



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **174183**

(13) B

(51) Int Cl⁵ A 61 K 39/385, 37/38, C 07 K 7/10

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	875053	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	03.12.87	søknadsnummer	
(24) Løpedag	30.10.84	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	30.10.84	(30) Prioritet	04.03.83, US, 472190
(44) Utlegningsdato	20.12.93		
(62) Avdelt fra 844318			

(71) Patentsøker	The Ohio State University, 190 North Oval Mall, Columbus, OH 43210, US
(72) Oppfinner	Vernon Cecil Stevens, Dublin, OH, US
(74) Fullmektig	Jan Helgerud, Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** Fremgangsmåte for fremstilling av et modifisert antigen

(56) **Anførte publikasjoner** US 4201770, 4384995, 4302386.

(57) **Sammendrag** Modifisert antigen for bruk ved fertilitetskontroll av dyr, som karakteriseres ved at den omfatter et zona pellucida eller spermantigen, eller et peptid med en sekvens som tilsvarer minst en del av sekvensen av et slikt zona pellucida eller spermantigen, hvilket antigen eller peptid er kjemisk modifisert utenfor dyrets kropp ved enten kobling av minst et av antigenene eller peptidene til en bærer, eller kobling av et antall av peptidene til hverandre, idet det modifiserte antigen etter administrering til dyrets legeme har en større kapasitet til å fremtvinge dannelsen av antistoffer enn zona pellucida eller spermantigenet før den kjemiske modifisering.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av et modifisert antigen for bruk ved fertilitetskontroll av dyr.

5 I GB-PS 1.567.764 og US-PS 4.302.386 er det beskrevet at hormoner eller andre proteiner som finnes naturlig i et dyr kjemisk kan modifiseres utenfor dyrets kropp (et uttrykk som her benyttes for å inkludere mennesker) slik at det, ved injisering i dyr, av de modifiserte hormoner eller andre
10 proteiner fremtvinges dannelsen av antistoffer som reagerer ikke bare med det kjemisk modifiserte hormon eller annet protein, men også med det ikke modifiserte hormon eller protein som finnes naturlig i dyret, for derved å redusere nivået av naturlig hormon eller annet protein i dyrets
15 kropp. I stedet for å bruke hele hormonet eller et annet protein beskriver de ovenfor nevnte patenter også bruken av naturlige eller syntetiske fragmenter av slike proteiner i denne såkalte "isoimmuniserings"-teknikk.

20 De ovenfor nevnte patenter angår hovedsakelig anvendelse av deres isoimmuniseringsteknikk ved fertilitetskontroll slik at proteinet som modifiseres er et reproduktivt hormon som follikelstimulerende hormon FSH, leutiniserende hormon LH, humanplasental laktogen HPL, humanprolaktin HP og humankor-
25 rioniske gonadotropin HCG, eller et peptid med en aminosyresekvens som tilsvarer endel av disse hormoner. Imidlertid beskriver de ovenfor nevnte patenter også anvendeligheten av isoimmuniseringsteknikken på andre proteinhormoner, for eksempel:

30

1. Gastrin for behandling av Zollinger-Ellison syndromet;
2. Angiotensin II for behandling av hypertensjon;
3. Veksthormon og somatomedin for behandling av
35 diabetes og dermed forbundne mikro- og makro-
vaskulære sykdommer;
4. Paratyroidhormon for behandling av nyresten;

5. Insulin og glukagon for behandling av hyperinsulinon;
6. Tyroidstimulerende hormon for behandling av hypertyroidisme;
- 5 7. Sekretin for behandling av tarmirritasjonsyndrom.

De ovenfor nevnte patenter beskriver også anvendelsen av modifiserte polypeptider avledet fra kordionisk gonadotropin, LH eller FSH, eller et fragment derav, for bruk ved
10 behandling av visse karsinomer.

Hovedteknikken ved den kjemiske modifisering som er beskrevet i de ovenfor angitte patenter er kobling av hormonet, et
15 annet protein eller fragment derav, til et stort "bærer"-molekyl som difteritoksoid, tetanus toksoid eller et syntetisk polymer; disse bærermolekyler er ikke endogene til dyret som skal behandles. De ovenfor nevnte patenter beskriver også polymerisering av hormonet, annet protein
20 eller fragment derav, ved reaksjon med en bifunksjonell organisk reagens (for eksempel en bifunksjonell imidoester som dimetyladiimidat, dimetylsuperimidat eller diethylmalonimidat) eller dimerisering ved oksydasjon av en tiolgruppe for å danne en disulfidbro. Alle disse typer kjemiske
25 modifikasjoner har mangler. Dimerisering av hormon, annet protein eller fragment via en disulfidbro innfører ikke eksogent materiale i dyret som skal behandles men, fordi det kjemisk modifiserte antigen som inngis til dyret kun er en dimer av et hormon, annet protein eller fragment derav, som
30 i seg selv ikke er immunogent mot dyret, er slike dimere sjeldent vellykkede for å frembringe brukbare nivåer av antistoffer. De modifiserte polypeptider som fremstilles ved bruk av bærere inneholder en meget høy andel ikke-endogent materiale og vil vanligvis fremtvinge dannelsen av vesentlige
35 mengder antistoffer mot bæreren såvel som mot hormonet, annet protein eller fragmenter derav. Selv om dannelsen av antistoffer mot bæreren noen ganger kan være brukbar, for

eksempel har en vaksine basert på et HCG-fragment koblet til difteritoksoid og ment for fertilitetskontroll den tilfeldige fordel at det også oppstår beskyttelse mot difteri, er det mange anledninger der det ikke er ønskelig å fremtvinge dannelsen av relativt store mengder antistoffer mot bæreren, hvis man for eksempel ønsker å benytte en vaksine inneholdende et modifisert polypeptid for å behandle en pasient med et karsinom eller en alvorlig viral infeksjon, kan det være ønskelig å unngå overbelastning av pasientens immunsystem ved å utfordre det ikke bare med hormonet, annet protein eller fragment derav mot hvilke antistoffene er ønsket, men også med bæreren.

I teorien er den kanskje mest lovende av de modifiserings-teknikker som er beskrevet i de ovenfor nevnte patenter, polymerisering av hormonet, annet protein eller fragment derav, ved omsetning med en bifunksjonell reagens. Denne teknikk har i teorien fordelene av å innføre en relativt liten andel ikke-endogent materiale i det dyr som skal behandles (og sogar denne relativt lille andel ikke-endogent materiale kan velges slik at det ikke er sterkt immunogent) mens man allikevel tilveiebringer et modifisert polypeptid stort nok til å være sterkt immunogent. Uheldigvis har forsøk vist at direkte anvendelse av den bifunksjonelle organiske reagenspolymeriseringsteknikk på de fleste hormoner, andre proteiner eller fragmenter derav av praktisk interesse, gir meget kompliserte blandinger av modifiserte polypeptider tilsvarende kompliserte immunogene egenskaper. Videre er de immunogene egenskaper for de polymeriserte polypeptider som således fremstilles ikke lett reproduserbare, men en slik reproduserbarhet er vesentlig i ethvert materiale som er ment for farmasøytisk bruk, fordi de nødvendige sikkerhetsprøver og effektivitetsprøver ikke kan gjennomføres på et ikke-reprodusert materiale.

Det er nu funnet (selv om denne kunnskap ikke er nedfelt i den publiserte litteratur) at grunnen til de meget kompli-

serte immunogene egenskaper og mangelen på reproduserbarhet som er tilstede i polymerer fremstilt ved bifunksjonell organisk reagens polymeriseringsteknikk er, uansett bruken av et bifunksjonelt reagens, utstrakt fornetning av hormonet, 5 annet protein eller fragment derav, idet slik fornetning sannsynligvis skyldes nærværet av frie amino-, tiol-, karboksyl- og eventuelt andre grupper (de nøyaktige grupper som er involvert avhenger selvfølgelig av hvilke grupper den bifunksjonelle organiske reagens er tilsiktet å reagere med) 10 på ikke-terminale posisjoner i hormonet, proteinet eller fragmentet derav. Slik fornetning gir forgrening og tredimensjonal struktur i de resulterende polymerer. Ikke bare gjør den relativt tilfeldige fornetning som således oppstår strukturen i polymeren selv uforutsigelig og ikke reproduserbar, men slik fornetning kan også endre den tertiære 15 struktur og form på hormonene, annet protein eller fragment derav som polymeriseres, noe som således påvirker de immunogene egenskaper.

I henhold til dette har søkeren konkludert med at for å 20 fremstille brukbart modifiserte polypeptider ved bifunksjonelle organisk reagenspolymeriseringsteknikk er det vesentlig å arbeide på en slik måte at kobling av polypeptidfragmentene som skal polymeriseres intrer kun ved eller 25 nær endene av fragmentene for således å gi en virkelig linear polymer i det vesentlige fri for ikke-lineære polymerer av fragmentene.

Det er også funnet at isoimmuniseringsteknikken som er 30 beskrevet i ovenfor nevnte patent med hell kan utvides til proteiner som hverken er endogene eller vesentlige immunogene overfor de som skal behandles. Til slutt er det funnet at modifiserte antigener for bruk i fertilitetskontroll kan fremstilles ved kjemisk modifisering av zona pellucida eller 35 spermantigener.

I henhold til dette angår foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av et modifisert antigen for bruk ved fertilitetskontroll av dyr, omfattende et zona pellucida eller spermantigen, eller et peptid med en sekvens som tilsvarer minst en del av sekvensen av et slikt zona pellucida eller spermantigen, hvilket antigen eller peptid er kjemisk modifisert utenfor dyrets kropp ved enten kobling av minst et av antigenene eller peptidene til en bærer, eller kobling av et antall av peptidene til hverandre under dannelse av et lineært peptid, idet det modifiserte antigen etter administrering til dyrets legeme har en større kapasitet til å fremtvinge dannelse av antistoffer enn zona pellucida eller spermantigenet før den kjemiske modifisering, og fremgangsmåten karakteriseres ved det som fremgår av kravets kjennetegnende del.

Som allerede nevnt omfatter de lineære polymere modifiserte polypeptider inerte polymerer av polypeptidfragmenter i det vesentlige frie for ikke-lineære polymerer. Ved å si at polypeptidfragmentene som benyttes i det lineære polymeriske polypeptid har en molekylstruktur tilsvarende et fragment av proteinet mot hvilke antistoffer skal provoseres, menes ikke nødvendigvis at hele aminosyresekvensen for hvert fragment nøyaktig må tilsvare en del av proteinet mot hvilke antistoffer skal fremtvinges, for eksempel kan i visse tilfeller visse erstatninger av aminosyrer være mulige uten å påvirke den immunogene karakter av fragmentet.

For eksempel beskriver det ovenfor nevnte US-PS 4.302.386 et polypeptid kalt struktur IV som antas avledet fra β -underenheten av HCG men hvori cysteinresten i 110-posisjon er ersatt med α -aminosmørsyre. Spesielt må, når det er ønskelig å provosere dannelse av antistoffer mot et endogent protein, polypeptidfragmentene som benyttes for å danne det riktige modifiserte polypeptid, ha en molekylstruktur tilsvarende et fragment av det endogenprotein hvis antistoffer skal dannes, dette utelukker

imidlertid ikke muligheten for at slike fragmenter virkelig kan avledes fra et protein av en annen type fordi mange proteiner enten er identiske mellom arter eller skiller seg fra hverandre så lite når det gjelder aminosyresekvensen at en betydelig tverreaktivitet foreligger mellom antistoffer til de tilsvarende proteiner i de to arter. Som nevnt nedenfor vil for eksempel zona pellucid-enzymet fra svin når de injiseres i mennesker produsere antistoffer som viser betydelig aktivitet mot humanzona-antigener. Hvis man for eksempel i henhold til dette ønsker å danne et modifisert polypeptid for å provosere dannelsen av antistoffer i mennesker mot zona pellucida-antigener, kan egnede polypeptidfragmenter fremstilles fra zona pellucida-antigener fra svin. Videre kan fragmentene som benyttes i de lineære polymere polypeptider inkorporere frekvenser av aminosyre uten motpart i sekvensen av protein hvorfra fragmentet avledes. Videre beskriver for eksempel det tidligere nevnte US-PS 4.302.386 visse polypeptidfragmenter angitt struktur (IV), (VIII), (IX), (X) og (XIV) som alle avledes fra β -underenheten av HCG men som innarbeider avstandssekvenser omfattende flere prolinrester.

Det kan først synes overraskende at en lineær polymer av et polypeptid hvis monomere form effektivt er ikke-immunogen for et dyr, kan immunogeniseres overfor det samme dyr. Uten å ønske å være bundet av teorien antas det at økningen i immunogeniteten ved polymerisering skyldes økning av den fysikalske størrelse av molekylene, noe som muliggjør at disse gjenkjennes lettere av dyrets immunsystem. Det kan vises at minst noen monomere polypeptider er meget svakt immunogene og forårsaker at dyrets immunsystem produserer påvisbare mengder antistoffer, hvilke mengder imidlertid er alltfør små til å være effektive. Immunsystemet er ikke veltilpasset til å erkjenne molekyler så som de små polypeptider når polypeptidene er tilstede i ikke-polymerform.

Det vil være klart for fagmannen at polypeptidfragmentene som benyttes i de lineære polymere polypeptider enten kan være naturlige (det vil si avledet fra naturlige proteiner) eller kan fremstilles syntetisk. Åpenbart vil et syntetisk polypeptid virke på samme måte som et naturlig opptredende idet immunsystemet hos dyret hvortil det modifiserte polypeptidet inngis, vil reagere på nøyaktig samme måte overfor begge. Videre kan fragmentene i hver lineær polymer være like eller forskjellige og behøver ikke nødvendigvis avledes fra det samme protein.

De lineære polymere polypeptider som fremstilles ifølge oppfinnelsen kan benyttes for å provosere dannelse av antistoffer til både endogene og ikke-endogene proteiner ved å benytte egnede polypeptidfragmenter for å danne polymerene. (Uttrykket "endogen" benyttes her for å angi et protein som er naturlig til arten som behandles, uansett hvorvidt antigenet er endogent til det spesielle individuelle dyr som behandles). Således er for eksempel for foreliggende formål et svinespermaantigen ansett å være endogent til en purke selv om åpenbart et slikt spermaantigen vanligvis vil være tilstede i et purkes legeme. Ytterligere detaljer for bruken av ikke-endogene proteinfragmenter og hvilke som kan benyttes i lineære polymere polypeptider er gitt nedenfor i forbindelse med diskusjonen av oppfinnelsens antigener. Hva angår endogene proteiner, fragmenter av hvilke kan benyttes for å danne de lineære polymere polypeptider, kan det generelt angis at slike endogene proteiner kan inkludere hvilke som helst av de proteiner som er nevnt i det tidligere angitte US-PS 4.302.386. Videre skal det påpekes at bruken av de lineære polymere peptider basert på veksthormon og/eller somatomedian ikke er bekreftet på diabetespasienter. Således kan de lineære polymere polypeptider basert på disse to hormoner benyttes for å behandle ikke-diabetiske pasienter slik som personer som lider under akromegali, som har utstrakt nivåer av veksthormon- og/eller somatomedian.

Spesielt foretrukne lineære polymere polypeptider er de som dannes fra fragmenter med en molekylstruktur tilsvarende et fragment av humankorridorisk gonadotropin og spesielt tilsvarende et fragment av β -underenheten derav. To spesielt foretrukne fragmenter for bruk i de lineære polymere polypeptider ifølge oppfinnelsen er:

Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-Cys (herefter kalt fragment A); og
Asp-His-Pro-Leu-Thr-Cys-Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gyl-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-Cys.

Andre HCG-avlede fragmenter som kan benyttes i de lineære polymerpolypeptider inkluderer de med strukturen II-VIII, VIIIa og IX-XIV som angitt nedenfor, idet ytterligere detaljer hva angår den immunologiske art av disse fragmenter er gitt i det ovenfor angitte US-PS 4.302.386:

Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro--Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln

Struktur II

Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln

Struktur III

Cys-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln

Struktur IV

Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-Asp-Ser-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys

Struktur V

Phe-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-

Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-
Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln

Struktur VI

Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-
Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser

Struktur VII

Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-Asp-Ser-Pro-Pro-Pro-Cys-
Pro-Pro-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln

Struktur VIII

Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-Asp-Ser-Pro-Pro-Pro-Pro-
Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Ser-Asp-Thr-
Pro-Ile-Leu-Pro-Gln

Struktur VIIIa

Asp-His-Pro-Leu-Thr-Aba-Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-
Asp-Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-
Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-
Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys

Struktur IX

Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-
Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-
Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-
Pro-Pro-Pro-Pro-Cys

Struktur X

Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-
Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-
Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-Cys

Struktur XI

Thr-Cys-Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser
Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser
Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro
Gln

Struktur XII

Asp-His-Pro-Leu-Thr-Aba-Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-
Asp-Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-
Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-Cys

Struktur XIII

Cys-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-

Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-
Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln

Struktur XIV

5 Åpenbart vil det, hvis det er ønskelig å benytte et av de
ovenfor angitte peptider som mangler et C-terminalcystein
som et andre eller senere fragment ved oppfinnelsens
fremstilling av lineære polymere peptider, være nødvendig å
10 tilsette et C-terminalcystein til peptidet; egnede metoder
for å gjøre dette er selvfølgelig velkjente for fagfolk på
polypeptidsynteseområdet. Videre vil noen av de ovenfor
angitte peptider selvfølgelig kreve blokkering av ikke-
terminale amino- og/eller tiogrupper før bruk.

15 De lineære polymere polypeptider basert på HCG-avledede
fragmenter er brukbare på nøyaktig samme måte som de
tilsvarende modifiserte polypeptider der de samme fragmenter
er koblet til bærere slik som beskrevet i det nevnte US-PS
4.320.386. Etter dette patents tid har ytterligere opp-
20 dagelser kommet angående forbindelsene mellom HCG og
immunologisk tilsvarende stoffer og visse karcinomer. Det
synes (selv om oppfinnelsen ikke er begrenset av denne
antagelse) at visse karcionomer eksuderer korionisk gona-
dotropin eller et immunologisk tilsvarende materiale på
25 overflaten og presenterer derfor en overflate til immunsy-
stemet hos vertsdyret som overfladisk synes å være dannet av
et materiale som er endogent til vertsdyret og som således er
relativt ikke-immunologent. På grunn av denne kjente
forbindelse mellom visse karcinomer og korionisk gona-
30 dotropin eller korionisk gonadotropinlignende stoffer, er
de HCG-avledede lineære polymere polypeptider brukbare for
behandling av HCG og korionisk gonadotropinforbundne
karcinomer. De samme lineære polymere polypeptider er også
selvfølgelig brukbare for ferilitetskontrollen slik som
35 beskrevet i det tidligere nevnte US-patent.

Fragmentene som benyttes i de lineære polymere polypeptider kan også inkludere fragmenter av zona pellucida og spermatigener som diskutert i detalj nedenfor.

5 Som allerede nevnt fremstilles de lineære polymere peptider polymerisering av fragmenter av proteinet til hvilket antistoffene skal provoseres heller enn hele proteinet selv. Denne bruk av fragmenter i stedet for et helt protein har viktige fordeler (og tilsvarende fordeler sikres ved bruk
10 av fragmenter i antigenene og modifiserte antigener som fremstilles ifølge oppfinnelsen som diskutert i detalj nedenfor). Det er velkjent av fagmannen på det immunologiske område (se for eksempel W.R.Jones, "Immunological Fertility Regulation", s. 11 og følgende) at en av de største
15 potensielle risiki ved en vaksine, spesielt en kontraseptiv vaksine, er tverrreaktivitet med ikke-målte antigener, noe som gir det som i det vesentlige er en kunstig induert autoimmun sykdom istand til å forårsake immunopatologiske skader i, og/eller tap av funksjon av vevet som bærer de
20 tverrreaktive stoffer.

To mulige mekanismer for slik tverr-reaktivitet er:

- (a) nærværet av delte antigeniske determinanter; et komplekst protein kan inneholde komponenter
25 (aminosyresekvenser) som er identiske med de som er tilstede i ikke-mål antigen;
- (b) sterisk overlapping mellom ikke-identiske men strukturelt beslektede deler av proteinet og ikke-mål antigenet.

30 Åpenbart kan de endringer som gis av begge disse tverr-reaktivitetsmodeller reduseres ved i de lineære polymere polypeptider å benytte antigener og modifiserte antigener ifølge oppfinnelsen, et fragment av et komplekst protein i
35 stedet for hele proteinet. Fordi fragmentet har et enklere sekvens eller proteinet hvorfra det er avledet er det mindre sjanse for delte antigeniske determinanter eller sterisk

overlapping med ikke-mål-proteiner. Spesielt kan tverr-reaksjoner ofte unngås ved å benytte fragmenter avledet fra endel av målproteinet (det vil si proteinet hvortil antistoffene skal provoseres) som ikke er tilsvarende i sekvens til ikke-mål men tverr-reaktivt protein. Som beskrevet i det ovenfor nevnte US-PS 4.320.386 er spesielt et av hovedproblemene ved provosering av antistoffer til HCG tverrreaktivitet av HCG antistoffer med LH idet denne tverrreaktivitet i det minste i vesentlig grad skyldes identiteten av aminosyresekvensen mellom LH og 1-110 aminosyresekvensen i β -underenheten av HCG. I henhold til dette er, når det er ønskelig å danne et HCG-avledet lineært polymert polypeptid, fragmentet som benyttes fortrinnsvis et med en molekylstruktur tilsvarende en del av eller hele 111-145 sekvensen av β -underenheten HCG fordi det er kun denne 111-145 sekvens av β -HCG som skiller seg fra den tilsvarende LH-sekvens. Imidlertid antyder forskning at fragmentene som benyttes i de lineære polymere polypeptider kan inneholde sekvenser som tilsvarer 101-110 sekvensen i β -HCG som er vanlig for β -HCG og LH uten å indusere dannelsen av antistoffer som er reaktive LH. Således kan man i de lineære polymere polypeptider benytte fragmenter som inneholder en del av eller hele denne felles 101-110 sekvens uten å forårsake tverrreaktivitet med LH. For eksempel representerer struktur II ovenfor 111-145 aminosyresekvensen i β -HCG. Hvis ønskelig kan et fragment med 101-145 aminosyresekvensen i β -HCG benyttes isteden for fragmentet med struktur II i de lineære polymere polypeptider uten i vesentlig grad å påvirke aktiviteten for de lineære polymerer og uten å forårsake tverrreaktivitet med LH.

Polymerisering av fragmentene for å danne de lineære polymere polypeptider kan gjennomføres på en hvilken som helst måte for å koble peptidfragmenter for å danne lineære polymerer derav. De lineære polymere polypeptider kan inndeles i to adskilte typer. I den første type er individuelle peptidfragmenter under hode—>hale ved peptidbindinger slik at hele polymeren oppfatter kun fragmentene selv uten å

inneholde eksternt materiale. Selv om slike rene polymerer har fordelene av ikke å innføre eksternt materiale i legemet til dyret som behandles, er de vanligvis for kostbare til å være praktiske fordi de nødvendige fragmenter (uansett om de er fremstilt ved totalsyntese eller spalting av et naturlig protein) i seg selv er meget kostbare og vesentlige tap inntreffer under polymeriseringen. Videre kan hode—>hale-kobling av fragmentene uten mellomliggende rester gi immunologiske determinanter som ikke har noen motpart i det upolymeriserte fragment. Hvis for eksempel det ovenfor beskrevne fragment omfattende 105-145 sekvensen av HCG polymeriseres ved hjelp av peptidbindinger, vil en sekvens:

Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-Asp-His-Pro-Leu-Thr

fremstilles ved hver sammenskjøting mellom ved siden av hverandre liggende fragmenter, og denne sekvens kan provosere dannelse av antistoffer som ikke ville fremstilles av fragmentet selv, og som kan være uønsket. Fordi det ikke er noen "punktering" som kan fortelle immunsystemet i mottagerdyret hvor et fragment begynner og et annet slutter, kan med andre ord dyrets immunsystem utilsiktet starte å lese av den gale rest og gi uønskede antistoffer ved å kjøre sekvensene av ved siden av hverandre liggende fragmenter sammen. Av denne grunn er det generelt ikke å anbefale å benytte lineære polymerer der fragmentene er bundet sammen med peptidpolymerer, selv om slike lineære polymerer kan være brukbare i visse tilfeller.

Forskjellige metoder for kobling av polypeptidfragmenter via peptidbindinger er kjent for fagmannen. For eksempel kan et fragment som skal kobles ha sin C-terminal karboksylgruppe blokkert (for eksempel ved forestring) og omsettes med de andre fragment som har sin C-terminalaminogruppe blokkert, mens dettes karboksylgruppe er aktivert ved hjelp av et aktiveringsmiddel. Åpenbart kan blokkering av ikke-terminalamino- og -karboksylgrupper være nødvendig. Videre kan det som velkjent for fagmannen være fordelaktig å binde en ende av polymeren som således fremstilles til en bærer som

en polystyren-harpiksbærer hvorved polymeren kun frigjøres fra bæreren etter at polymeriseringen er ferdig.

I den andre type lineære polymerpolypeptider er polypeptid-fragmentene forbundet med hverandre ved hjelp av rester avledet fra et bifunksjonelt reagens som benyttes for å bevirke polymerisering av fragmentene slik at den endelige lineære polymer er en alternerende lineær polymer av polypeptidfragmenter og koblingsreagens-rester. Selv om denne type polymerer nødvendigvis innfører visse eksterne stoffer til dyret som behandles kan andelen av eksterne stoffer gjøres betraktelig lavere enn den ville være hvis fragmentene var koblet til en stor bærer som et difteritoksoid. Koblingsmidlet som nødvendigvis er et bifunksjonelt koblingsmiddel for å gi en virkelig lineær polymer, kan velges slik at resten den etterlater i polymeren ikke er sterkt immunogen (slik at det ikke legger en storbelastning på immunsystemet i mottagerdyret, slik for eksempel et stort bærermolekyl som difteritoksoid ville ha gjort), og nærværet av disse rester i polymeren har fordelen av i det vesentlige å eliminere falske immunologiske determinanter som dannes ved sammenkobling av hodet av et fragment med halen av det ved siden av stående fragment slik som diskutert ovenfor.

For å diskutere at en satt lineær polymer fremstilles under polymeriseringsprosessen, omsettes en terminal av et første polypeptidfragment med det bifunksjonelle koblingsreagens slik at koblingsreagensen reagerer med en gruppe som er tilstede ved eller nær terminalen av fragmentet; for eksempel kan koblingsreagens reagere med en N-terminal aminogruppe, en C-terminal karboksylgruppe eller en fri tiolgruppe som er tilstede på et C-terminal cystein. Åpenbart bestemmer arten av koblingsmiddel som benyttes hvilken gruppe i peptidet som reagerer. For å unngå enhver fornetning og for å sikre et reproduserbart resultat er det viktig at kun et sete på det første fragment er tilgjengelig for reaksjon med koblingsmidlet slik at koblingsmidlet kan binde seg kun til

det første fragment på dettes ene sete. Som fagmannen vil vite kan hvis det er ønskelig å benytte et fragment som inneholder mer enn en gruppe som kan reagere med koblingsmidlet, de overskytende seter blokkeres ved binding til egnede beskyttende grupper. Produktet som dannes ved omsetning av det første fragment med koblingsmidlet omsettes så med et andre fragment (som kan være det samme eller forskjellig fra det første fragment) med et enkelt sete tilgjengelig til å reagere med den andre reaktive gruppe i det bifunksjonelle bikoblingsmiddel, for derved å koble det første og andre fragment med en rest avledet fra koblingsmidlet. Etter enhver nødvendig rensing av dette dimere produkt omsettes dette så til en ytterligere andel av et koblingsmiddel som kan være det samme eller et annet i forhold til det som ble benyttet for å bevirke den første kobling, for derved å omsette den frie terminal av enten det første eller det andre fragment med koblingsmidlet. Naturligvis er det viktig å sikre at kun et sete på dimerene er tilgjengelige for kobling med koblingsmidlet og slik det vil fremgå for fagmannen kan blokkering eller av blokkering av potensielt reaktive grupper på det dimere polypeptid være nødvendig. Reaksjonsproduktet av dimert polypeptid med koblingsmidlet omsettes så med et tredje fragment med kun et enkelt sete tilgjengelig for reaksjon med den gjenværende reaktive gruppe av koblingsmidlet for derved å gi en lineær polymer som inneholder tre polypeptidfragmenter. Åpenbart kan denne prosess gjentas inntil den ønskede størrelse for den lineære polymer er oppnådd.

Det vil være åpenbart for fagmannen at de bifunksjonelle koblingsreagenser som benyttes for å fremstille de lineære polymere polypeptider bør være asymmetrisk, det vil si at de bør ha to funksjonelle grupper som reagerer med forskjellige grupper på fragmentene som polymeriseres fordi hvis man for eksempel gjorde forsøk på å omsette en bifunksjonell bikoblingsreagens med to funksjonelle grupper som begge reagerte med aminogrupeer med et første fragment med en

enkelt aminogruppe ville i det minste noe av det første fragment dimeriseres via en rest avledet fra det bifunksjonelle bikoblingsreagens. Slik dimerisering kan i teorien unngås ved å benytte et meget stort overskuddreagens, men i praksis er det uønsket å løpe risikoen for å fremstille 5
sogar en liten andel dimer. På tilsvarende måte vil det på senere trinn i polymeriseringsprosessen være ennu mindre ønskelig å benytte symmetriske koblingsreagenser og derved å løpe risikoen for dimerisering av de partielt dannede polymerer som allerede er fremstilt. I den foretrukne 10
prosess for fremstilling av lineære polymerpolypeptider slik den allerede er beskrevet, påbegynnes polymerkjeden med et første peptid uten ublokkert tiolgruppe og med en ublokkert aminogruppe kun på N-terminalen (peptider inneholdende 15
tiolgrupper og/eller aminogrupper andre enn N-terminalen kan selvfølgelig benyttes hvis alle disse tiol- og aminogrupper er blokkert med et hvilket som helst konvensjonelt blokkeringsmiddel). Dette første peptid omsettes så med et aminogruppeaktiverende middel, et foretrukket aktiverings- 20
middel for dette formål er 6-maleimidokapronsyre en hydrok-sysuksinimidester (MCS); (omsetning av peptidet med en reagens gjennomføres optimalt med pH 6,6). Aktivieringsmidlet reagerer med aminogruppen på N-terminalen av det første peptid og danner en aktivert form av det første peptid; når 25
det gjelder MCS er det esterdelen av reagensen som reagerer med N-terminalgruppen i peptidet. Det er vanligvis så nødvendig å fjerne overskytende aktiveringsmiddel før man fortsetter fremstillingsprosessen. Når overskudd av aktiveringsmiddel er fjernet blir det aktiverte første peptid omsatt 30
i et andre peptid med et C-terminalcystein i redusert tilstand (det vil si med en ublokkert 3-tiolgruppe), for derved å forårsake kobling av N-terminalen av det aktiverte første peptid til C-terminalen av det andre peptid via en aktiveringsmiddelrest. Fortrinnsvis blir så den resulterende dimer rensert som beskrevet i større detalj nedenfor. Derefter 35
blir dimeren igjen omsatt med et aminogruppeaktiverende middel og så med den andre del av det andre peptid eller med

et tredje peptid for derved å danne en trimer. Denne prosedyre gjentas inntil den ønskede kjedelengde er oppnådd.

5 For å sikre reproducerbare responser fra immunsystemene av de behandlede dyr er det viktig at de lineære polymere polypeptider benyttes i form av rene polymerer der alle molekylene inneholder det samme antall fragmenter. For å oppnå slike rene polymerer bør effektiv rensing gjennomføres etter hvert polymeriseringstrinn i polymeriseringsprosessen. På 10 grunn av den nær kjemiske likhet mellom polymerer inneholdende forskjellige antall fragmenter er kjemisk rensing ineffektiv slik at rensing må gjennomføres ved fysikalske metoder. Gelfiltrering kan benyttes hvis ønskelig men den foretrukne rensemetode er omvendt fase med høytrykksvæskrokromotografi, fortrinnsvis ved bruk av en molekylsikt som 15 fast fase.

Ved denne metode for fremstilling av lineær polymerer kan de første og andre peptider være identiske i kjemiske konfigurasjon bortsett fra at i det første peptid har 20 C-terminalcysteinet en blokkert tiolgruppe. De første to foretrukne fragmenter for å danne lineære polymere polypeptider for å danne antistoffer mot HCG som nevnt ovenfor kan beskrives som (111-145)-Cys og (105-145)-Cys, der tallene 25 angir aminosyresekvensen i β -underenheten av HCG. Det vil være klart at når disse fragmenter skal benyttes ved fremstilling av lineære polymere peptider ved den nettopp beskrevne metode, må lysinresten i posisjon 122 ha sin aminogruppe blokkert, og når det gjelder (105-145)-Cys 30 fragmentet må det ikke-terminale cystein i posisjon 110 ha sin tiolgruppe blokkert, fortrinnsvis med en acetamidometylgruppe.

De lineære polymere peptider inneholder fortrinnsvis fra 4 35 til 14 fragmenter.

De modifiserte antigener som fremstilles ved kjemisk modifisering av ikke-endogene proteiner skal nu beskrives i større detalj. Som fagmannen vil være klar over er det tallrike patogener og tilsvarende stoffer som er kjent og som ikke er endogene hos dyr, som er istand til å gi skadelige virkninger i dyrets legeme, men som ikke er immunogene mot dyret i den betydning at innføring av patogener eller det annet stoff i dyrets legeme ikke får dyrets immunsystem til å fremstille de mengder riktige antistoffer som er nødvendig for at dyrets immunsystem skal kunne ødelegge patogenet eller det tilsvarende materiale. For eksempel er herpes simplex type II virus istand til å fremkalle et antall skadelige virkninger hos mennesker inkludert dannelsen av smertefulle lesjoner i genitallområdene. Selv om denne virus på samme måte som de fleste vira har protein inkludert i strukturen er viral-proteinet ikke sterkt immunogent i fleste mennesker slik at kun ca. 50% av smittede mennesker produserer antistoffer mot denne virus. Mangelen på immunrespons på denne virus hos mange mennesker betyr at virusen kan forbli i de infiserte mennesker i det minste flere år og denne tilbakebliven av viruset i de smittede individer forårsaker ikke bare at disse lider under tilbakevendende angrep av smertefulle symptomer som forårsakes av denne virus men også gjør dem til langtidsbærere av virusen. Virusens standhaftighet i infiserte dyr er en av de faktorer som i sterk grad er ansvarlig for de epidemiske tilstander herpes simplex-infeksjoner har ført til i flere land. Ved ifølge oppfinnelsen å fremstille et antigen, avledet fra et protein med en sekvens lik den til i det minste en del av sekvensen av et herpes simplex viralprotein, er det mulig å stimulere humanimmunsystemet for å gjøre det istand til å fremstille større mengder antistoffer mot herpes simplex-virus. Ikke bare ville denne stimulering av immunsystemer redusere opptredenen av symptomer forbundet med herpes simplex-infeksjon, men vil også understøtte kontroll av virusens utbredning. På samme måte kan immunresponsen hos mennesker og andre dyr mot vira slik som forkjølelse,

influenza eller andre, økes ved ifølge oppfinnelsen å fremstille modifiserte antigener basert på peptider med frekvenser tilsvarende viralproteinene i egnede vira. Hvis, slik det ser ut til, en virus er ansvarlig for ervervet immundefektsyndrom, AIDS, kan et modifisert antigen også
5 benyttes for å gi immunitet mot denne sykdom.

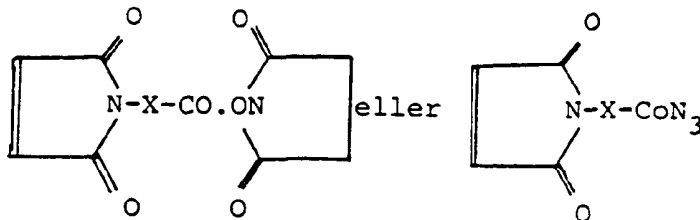
Generelt er metodene som ifølge oppfinnelsen benyttes for fremstilling av antigener basert på ikke-endogene stoffer som
10 viralproteiner eller peptider tilsvarende deler derav, de samme som de som benyttes for å modifisere endogene proteiner eller fragmenter derav, som nevnt i det tidligere nevnte US-PS 4.302.386. Imidlertid skal det være klart at de fortrukne metoder som benyttes for å modifisere ikke-endogene
15 stoffer kan variere i visse henseende fra de som benyttes for å modifisere endogene peptider. Fordi generelt det ikke-endogene peptid vil provosere i det minste en begrenset immunrespons fra dyret hvortil antigenet gis, vil kravene for modifisering av de ikke-endogene protein eller peptid for
20 ifølge oppfinnelsen å fremstille et antigen ha en tendens til å være mindre stringente enn de for modifisering av et endogent og helt ikke-immunogent protein eller peptid. Fordi imidlertid det ikke-endogende protein eller peptid modifiseres for å øke den immunogene virkning i dyret
25 hvortil det gis, vil det generelt være ønskelig at bæreren som benyttes for å modifisere det ikke-endogene protein eller peptid (hvis kjemiske modifisering skal gjennomføres ved kobling av det ikke-endogene protein eller peptid til en bærer i stedet for å danne et lineært polymert polypeptid)
30 for å gi antigenet, et stoff som i seg selv provoserer en sterk respons fra dyrets immunsystem. For eksempel kan bæreren være et bakterielt toksoid som difteritoksoid eller tetanustoksoid.

35 Antigenene fremstilles ifølge oppfinnelsen som nevnt ovenfor ved kjemisk å modifisere et protein som ikke er endogent

eller immunogent mot dyret som behandles, eller et peptid med en sekvens tilsvarende i det minste delvis sekvensen til proteinet idet denne kjemiske modifisering gjennomføres utenfor dyrets legeme. Den kjemiske modifisering kan gjennomføres ved å koble protein eller peptidet til en bærer, ved polymerisering av peptidet for å danne et lineært polymert polypeptid eller ved en hvilken som helst annen modifiseringsteknikk som gjør proteinet eller peptidet tilstrekkelig immunogent.

Foretrukne teknikker for kjemisk modifisering av protein eller peptid ved kobling til en bærer inkluderer de følgende (ytterligere detaljer for optimering av teknikker for hver av de følgende koblingsreaksjoner er beskrevet i det ovenfor nevnte US-PS 4.302.386):

a. Behandling av et protein eller peptid med en sulfhydrylgruppe derpå med en aktivator med strukturen:



der X betyr en ikke-reagerende gruppe omfattende substituert eller usubstituert fenyl eller C₁₋₁₀-alkylendeler, eller en kombinasjon derav, eller en amino-syrekjede for å oppnå reaksjon mellom maleimidgruppen i aktivatoren og sulfidgruppen i protein eller peptidet; og å behandle det resulterende aktiverte protein eller peptid ved lett alkalisk pH-verdi med en bærerdel som biologisk er fremmed for dyret og valgt med en størrelse tilstrekkelig til å fremtvinge antistoffrespons etter inngivelse derav til dyrets legeme.

b. Under nøytrale eller sure betingelser å behandle en bærer som ikke har noen sulfhydrylgruppe men en aminogruppe, med en

aktivator som angitt ovenfor, for å fremtvinge reaksjon mellom aktivatoren og aminogruppen på bæreren, hvorved bæreren er biologisk fremmed overfor dyret som skal behandles og har en størrelse tilstrekkelig til å gi antistoffrespons 5 etter inngivelse av forbindelsen til dyrets legeme; og å behandle den resulterende aktiverte bærer med proteinet eller peptidet, som må ha en sulfhydrylgruppe, for derved å omsette maleimidgruppen i aktivatoren ved sulfhydrylgruppen på proteinet eller peptidet.

10 c. Å behandle en bærer som er biologisk fremmed overfor dyret som skal behandles og med en aminogruppe med en aktivator tilstede som en aktiv ester av klor-, diklor-, brom- eller jodeddiksyre for derved å forårsake reaksjon 15 mellom aktivatoren og aminogruppen på bæreren og behandling av den resulterende aktiverte bærer med protein eller peptid, som må ha en sulfhydrylgruppe, for derved å omsette den aktiverte bærer med sulfhydrylgruppen i proteinet eller peptidet.

20 d. Behandling av et protein eller peptid som ikke har sulfhydrylgruppe men som har en aminogruppe, med en aktivator tilstede som en aktiv ester av klor-, diklor-, brom- eller jodeddiksyre, og behandling av den resulterende halogenmetyl 25 alkyleringsgruppeholdige del med en sulfhydrylgruppeholdig bærer som biologisk er fremmet for dyret som skal behandles for derved å omsette sulfhydryl-gruppen i bæreren med halogenmetylalkyleringsgruppen.

30 Det vil være klart at flere av de foretrukne koblings- teknikker som er beskrevet ovenfor krever nærvær av en sulfhydrylgruppe i proteinet eller peptidet.

35 Det er velkjent for fagmannen at i mange naturlige proteiner inneholdende cysteinrester, er disse rester ikke tilstede i deres tioform inneholdende en fri SH-gruppe; istedet er par av cysteinrester innrettet ved hjelp av disulfidbroer for å

danne cystein. Slike disulfidbroer er meget viktige med henblikk på å bestemme proteinets konformasjon. I de fleste tilfeller blir disulfidbroene som er tilstede i naturlig form av proteinet lett redusert til par av SH-grupper ved hjelp av milde reduksjonsmidler under tilstander som etterlater de resterende deler av proteinmolekylet uendret. Når det er ønskelig å fremstille frie SH-grupper i proteinene for å gjennomføre koblingsreaksjonen som er beskrevet ovenfor er i henhold til dette en hensiktsmessig måte å oppnå slike frie SH-grupper på å spalte disulfidbroer som naturlig er tilstede i proteinet eller et annet polypeptid som det er ønskelig å koble.

Dannelse av fri SH ved reduksjon av disulfidbroer i naturlig opptredende former av proteiner kan også bevirke tverraktivitet for antistoffene som dannes når et modifisert polypeptid, fremstilt fra proteinet, injiseres i et dyr. Hyppig erkjenner et antistoff sitt tilsvarende antigen ikke kun ved aminosyresekvensen i antigenet men også ved konformasjonen (formen) på antigenet. I henhold til dette kan et antistoff som binder meget sterkt til dette protein eller annet polypeptid i sin naturlige konformasjon binde meget mindre sterkt hvis overhodet til det samme protein eller polypeptid hvis konformasjon plastisk er endret ved oppbryting av disulfidbroene. I henhold til dette kan oppbryting av disulfidbroer i proteiner eller andre polypeptider være en basis for å redusere tverraktiviteten mellom antistoffer til antigener med den samme aminosyresekvens langs endel av molekylet.

Som nevnt ovenfor fremstilles det ifølge oppfinnelsen kjemisk modifiserte antigener avledet fra zona pellucida eller sperma-antigener, eller peptider med en sekvens tilsvarende i det minste endel av sekvensen for en slik zona pellucida eller sperma antigen. Disse modifiserte antigener er brukbare for fertilitetskontroll. Det er kjent at antigener fra zona pellucida (det ytre hylster av egget) når det injiseres i hunprimater gir antistoffer med antifertiliserings effekter

inkludert forhindring av spermafesting til en gjennom-
trengning av zona pellucida av det ikke-befruktede egg, og
forhindring av dispergering av zona pellucida i det befruktede
egg før innplantering (slik dispergering av zona er åpenbart
et vesentlig krav for innplantering). Se til dette W.R.Jo-
nes, "Immunological Fertility Regulation" sidene 160 og
følgende. Slike antifertilitetsvirkninger antas å skyldes
dannelse av et antistoff antigenprecipitat på zona idet
dette gjør zona ute av stand til å undergå den vanlige
spermabindende reaksjon og gjør også zona ufølsom for
virkning av de proteaser som vanligvis er ansvarlige for
dispergering av zona.

En antifertilitetsvaksine basert på zona antigener er
spesielt attraktiv fordi zona-antigenet synes å være relativt
frie for sidevirkninger på andre vev og fordi det er utviklet
metoder for å fremstille svinezonaantigener i store mengder;
svine- og humanzonaantigener viser meget god tverraktivitet.
Som når det gjelder antifertilitetsvaksiner basert på β -
HCG-antigenet diskutert ovenfor og i det tidligere nevnte
US-PS 4.302.386, vil bedre resultater oppnås ved å modifi-
sere et zonaantigen eller et fragment derav for å gi et
modifisert antigen ifølge oppfinnelsen.

Flere antigener, spesielt spermaenzymer, kjent å foreligge i
sperma, kan benyttes i de modifiserte antigener ifølge
oppfinnelsen, se W.R.Jones, op.cit., side 133 og følgende.
Det mest lovende av slike antigener er den laktathydrogenase
som er kjent som LDH-C4 eller LDH-X. Selv om selvfølgelig
laktatdehydrogenaser er tilstede i andre vev er LDH-C4
distinkt fra andre laktatdehydrogenase isoenzymer og synes å
være spermaspesifikk. Videre er enzymet ikke av sterk
spesifikk art, og metode for dets isolering og rensing er
kjent. Også her vil de beste resultater oppnås ved modifi-
sering LDH-C4 eller et fragment derav for å fremstille et
modifisert polypeptid ifølge oppfinnelsen. Flere naturlige
peptidfragmenter av LDH-C4 er fremstilt, sekvensert har vist

å binde til antistoffer mot stammolekyl. (se E.Goldburg, "LDGH-X as a spermpspecific antigen" i T.Wegmann, og T.J.Gill (eds.) Reproductive Immunology, Oxford University Press, 1981).

5

Selv om teoretisk en antifertilitetsvaksine basert på spermaantigener kan være brukbar på hanner gjør sannsynligheten for testikkelskade det mer sannsynlig at en slik vaksine vil finne sin anvendelighet på hunner. Det er kjent at sirkulerende antistoffer i hunnens blodstrøm penetrerer genitalfluidene; for eksempel har forsøk på bavianer med vaksiner basert på peptid med struktur XII ovenfor konjugert med tetanus toksoid vist nærværet av HCG-antistoffer i genitalfluidene. Imidlertid er et mulig problem med enhver vaksine basert på spermaantigener å holde et tilstrekkelig høyt antistoffnivå i hunn genitalfluidene til å kompleksdanne med de store mengder involvert sperma.

10

15

Teknikkene som benyttes for kjemisk modifisering av zona pellucida eller spermaantigener, eller peptidet avledet derfra, for å danne de modifiserte antigener som fremstilles ifølge oppfinnelsen, inkluderer alle de teknikker som er skrevet i det tidligere nevnte US-PS 4.302.386 og også de ovenfor beskrevne teknikker. Således kan antigenet eller peptidet kobles til en bærer som et tetanustoksoid eller difteritoksoid, eller kan polymeriseres for å danne et lineært polymert polypeptid. De fortrukne teknikker for å danne slike lineære polymere polypeptider er allerede diskutert ovenfor mens de foretrukne teknikker for kobling av antistoffer eller peptidene til bærere er de samme som de for kobling av ikke-endogene proteiner eller peptider, slik som allerede beskrevet ovenfor.

20

25

30

De oppnådde forbindelser kan benyttes i forbindelse med en vaksine inneholdende et modifisert polypeptid, antigen eller et modifisert antigen og en bærer omfattende en blanding av mannidmonooleat med squalan og/eller squalen. Det er funnet

35

at denne bærer har virkningen av å øke mengden antistoffer som provoseres av det lineære polymere peptid, antigen eller det modifiserte antigen, når vaksinen administreres til et dyr. For ytterligere å øke mengden av antistoffer som dannes ved administrering av vaksinen, er det fordelaktig i denne og innarbeide et immunologisk hjelpestoff. Uttrykket "hjelpestoff" benyttes i sin normale betydning for fagmannen på det immunologiske område, nemlig som et stoff som forhøyer den totale immunrespons i dyret, hvortil vaksinen administreres, det vil si at hjelpestoffet er en ikke spesifikk immunostimulator. Foretrukne hjelpestoffer er muramyldipeptider, spesielt:

N_Ae-nor Mur-L.Ala-D.isoGln;

N_{Ac}-Mur-(6-0-stearoyl)-L.Ala-D.isoGln; eller

N Glykol-Mur-L. Abu-D.isoGln.

Vaksinene kan administreres parenteralt til dyrene som skal beskyttes; de vanlige administreringsmåter for vaksinen er intramuskulær og subkutaninjeksjon. Mengden av vaksinen som benyttes vil selvfølgelig variere avhengig av forskjellige faktorer inkludert behandlingsbetingelsene og tilstandens alvor. Imidlertid gir generelt enhetsdoser på 0,1-50 mg i store pattedyr inngitt 1 til 5 ganger i intervaller på 1 til 5 uker tilfredsstillende resultater. Primærimmunisering kan også følges av "booster" immunisering i 1 til 12 måneders intervaller.

For å fremstille vaksinene er det hensiktsmessig først å blande det lineære polymerpeptid, antigen eller modifiserte antigen, med muramyldipeptidet (eller et annet hjelpestoff) og så å elmugere den resulterende blanding i mannidmonooleat/squalen eller -squalanbærer. Squalen er foretrukket fremfor squalan for bruk i vaksinene og fortrinnsvis benyttes ca. 4 volumdeler squalen og/eller squalan pr. volumdeler mannidmonooleat.

Dyrene som behandles med det lineære polymere peptid, antigen eller det modifiserte antigen, inkluderer både mennesker og andre dyrearter. Det følgende eksempel kan gis som illustrasjon for å vise detaljer ved fremstilling og bruk av et lineært polymerpeptid ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen skal illustreres nærmere under henvisning til det følgende eksempel.

Eksempel

Fragment A beskrevet ovenfor (et fragment med en aminosyre-sekvens tilsvarende 105-145 sekvensen i beta HCG, med en cysteinrest festet til C-terminalen) ble polymerisert for å oppnå en heksamer. En første andel av fragment A hadde både sine tiolglupper (på det ikke-terminale cystein i posisjonen tilsvarende 110 posisjonen i β -HCG, og på sitt C-terminal cystein) og sin ikke-terminale aminogruppe (på lysinresten i posisjonen tilsvarende posisjon 122 i β -HCG) blokkert. Denne blokkerte form av fragment A ble omsatt med den bifunksjonelle organiske koblingsreagens) eller aminogruppe-aktiverende middel) MCS i en buffret vandig oppløsning ved pH 6,6 for derved å omsette esterdelen MCVS med N-terminalaminogruppen i den første porsjon av fragment A. Det resulterende produktet ble så omsatt med en andre andel fragment A som ble benyttet i samme form som den første andel av fragment A bortsett fra at C-terminalcysteinet var en ublokkert tiolgruppe, for derved å omsette den gjenværende funksjonelle gruppe av MCS med den frie tiolgruppe på den andre andel av fragment A og således produsere en dimer hvori N-terminalen av den første andel av fragment A ble koblet til C-terminalen av den andre del av fragment A via en MCS-rest. Denne dimer ble så rensset ved gelfiltrering. Polymeriseringen ble så gjentatt på samme måte inntil det var fremstilt en heksamer av fragment A. På grunn av at rensingen som fulgte hvert polymeriseringstrinn gjennomført ved gelfiltrering i stedet for ved omvendt fase høytrykks-væskrokromotografi var heksameren utvilsomt noe uren og

forurenset av spor av pentamer, tetramer og så videre, slik at resultatene i dyreprøvene som beskrevet nedenfor ikke kunne forventes så gode som ved fremstilling av en ren heksamere.

5

For å prøve effektiviteten av dette heksamere polypeptid med henblikk på å provosere dannelse av antistoffer mot HCG ble heksameren omdannet til en vaksine ved bruk av: Complete Friends' Adjuvent" og injisert i fem kaniner. Hver kanin ble gitt tre injeksjoner av vaksinen intramuskulært i tre ukers intervaller idet hver injeksjon inneholdt 0,5 mg heksamere. Tre uker etter den første injeksjon ble hver kanin tappet for blod en gang i uken og nivå av antistoffer mot HCG i blodet bestemt. De følgende midlere verdier for antistoffnivået ble funnet (figurene i parentes representerer pålitelighetsfrensene, det vil si gjennom-snitt + eller- standardfeil):

15

TABELL

<u>Uker etter første injeksjon</u>		<u>Antistoffkonsentrasjon</u> <u>mol/liter x 10⁻¹⁰</u>
20	JA 50 83	85(2-7)
	84	818(13-22)
	85	830(21-39)
	86	845(30-60)
	87	858(32-83)
25	88	861(34-86)
	89	877(50-108)
	810	8110(53->125)
	811	8100(50->125)
	812	879(30-119)
30	813	853(22-83)

De ovenfor angitte resultater viser at selv den urene heksamere som ble benyttet i disse forsøk var meget sterkere immunogen enn de meget svakt immunogene fragmenter hvorfra de ble oppnådd.

35

P a t e n t k r a v

5 Fremgangsmåte for fremstilling av et modifisert antigen for bruk ved fertilitetskontroll av dyr, omfattende et zona pellucida eller spermantigen, eller et peptid med en sekvens som tilsvarer minst en del av sekvensen av et slikt zona pellucida eller spermantigen, hvilket antigen eller peptid er kjemisk modifisert utenfor dyrets kropp ved enten kobling av minst et av antigenene eller peptidene til en bærer, eller

10 kobling av et antall av peptidene til hverandre under dannelse av et lineært peptid, idet det modifiserte antigen etter administrering til dyrets legeme har en større kapasitet til å fremtvinge dannelse av antistoffer enn zona pellucida eller spermantigenet før den kjemiske modifisering,

15 k a r a k t e r i s e r t v e d a t

1) et antall av peptidene er bundet til hverandre ved en kjemisk modifiseringsteknikk som omfatter:

20 a) å omsette et første av peptidene med et bifunksjonelt koblingsmiddel mens det første peptid foreligger i en form med kun et enkelt sete istand til å reagere med koblingsmidlet idet dette setet er ved eller nær en av det første peptids termini, for derved å bringe en av de funksjonelle

25 grupper i koblingsmidlet til reaksjon med et sete på peptidet;

30 b) omsetning av produktet fra trinn a) med et andre av peptidene mens det andre peptid foreligger i en form med kun et enkelt sete istand til å reagere med den andre funksjonelle gruppe av koblingsmidlet, idet dette setet befinner seg ved eller nær en av det andre peptids termini for derved å danne et dimerpeptid hvori det første og andre peptid er

35 forbundet seg imellom via en rest av koblingsmidlet;

c) omsetning av det resulterende peptid med et bifunksjonelt koblingsmiddel mens peptidet befinner seg i en form med kun et enkelt sete istand til omsetning med koblingsmidlet hvorved dette setet befinner seg ved eller nær et av peptidets termini for derved å bringe en av de funksjonelle grupper i koblingsmidlet til å reagere med et sete på peptidet;

d) å omsette produktet fra trinn c) med ytterligere et av peptidene mens det ytterligere peptid befinner seg i en form med kun et enkelt sete istand til å reagere med den andre funksjonelle gruppe i koblingsmidlet, hvorved setet er ved eller nær det ytterligere peptids termini for derved å gi et polymerpeptid hvori det første, andre og de ytterligere peptider er forbundet seg imellom via rester av koblingsreaksjonen; og

e) å gjenta trinnene c) og d) inntil den ønskede polymerlengde er oppnådd, eller

2) et antall peptider er forbundet med hverandre via en kjemisk modifiseringsteknikk som omfatter:

a) å omsette et første av peptidene idet dette første peptid ikke har noen ublokkert tiolgruppe og har en ublokkert aminogruppe ved N-terminalen men ingen andre ublokkert aminogruppe, med et aminogruppeaktiverende middel for derved å gi en aktivert aminogruppe ved N-terminalen av det første peptid;

b) å omsette det aktiverte første peptid med et andre av peptidene idet dette andre har et C-terminalcystein som bærer en ikke-blokkert tiolgruppe men som ikke har noen andre ikke-blokkerte tiolgrupper, for derved å koble N-terminalen av det første peptid til C-terminalen av det andre peptid;

c) å omsette den resulterende forbindelse i en form med en ikke-blokkert aminogruppe ved N-terminalen men ingen andre

ikke-blokkerte aminogruupper, og ingen ikke-blokkerte tiolgrupper, med et aminogruppeaktiverende middel for derved å gi en aktivert aminogruppe ved N-terminalen av den resulterende forbindelse;

5

d) å omsette den aktiverte forbindelse som fremstilles i trinn c) med et ytterligere av peptidene idet dette har et C-terminalcystein som bærer en ikke-blokkert tiolgruppe men ikke har noen andre ikke-blokkerte tiolgrupper for derved å koble den aktiverte N-terminal til den reaktiverete forbindelse som fremstilles i trinn c) til C-terminalen av det ytterligere peptid; og

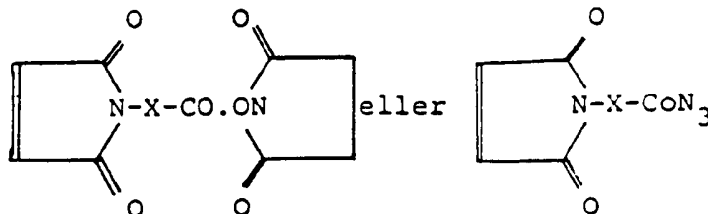
10

e) å gjenta trinnene c) og d) inntil den ønskede polymerlengde er oppnådd, eller

15

3) å behandle antigenet eller peptidet som på seg har en sulfhydrylgruppe, med en aktivator med strukturen

20



25

hvor X betyr en ikke-reagerende gruppe omfattende substituert eller usubstituert fenyl eller C₁₋₁₀ alkylendeler, eller en kombinasjon derav, eller en aminosyrekjede, for derved å fremtvinge reaksjon av maleimidgruppen i aktivatoren med sulfhydrylgruppen på antigenet eller peptidet; og

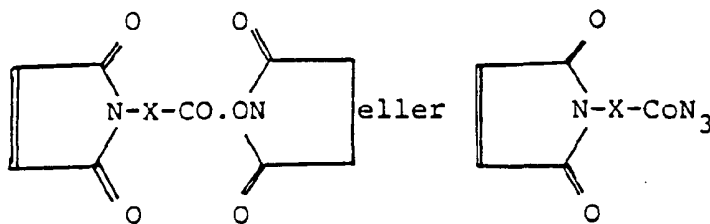
30

å behandle det resulterende antigen eller peptid ved lett alkalisk pH-verdi med en bærerdel som er biologisk fremmed for dyret og selektivt har en størrelse tilstrekkelig til å elicitere antistoffrespons etter administrering til dyrets legeme, for derved å gi det modifiserte antigen, eller

35

4) å tilveiebringe en bærer som er biologisk fremmed for dyret, har en størrelse tilstrekkelig til å elicitere antistoffrespons etter administrering og som ikke har en sulfhydrylgruppe men har en aminogruppe;

5 behandling av bæreren under nøytrale eller sure betingelser med en aktivator med strukturen



15 hvori X betyr en ikke-reagerende gruppe omfattende eventuelt substituert fenyl eller C₁₋₁₀ alkylendeler, eller en kombinasjon derav, eller en aminkjede, for å forårsake reaksjon mellom aktivatoren og aminogruppen på bæreren; og

20 å behandle den resulterende aktiverte bærer med antigenet eller peptidet idet antigenet eller peptidet har en sulfhydrylgruppe, for derved å omsette maleimidgruppen i aktivatoren med sulfhydrylgruppen på antigenet eller peptidet og derved å tilveiebringe det modifiserte antigen, eller

25 5) å tilveiebringe en bærer som er biologisk fremmed for dyret, har en størrelse tilstrekkelig til å elicitere antistoffrespons etter administrering til dyrets legeme og som ikke har en sulfhydrylgruppe men en aminogruppe;

30 å tilveiebringe en bærer som er biologisk fremmed for dyret, har en størrelse tilstrekkelig til å elicitere antistoffrespons etter administrering til dyrets legeme og som ikke har en sulfhydrylgruppe men en aminogruppe;

35 behandling av bæreren med en aktivator tilstede som en aktiv ester av klor-, diklor-, brom- eller iodeddiksyre for derved å gi reaksjon med aminogruppen på bæreren;

behandling av den resulterende aktiverte bærer med antigenet eller peptidet idet dette har en sulfhydrylgruppe, for derved å omsette den aktiverte bærer med sulfhydrylgruppen på antigenet eller peptidet for derved å gi det modifiserte antigen, eller

6) å behandle antigenet eller peptidet som ikke har en sulfhydrylgruppe men som har en aminogruppe, med en aktivator tilstede som en aktiv ester av klor-, diklor-, brom- eller iodeddiksyre, for derved å omsette den aktive ester med aminogruppen på antigenet eller peptidet for derved å gi en del som inneholder en halogenmetylalkylerende gruppe; og

å behandle denne del med en bærer som er biologisk fremmed for dyret, har en størrelse tilstrekkelig til å elicitere antistoffrespons etter administrering og inneholder en sulfhydrylgruppe, for derved å omsette sulfhydrylgruppen med en halogenmetylalkylerende gruppe for derved å gi det modifiserte antigen.

25

30

35