyse (engelsk: enzym-linked immunosorbent assay).

15

Ved slutningen af hver analyse kan antistofferne fjernes fra catamerpræparaterne ved f.eks. vask med en opløsning af 8 M urinstof, 0,1% 2-mercaptoethanol og 0,1% natriumdodecylsulfat, efterfulgt af adskillige vask i phosphatpuffret saltopløsning. På denne måde kan flerheheden af catamerpræparaterne genanvendes til afprøvning med mange andre antistoffer.

20

### C. Analyse af data

Ved afprøvning af catamerpræparaterne med antistof vil det findes, at visse stave vil udvise påviselig binding med antistoffet. Det catamerpræparat, der er koblet til en sådan reagerende stav, indeholder en bestemt kombination af elementerne fra gruppen/grupperne af monomerer i positionerne  $D_1$  og  $D_2$ . Denne kombination af monomerer vil sandsynligvis udgøre en del af den catamer, som udgør en mimotop for den epitop, der er komplementær til antistoffet. Yderligere analyser af dataene kan udføres på et antal forskellige måder. Disse omfatter:

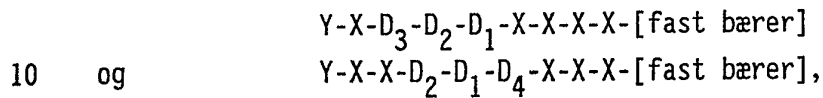
30

1. at de reagerende monomerer kombineres og permuteres til dannelse af en liste over catamerer, som kan omfatte én eller flere mimotoper til epitopen; hver catamer i denne liste kan betragtes som en mulig mimotop;

35

2. at de mest egnede kandidater fra listen over reagerende

monomerkombinationer udtages (men ikke nødvendigvis de, der giver den højeste antistofbindingsaktivitet), og at der yderligere syntetiseres sæt af catamerpræparater, i hvilke den kendte reagerende monomerkombination holdes konstant, og at monomererne i andre positioner af catamererne varieres systematisk; i eksemplet ovenfor vil et egnet sæt af sådanne catamerpræparater således omfatte catamerer med formlerne:



hvor  $D_1$  og  $D_2$  betegner den reagerende monomerkombination, og  $D_3$  og  $D_4$  betegner andre angivne positioner, hvor hver af elementerne i monomergruppen varieres systematisk; og

15

3. at resultaterne fra mere end én af flerhedssættene af catamerpræparater kombineres og afkodes til fremstilling af en enkelt monomersekvens eller muligvis et meget lille antal af sådanne sekvenser, som kan efterligne den epitop, der er af interesse. Dette skyldes, at ved anvendelse af den ovenfor angivne udførelsesform er de reagerende monomerkombinationer alle kendte, når de ligger ved siden af hinanden, når de er adskilt af en position, og endelig når de er adskilt af to positioner; disse data kan let afkodes til opnåelse af mimotopsekvensen. Denne fremgangsmåde vil være mest fordelagtig når det antistof, der anvendes til afprøvning af flerheden af catamerpræparater, er et monoklonalt antistof.

20

25

#### D. Syntese af udvalgte mimotoper

30

De udvalgte mimotoper kan derefter syntetiseres ved anvendelse af lignende fremgangsmåder som de, der er beskrevet i beskrivelsen til australsk patentansøgning nr. 25429/84. Efter at de udvalgte catamerer er blevet syntetiseret, bringes de til reaktion med det antistof, som er af interesse. Det er derefter simpelt at udvælge den catamer, der bindes stærkest til antistoffet. Som en sidste kontrol på, at denne catamer er den bedste mimotop til epitopen, kan catamersekvensen anvendes som grundsekvensen for et udskiftningsnet, som beskrevet i beskrivelsen til australsk patentansøgning nr.

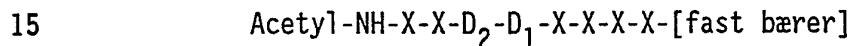
35

25428/84.

I de nedenfor anførte eksempler 1, 2 og 3 er den fastlagte monomergruppe en gruppe af almindelige L- $\alpha$ -amino-syrer. Denne monomergruppe anvendes til både de udpegede positioner og de tilfældige positioner (positionerne D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> og X som anvendt i de generelle formler ovenfor). Ydermere var catamerernes endegruppe (Y-gruppen) i disse eksempler en acetylrest.

10 Eksempel 1

En flerhed af 8-catamerpræparater blev syntetiseret med den generelle formel:



hvor X betegner et element fra gruppen af 20 almindelige L- $\alpha$ -amino-syrer, således at hvert element fra gruppen er til stede i X-positionen i catamerpræparaterne i tilnærmelsesvis ækvimolære mængder; begge designerede positioner, D<sub>1</sub> og D<sub>2</sub>, har elementer fra den samme monomergruppe; og -NH- repræsenterer terminalamino-gruppen på catameren. 8-Catamerpræparaterne blev syntetiseret på en fast polymerpind eller -stav, hvilket generelt er beskrevet i beskrivelsen til australsk patentansøgning nr. 25429/84, under anvendelse af en BOC-gruppe til beskyttelse af L- $\alpha$ -amino-syrerne under syntesen.

Elementer fra gruppen af almindelige L-amino-syrer blev koblet i X-positionerne på følgende måde:

30 1. En blanding af amino-syrer blev opløst i 102 ml dimethylformamid (DMF). Blandingen bestod af:

	BOC-L-alanin	32 mg
	BOC-methoxybenzyl-L-cystein	100 mg
35	BOC-benzyl-L-asparaginsyre	90 mg
	BOC-benzyl-L-glutaminsyre	96 mg
	BOC-L-phenylalanin	61 mg
	BOC-L-glycin	27 mg
	BOC-tosyl-L-histidin	142 mg

	BOC-L-isoleucin: 1/2 H <sub>2</sub> O	51 mg
	BOC-carbobenzoxy-L-lysin	124 mg
	BOC-L-leucin: H <sub>2</sub> O	55 mg
	BOC-L-methionin	54 mg
5	BOC-L-asparagin	47 mg
	BOC-L-prolin	42 mg
	BOC-L-glutamin	53 mg
	BOC-tosyl-L-arginin: H <sub>2</sub> O	167 mg
	BOC-benzyl-L-serin	76 mg
10	BOC-benzyl-L-threonin	83 mg
	BOC-L-valin	42 mg
	BOC-L-tryptophan	78 mg
	BOC-benzyl-L-tyrosin	116 mg
15	2. En opløsning af 1310 mg 1-hydroxybenzotriazol (HOBT) blev fremstillet i 34 ml DMF.	
	3. En opløsning af 1150 mg N,N'-dicyclohexylcarbodiimid (DCC) blev fremstillet i 34 ml DMF.	
20	4. Før anvendelsen blev HOBT-opløsningen sat til aminosyreopløsningen og blandet. Derefter blev DCC-opløsningen tilsat og blandet. Catameren eller bindingsmolekylet, der allerede var på den faste bærer, blev derefter omsat med den resulterende blanding.	
25	Individuelle L-aminosyrer blev bundet i D <sub>1</sub> og D <sub>2</sub> -positionerne ved fremgangsmåden, der er beskrevet i beskrivelsen til australsk patentansøgning nr. 25429/84. Dette resulterede i syntese af 400 catamerpræparater omfattende alle mulige parringer af de 20 almindelige aminosyrer i D <sub>1</sub> og D <sub>2</sub> -positionerne.	
30	Flerheden af 8-catamerpræparaterne blev afprøvet mod et monoklonalt antistof ved ELISA. Dette monoklonale antistof var fremstillet mod mund- og -klovsvygevirus (FMDV) subtype A <sub>10</sub> under anvendelse af metoder, der er velkendt af fagfolk inden for området. Under udførelse af ELISA-analysen blev bærerbundne peptider inkuberet i en prædekopløsning af 1% ægalbumin/1% okseserumalbumin/ 0,1% Tween-20 i phosphatpufret saltopløsning (PBS) i én time ved 25 <sup>0</sup> C til blokering af ikke-specifik absorption af antistoffer. Inkubering natten over ved 4 <sup>0</sup> C i en passende fortynding af monoklonalt antistof i	
35		

prædækopløsning blev fulgt af 3 vask i 0,05% Tween-20/PBS. Omsætning i én time ved 25°C med antimuse-gede-IgG, der var konjugeret til peberrodsperoxidase og fortyndet i prædækopløsningen, blev igen fulgt af grundig vask med PBS/Tween til fjernelse af overskydende konjugat. Tilstedeværelsen af antistof blev påvist ved omsætning i 45 minutter med en frisk fremstillet enzymsubstratopløsning (40 mg o-phenylendiamin og 18 µl "120 volumen" hydrogenperoxid i 100 ml phosphat/citratpuffer, pH 5,0), og den frembragte farve blev bestemt ved 450 nm.

10

Figur 1 viser resultaterne af afprøvning af 8-catamerpræparaterne med dette antistof. I fig. 1 repræsenterer hver gruppe af 20 linier responset ved en ELISA i absorbansenheder af den udviklede farve ved måling ved 450 nm. Hvert element fra 20 liniegruppen har en almindelig aminosyre i D<sub>1</sub>-positionen, hvilket er angivet med en enkeltbogstavskode umiddelbart under hver gruppe. Hvert element fra en gruppe af 20 linier repræsenterer forskellige aminosyrer i D<sub>2</sub>-positionen - disse er anført i alfabetisk orden ifølge deres enkeltbogstavskode. Resultaterne er opsummeret i tabel 1. (I tabel 1 og i de resterende eksempler vil enkeltbogstavskoden for aminosyrerne blive anvendt).

25

30

35

Tabel 1

Antistofbindingsaktiviteter af 8-catamerpræparatblandingerne  
 Ac-X-X-D<sub>2</sub>-D<sub>1</sub>-X-X-X-X-S<sub>S</sub>

5	Peptidblanding	Ekstinktion E415
10	Ac-X-X-M-H-X-X-X-X-S <sub>S</sub>	0,624
	Ac-X-X-M-K-X-X-X-X-S <sub>S</sub>	0,582
	Ac-X-X-K-K-X-X-X-X-S <sub>S</sub>	0,537
	Ac-X-X-K-H-X-X-X-X-S <sub>S</sub>	0,510
	Ac-X-X-Q-H-X-X-X-X-S <sub>S</sub>	0,488
15	Ac-X-X-H-H-X-X-X-X-S <sub>S</sub>	0,486
	Ac-X-X-Q-N-X-X-X-X-S <sub>S</sub>	0,460
	Ac-X-X-W-M-X-X-X-X-S <sub>S</sub>	0,448
	Ac-X-X-K-N-X-X-X-X-S <sub>S</sub>	0,431
20	Ac-X-X-H-K-X-X-X-X-S <sub>S</sub>	0,417

Gennemsnitlig ekstinktion for de 200 lavere værdier var 0,202.

(Standardafvigelse 0,021).

25 Ac betegner acetyl.

S<sub>S</sub> betegner [fast bærer].

30 Det bemærkes, at antistoffet reagerer stærkt med flere af 8-catamerpræparaterne. I rækkefølge efter reaktionens styrke omfatter disse 8-catamerpræparater, i hvilke de angivne (-D<sub>2</sub>-D<sub>1</sub>-) positioner er: -M-H-, -M-K-, -K-K-, -K-H-, -Q-H- og -H-H-.

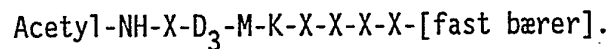
35 To yderligere flerheder af 8-catamerpræparater blev syntetiseret. Disse havde formlerne:

Acetyl-NH-X-D<sub>3</sub>-M-K-X-X-X-X-[fast bærer]  
 og Acetyl-NH-X-X-M-K-D<sub>4</sub>-X-X-X-[fast bærer]

hvor M betegner en methioninrest, K betegner en lysinrest og D<sub>3</sub> og D<sub>4</sub> er de nye designerede positioner for denne serie af synteser; andre betegnelser i formlerne er som de tidligere anvendte.

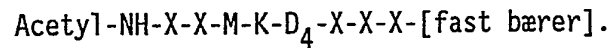
- 5 Disse 8-catamerpræparater blev afprøvet med det monoklonale antistof mod FMDV A<sub>10</sub>. Figureerne 2A og 2B viser resultaterne af ELISA-afprø-  
ning med det monoklonale antistof, der blev anvendt til at frem-  
bringe de resultater, der er vist i fig. 1. Figur 2A repræsenterer  
8-catamerpræparater med den generelle formel:

10



Figur 2B repræsenterer 8-catamerpræparater med den generelle formel:

15



- I begge figurer er aminosyren i -D<sub>3</sub>- eller -D<sub>4</sub>-positionen angivet  
nedenfor hver linie, som repræsenterer absorbansen af den udviklede  
farve ved måling ved 450 nm. Resultaterne er opsummeret i tabel 2.  
20 Antistofbindingsaktiviteterne er vist i forhold til de 8-catamer-  
præparater, der indeholder det bestemte aminosyrepar M-K for alle  
8-catamerpræparater, der giver en værdi større end 1,1. Den fundne  
værdi for det modsatte par K-M er også vist.

25

30

35

Tabel 2

Relativ antistofbindingsaktivitet af 8-catamerpræparater, der indeholder 3 definerede aminosyrer

Aminoterminal udvidelse		Carboxylterminal udvidelse	
Sekvens	Aktivitet	Sekvens	Aktivitet
Ac-X-H-M-K-X-X-X-S <sub>S</sub>	2,54	Ac-X-X-M-K-H-X-X-S <sub>S</sub>	2,85
Ac-X-W-M-K-X-X-X-S <sub>S</sub>	2,50	Ac-X-X-M-K-Q-X-X-X-S <sub>S</sub>	2,20
Ac-X-Q-M-K-X-X-X-S <sub>S</sub>	1,69	Ac-X-X-M-K-W-X-X-X-S <sub>S</sub>	1,97
Ac-X-N-M-K-X-X-X-S <sub>S</sub>	1,27	Ac-X-X-M-K-G-X-X-X-S <sub>S</sub>	1,41
Ac-X-G-M-K-X-X-X-S <sub>S</sub>	1,14	Ac-X-X-M-K-N-X-X-X-S <sub>S</sub>	1,26
Ac-X-C-M-K-X-X-X-S <sub>S</sub>	1,11		
Kontrolsekvenser M-K	1,00 (E <sub>450</sub> = 0,14)		
K-M	0,97		
Prøvebaggrund E <sub>450</sub>	= 0,08		

Det fremgår, at de 8-catamerpræparater, som gav de største reaktioner med det monoklonale antistof, havde følgende sekvenser i de designerede positioner: -H-M-K-, -W-M-K- og -Q-M-K- i fig. 2A og -M-K-H-, -M-K-Q- og -M-K-W- i fig. 2B.

5

Inkorporering af histidin på en hvilken som helst side af det fastlagte M-K par resulterede i den største antistofbindingsaktivitet. Histidin på aminoterminalsiden var dog ikke signifikant bedre end tryptophan, og den definerede sekvens W-M-K-H blev udvalgt til yderligere vurdering.

10

Værdien af at fortsætte med den definerede sekvens W-M-K-H, der var forudsagt at være optimal ved kombineret af de individuelle foretrukne udvidelser til parret M-K, blev afprøvet. Der blev syntetiseret catamerpræparater, der var baseret på stamsekvensen acetyl-NH-X-W-M-K-H-X-X-X-S<sub>S</sub> [fast bærer], og i hvilke alle 19 alternative aminosyrer én af gangen blev substitueret på hver af de fire definerede positioner. Afprøvning af bindingsaktiviteten af disse catamerpræparater med det monoklonale prøvningsantistof (MAB) viste, at Q-M-R-H var den foretrukne sekvens ved udvidelsen (de opnåede E<sub>450</sub> var: Ac-X-W-M-K-H-X-X-X-S<sub>S</sub> = 0,69, Ac-X-Q-M-K-H-X-X-X-S<sub>S</sub> = 1,47 og Ac-X-W-M-R-H-X-X-X-S<sub>S</sub> = 1,11, afprøvningsbaggrunden var 0,2). Præferencen for glutamin i aminoterminalsiden af den definerede sekvens M-K-H i stedet for tryptophan, som det blev bestemt for parret M-K, viser den indbyrdes afhængighed af individuelt bestemte optima.

15

20

25

8-Catamerpræparater med de generelle formler:

30

Acetyl-NH-D<sub>5</sub>-Q-M-R-H-X-X-X-[fast bærer] og  
Acetyl-NH-X-Q-M-R-H-D<sub>6</sub>-X-X-[fast bærer]

35

blev syntetiseret. Præparaterne med de højeste antistofbindingsaktiviteter var dem med D<sub>5</sub> = tryptophan og D<sub>6</sub> = serin, hvilket antyder, at W-Q-M-R-H-S er den optimale sekvens. Ingen signifikant forbedring af antistofbindingsaktivitet blev opnået ved definering af yderligere aminosyrer til nogen af enderne af denne sekvens. Vurdering af gruppen af peptider, der omfatter alle enkelt-aminosyre substitutioner i denne sekvens, der blev syntetiseret som

hexapeptider, bekræftede, at W-Q-M-R-H-S var tæt på det optimale hexapeptid. En vis forøgelse i antistofbindingsaktivitet blev påvist, når glycin erstattede arginin i peptidet, hvilket giver sekvensen W-Q-M-G-H-S.

5

Med henblik på bekræftelse af specificiteten af antistofbindingsreaktionen for den fastlagte gruppe hos beslægtede peptider med prøvnings-MAb blev titeren af prøvnings-MAb for et antal af peptiderne sammenlignet med dem for MAb og for spermacethvalmyoglobin eller hepatitis A (tabel 3). Specificiteten af antistofbindingsreaktionen er tydelig for prøve MAb, der er det til bestemmelse af disse peptiders sekvens anvendte antistof.

10

Tabel 3

15 Specificitet af prøvnings-MAb for W-Q-M-G-H-S-beslægtede peptider

Peptid	Titer		
	Prøve MAb	Anti-hepatitis A	Anti-myoglobin
-----			
Ac-X-X-M-K-X-X-S <sub>s</sub>	2.000	< 200	< 200
Ac-X-W-M-K-X-X-S <sub>s</sub>	14.000	< 200	1.600
Ac-X-X-M-K-H-X-S <sub>s</sub>	17.000	< 200	< 200
Ac-X-W-M-K-H-X-S <sub>s</sub>	36.000	< 200	800
25 Ac-W-Q-M-R-H-S-S <sub>s</sub>	100.000	< 200	< 200
Ac-W-Q-M-G-H-S-S <sub>s</sub>	120.000	< 200	< 200
-----			

20

25

Antistoftitre for hver MAb blev bestemt ved ELISA og svarer til den reciprokke fortynding af ascitesvæske, hvilket giver en ekstinktion på 3 gange prøvningsbaggrunden. Værdierne blev korrigeret for ikke-specifik absorption som bestemt ved omsætning af hver ascitesvæsk fortynding med ikke-beslægtede kontrolpeptider (Ac-G-D-L-G-S-I-S<sub>s</sub> og Ac-G-D-L-Q-V-L-S<sub>s</sub>). De afprøvede monoklonale antistoffer var: prøvnings-MAb, anti-FMDV og type A<sub>10</sub>, som beskrevet i nærværende beskrivelse (titer mod helvirus  $1,3 \times 10^6$ ); anti-hepatitis A, ukendt reaktionssted (titer mod hepatitis A virus  $10^6$ ); og anti-myoglobin (spermacethval), også ukendt reaktionssted (titer mod spermacethvalmyoglobin  $10^6$ ).

30

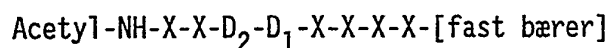
35

Eksempel 2

Eksempel 2 illustrerer opfindelsens anvendelse på et polyklonalt antistof.

5

En yderligere flerhed af 8-catamerer blev syntetiseret med den generelle formel:



10

som beskrevet i eksempel 1. Disse catamerpræparater blev afprøvet mod et antistof, som var blevet fremstillet mod det syntetiske peptid C-G-D-L-G-S-I-A-K. Dette peptid blev fremstillet ved anvendelse af sædvanlige metoder til Merrifield-fastfasepeptidsyntese. Peptidet blev koblet til Keyhole Limpet Haemocyanin gennem sulfhydrylgruppen af cysteindelen. Det koblede peptid blev formuleret med Freund's ukomplette adjuvans og indsprøjtet i en kanin via den intramuskulære bane. Antiserum blev opnået ved at tappe blod fra kaninen 40 dage efter indsprøjtningen.

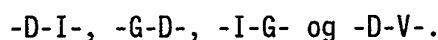
15

20

Resultaterne af ELISA ved afprøvning af flerheden af 8-catamerpræparater med antistoffet er vist i fig. 3 på samme måde som i fig. 1. Det fremgår, at alle 8-catamerpræparater, som havde E (glutaminsyre) i D<sub>1</sub>-positionen, reagerede signifikant med antistoffet. Andre kombinationer, som reagerede signifikant med antistoffet, omfatter i

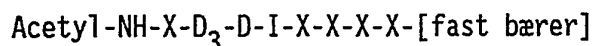
25

aftagende rækkefølge:

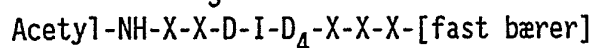


30

Som beskrevet i eksempel 1 ovenfor, syntetiseredes yderligere flerheder af 8-catamerpræparater med formlerne:



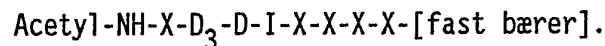
og



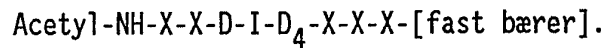
35

hvor D betegner asparaginsyre og I betegner isoleucin. Resultaterne fra afprøvning med antistoffet er vist i fig. 4 på samme måde som i fig. 2.

Figur 4A repræsenterer 8-catamerpræparater med den generelle formel:



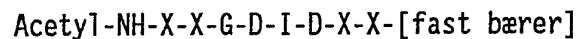
5 Figur 4B repræsenterer 8-catamerpræparater med den generelle formel:



10 Figur 4 viser, at 8-catamerpræparater, som reagerer med antistof, omfatter følgende sekvenser i de designerede positioner: -G-D-I-, -A-D-I-, -P-D-I-, -D-I-D-, -D-I-M- og -D-I-T. Det ses tydeligt ved sammenligning af fig. 4A med fig. 4B, at positionen umiddelbart før -D-I-parret tillader meget mindre spillerum for tilladelige aminosyrer end positionen umiddelbart efter -D-I-parret.

15

Der blev syntetiseret 8-catamerpræparater, som var baseret på stamsekvensen:



20

og i hvilke alle 19 alternative aminosyrer én af gangen blev substitueret i hver af de fire definerede positioner i catamerpræparatet. Afprøvning af bindingsaktiviteten af dette præparatsæt med prøvningsantistoffet viste, at for at bevare evnen til at reagere med dette antistof, kunne glycinresten kun erstattes med alanin, at den aminoterminale asparaginsyre ikke kunne erstattes af nogen aminosyre, at isoleucin kunne erstattes med valin, leucin eller threonin eller med ca. 10 andre aminosyrer under reduktion af bindingsaktiviteten, og at den carboxylterminale asparaginsyre kunne 25 erstattes med faktisk en hvilken som helst aminosyre, idet serin i denne position giver den stærkeste binding. Afprøvningen viste at den definerede sekvens G-D-I-S var den foretrukne til forlængelse.

30

35 Ved forlængelse af den ovenfor fastlagte sekvens blev der påvist præference for inkorporering af tryptophan i den aminoterminale ende og for histidin i den carboxylterminale ende. Ingen af forlængelserne frembragte dog en særlig markant forøgelse af antistofbindingsaktiviteten.

Yderligere forlængelse af den foretrukne fastlagte sekvens W-G-D-I-S-H viste, at der var en lille fordel ved en yderligere sekvensforlængelse.

5 Det bemærkes, at den til dette særlige antistof bestemte mimotop, dvs. W-G-D-I-S-H, kun har en flygtig lighed med det peptid, der blev anvendt til inducering af antistoffet, nemlig C-G-D-L-G-S-I-A-K. Afprøvning af antistoffet i et udskiftningsmønster baseret på den immunogene sekvens G-D-L-G-S-I viste dog en tydelig præference for  
10 sekvensen G-D-L-G-D-I- snarere end for den inducerende sekvens G-D-L-G-S-I (  $E_{450}$ -værdier på 0,45 henholdsvis 0,16). Der er lighed mellem den bestemte mimotop og et foretrukket bindingspeptid til antistoffet. Dette er et vægtigt bevis for den brede anvendelighed af fremgangsmåden.

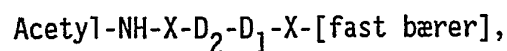
15

### Eksempel 3

Eksempel 3 illustrerer, at længden af flerheden af catamerer kan være kortere end 8-catamerer.

20

En flerhed af 4-catamerpræparater blev syntetiseret med den generelle formel:

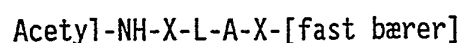


25

hvor forkortelserne anvendes som i eksempel 1. Syntesefremgangsmåden var identisk med den, der anvendtes i eksempel 1. De blev afprøvet mod et monoklonalt antistof, som var blevet frembragt mod spermacehvalmyoglobin under anvendelse af metoder, der er velkendt for  
30 fagfolk inden for området.

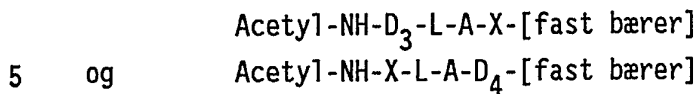
Resultaterne af ELISA ved afprøvning af flerheden af 4-catamerpræparaterne med antistoffet er vist i fig. 5 på samme måde som i fig. 1. Det fremgår, at kun catamerpræparater med formlen

35



var i stand til at reagere med det monoklonale antistof.

Som beskrevet i eksempel 1 ovenfor blev der syntetiseret yderligere flerheder af 4-catamerpræparater med formlerne:



Tabel 4 opsummerer de catamerpræparater, der ved afprøvning i et ELISA-system med det monoklonale antistof, var mest reaktive.

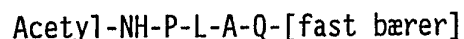
10

Tabel 4

Relative antistofbindingsaktiviteter af 4-catamerpræparater, der indeholder 3 definerede aminosyrer

<u>Aminoterminalforlængelse</u>		<u>Carboxylterminalforlængelse</u>	
15    Sekvens	Aktivitet	Sekvens	Aktivitet
Ac-P-L-A-X-S <sub>S</sub>	1,80	Ac-X-L-A-Q-S <sub>S</sub>	1,73
Ac-A-L-A-X-S <sub>S</sub>	1,36	Ac-X-L-A-R-S <sub>S</sub>	1,58
Ac-F-L-A-X-S <sub>S</sub>	1,33	Ac-X-L-A-S-S <sub>S</sub>	1,39
20    Kontrolsekvenser	Ac-X-L-A-X-S <sub>S</sub>	1,00 (E <sub>450</sub> = 0,17)	
	Ac-X-A-L-X-S <sub>S</sub>	0,94	

25    Catamerpræparater, der var baseret på stamsekvensen:



30    blev syntetiseret til dannelse af et udskiftningsmønster, som beskrevet i eksempel 2. Figur 6 viser resultaterne ved afprøvning af disse peptider i en ELISA med det monoklonale antistof. Hver gruppe af tyve linier i fig. 6 repræsenterer responset i procent, når der sammenlignes med gennemsnittet af stamresponset (E<sub>450</sub> = 2,62 med en baggrund på 0,25). Hvert element i en tyve linie-gruppe har fået den

35    aminosyre, der er angivet nedenfor, substitueret med en anden aminosyre. Rækkefølgen af linierne er den alfabetiske orden for aminosyrens enkelt-bogstavskode. Den kraftigere linie i hver gruppe af tyve angiver stamsekvensen P-L-A-Q. Det ses tydeligt, at for at catamerpræparatet skal være i stand til at kunne binde sig til dette

monoklonale antistof med mindst halvdelen af aktiviteten af stamsekvensen, kan prolin erstattes med valin, isoleucin, leucin, alanin eller serin; leucin kan kun erstattes af phenylalanin; alanin kan frit erstattes af faktisk en hvilken som helst anden aminosyre; og  
 5 glutaminresten kan kun erstattes af asparagin.

Under anvendelse af de fremgangsmåder, der er beskrevet i forbindelse med designerede positioner i eksempel 1, blev der syntetiseret et sæt af alle de for spermacethvalmyoglobinsekvensen overlappende  
 10 4-catamerer. Disse catamerer blev omsat ved en ELISA med det monoklonale antistof. Resultaterne er vist i fig. 7. Hver linie repræsenterer farveudviklingen ved en ELISA aflæst ved 450 nm. Hver linie er nummereret således, at resten i aminoterminalenden af den særlige catamer havde samme nummer som i spermacethvalmyoglobinsekvensen.  
 15

Det ses tydeligt, at den eneste 4-catamer, der reagerer med det monoklonale antistof, er den, der omfatter rest 88 til 91 af spermacethvalmyoglobinsekvensen. Denne sekvens er P-L-A-Q. Det monoklonale  
 20 antistof genkender tydeligt denne særlige determinant på spermacethvalmyoglobin.

Et sæt af 5-catamerer med de generelle formler:

25 Acetyl-NH-D<sub>5</sub>-P-L-A-Q-[fast bærer]  
 og Acetyl-NH-P-L-A-Q-D<sub>6</sub>-[fast bærer]

blev syntetiseret til bestemmelse af den bedste forlængelse af den definerede sekvens. De bedste bindingspræparater var

30 Acetyl-NH-K-P-L-A-Q-[fast bærer]  
 og Acetyl-NH-P-L-A-Q-Y-[fast bærer].

Det bør bemærkes, at sekvensen K-P-L-A-Q er homolog med spermacethvalmyoglobinsekvensen ved resterne 87 til 91. Dette eksempel  
 35 illustrerer igen anvendeligheden af den foreliggende fremgangsmåde.

## P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til påvisning eller bestemmelse af en sekvens af monomerer, der er topologisk ækvivalent med den epitop, der er  
5 komplementær til en særlig paratop på et antistof, som er af interesse, k e n d e t e g n e t ved,

1) at der syntetiseres en flerhed af catamerpræparater, som hver består af en flerhed af catamerer, hvorhos hver catamer udgøres  
10 af elementer fra en defineret gruppe af monomerer, og hvor:

i) sammensætningen i hver catamer er kendt og konstant i to eller flere positioner for hver catamer i catamerpræparatet, og

15 ii) sammensætningen i hver af de øvrige positioner i hver catamer udgøres af tilfældigt indførte elementer fra den definerede gruppe af monomerer, hvorhos flerheden af catamerpræparater omfatter præparater, hvori sammensætningen i de udpegede positioner varieres systematisk med hensyn til fore-  
20 komst af elementer fra den definerede gruppe af monomerer,

2) at hvert catamerpræparat fra denne flerhed af catamerpræparater bringes i kontakt med det antistof, som er af interesse,

25 3) at forekomst eller fravær af binding mellem hvert catamerpræparat i denne flerhed af catamerpræparater og det omhandlede antistof påvises eller bestemmes,

30 4) at der ud fra den kendte sammensætning i de to eller flere udpegede positioner i hver af de catamerpræparater, som udviser binding til det omhandlede antistof, bestemmes en delsekvens af monomerer, der er topologisk ækvivalent med en epitop, som er komplementær til en speciel paratop i det foreliggende anti-  
stof,

35 5) at der syntetiseres en yderligere flerhed af catamerpræparater, i hvilke hver catamer i initielt udpegede positioner omfatter den under ovenstående punkt 4 bestemte delsekvenssammensætning og mindst én yderligere position som en udpeget position,

hvorefter

6) ovenstående trin 2, 3 og 4 gentages for denne yderligere flerhed af catamerpræparater.

5

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at hver flerhed af catamerpræparater fremstilles ud fra gruppen af  $\alpha$ -aminosyrer.

10 3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at hver flerhed af catamerpræparater består af en flerhed af 4- til 8-catamerer.

15 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at hver flerhed af catamerer syntetiseres på en fast bærer og har den generelle formel:

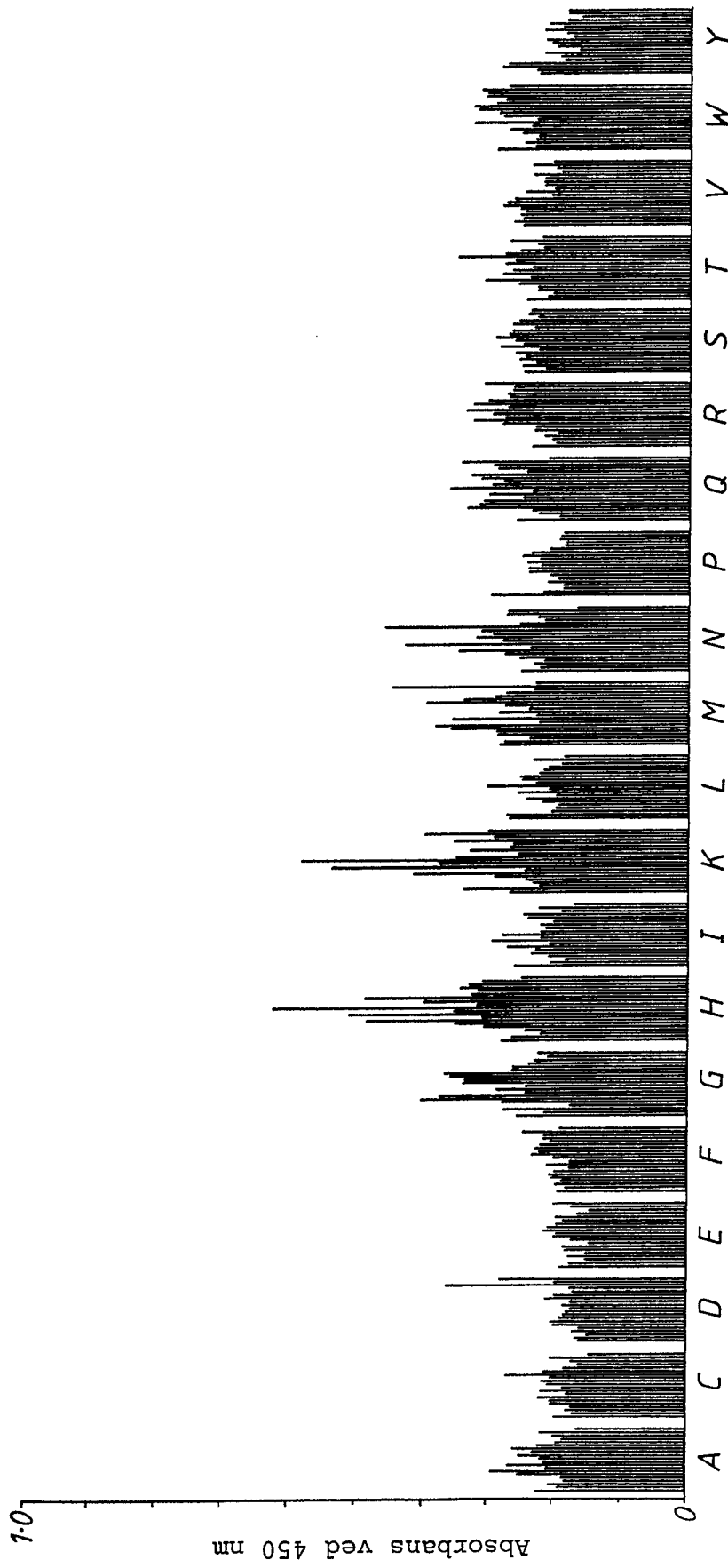
20 eller 
$$\begin{aligned} & Y-X-X-D_2-D_1-X-X-X-X\text{-[fast bærer]}, \\ & Y-X-X-D_2-X-D_1-X-X-X\text{-[fast bærer]} \\ & Y-X-D_2-X-X-D_1-X-X-X\text{-[fast bærer]}. \end{aligned}$$

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at hver flerhed af catamerer har den generelle formel:

25 
$$\text{Acetyl-NH-X-X-D}_2\text{-D}_1\text{-X-X-X-X-[fast bærer]}$$

30 hvor X betegner et element fra gruppen af L- $\alpha$ -aminosyrer, og at denne flerhed af catamerer er en sådan, at hvert element fra gruppen er til stede i X-positionen i tilnærmelsesvis ækvimolære mængder, og at D<sub>1</sub> og D<sub>2</sub> er udvalgte elementer fra gruppen af L- $\alpha$ -aminosyrer.

35



*FIG. 1.*

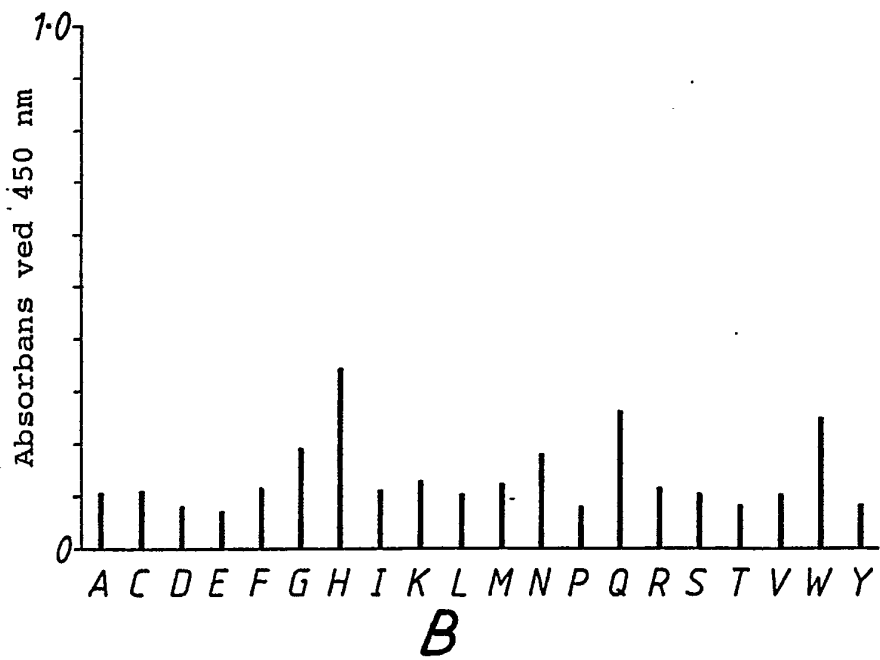
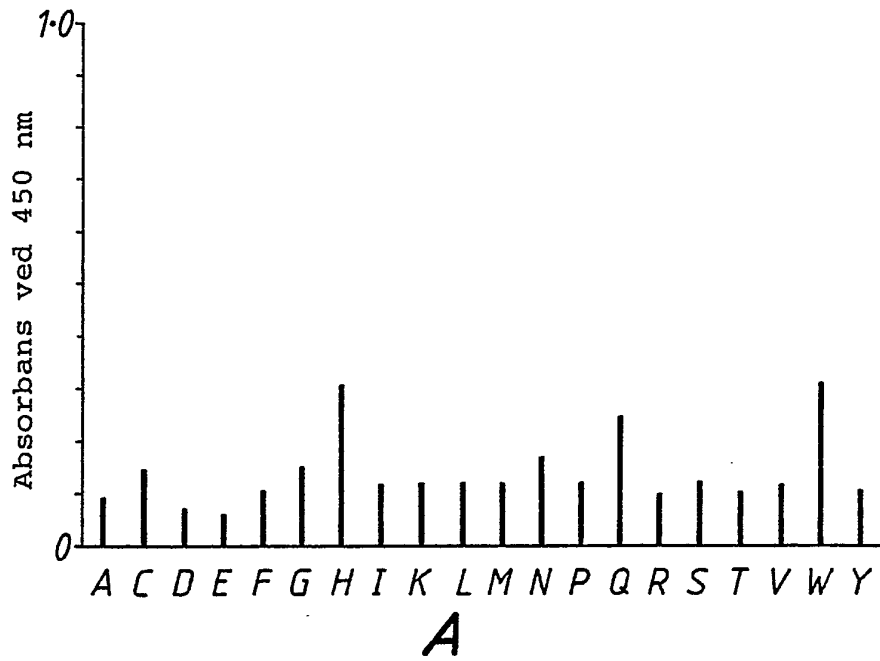


FIG. 2.



FIG. 3.

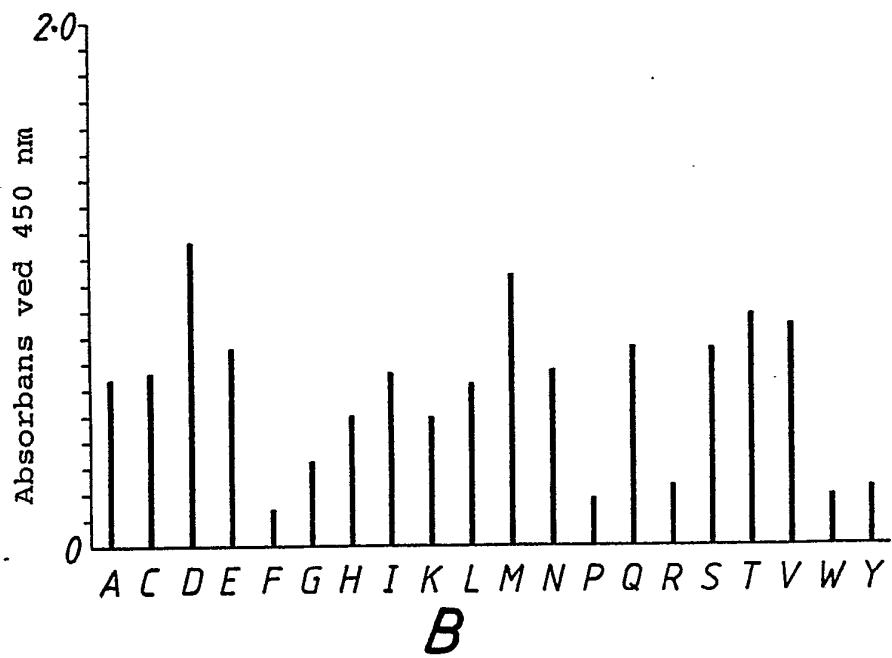
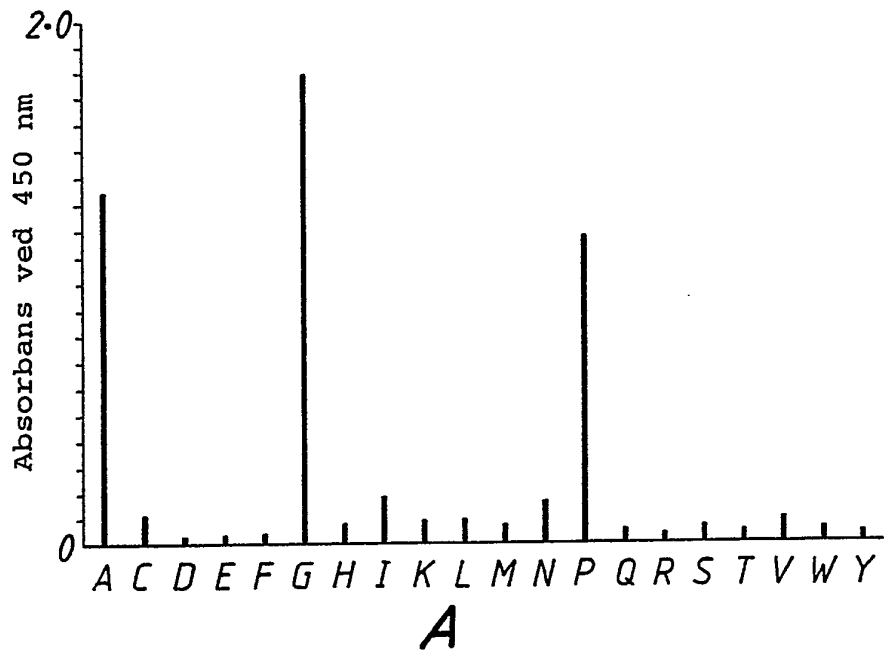
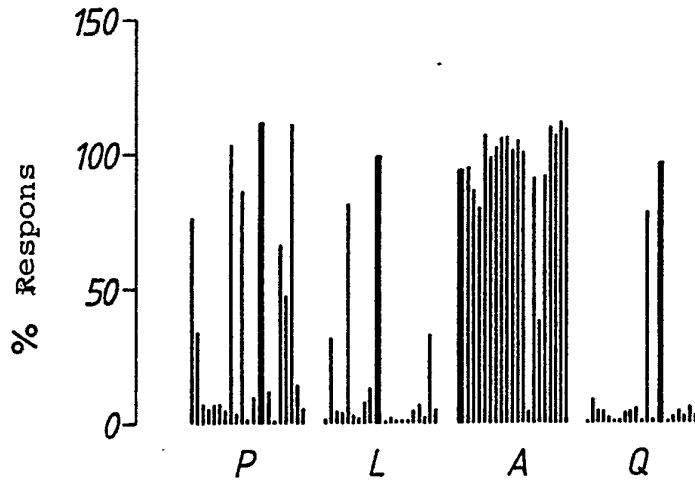


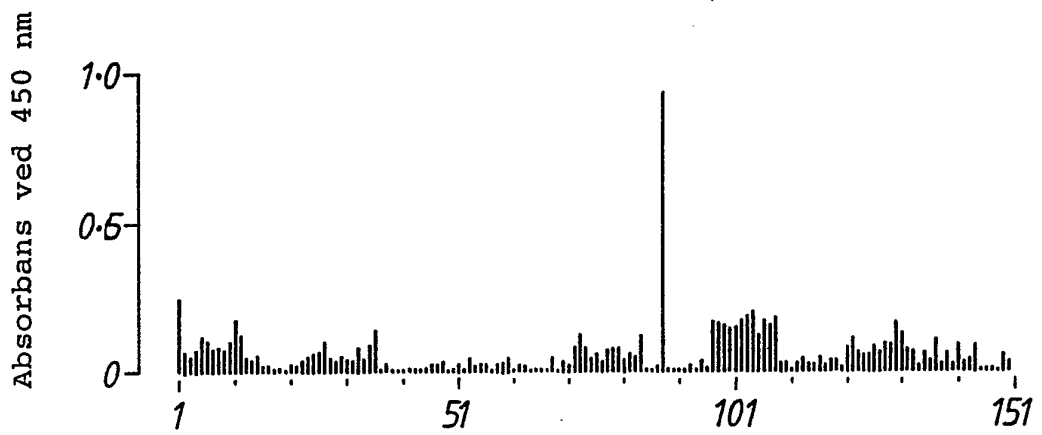
FIG. 4.



FIG. 5.



*FIG. 6.*



*FIG. 7.*