



Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 6249/86

(51) Int.Cl.5

G 01 N 33/53

(22) Indleveringsdag: 22 dec 1986

G 01 N 33/68

(24) Løbedag: 22 apr 1986

(41) Alm. tilgængelig: 23 feb 1987

(44) Fremlagt: 19 okt 1992

(86) International ansøgning nr.: PCT/AU86/00110

(86) International indleveringsdag: 22 apr 1986

(85) Videreførelsesdag: 22 feb 1987

(30) Prioritet: 22 apr 1985 AU 0240/85

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

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

(74) Fuldmægtig: Lehmann &amp; Ree A/S

(54) Fremgangsmåde til bestemmelse af mimotoper

(56) Fremdragne publikationer

6249-86

(57) Sammendrag:

En monomersekvens, som er en topografisk ækvivalent til den ligand, der er komplementær til en særlig receptor, som er af interesse, detekteres eller bestemmes ved,

1. at der syntetiseres en flerhed af catamerer, hvor hver catamer har den generelle formel:



hvor  $D_1$  betegner en designeret monomer, der udvælges fra en første monomergruppe, og  $D_2$  betegner en designeret monomer, der udvælges fra en anden monomergruppe, der kan være den samme som eller forskellig fra den første monomergruppe; og hvor flerheden af catamerer omfatter catamerer, i hvilke hver designeret monomer varieres systematisk til at indeholde enheder fra den respektive monomergruppe;

2. at hver catamer kontaktes med receptoren, som er af interesse;

fortsættes

3. at forekomst eller fravær af binding mellem hver catamer og denne receptor påvises eller bestemmes.

Yderligere flerheder af catamerer, indbefattende catamerer, som indeholder afstandsmolekyler, syntetiseres til opbygning af en sekvens af monomerer, som er mimotop til liganden.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til påvisning eller bestemmelse af en sekvens af monomere molekyler, som svarer til ligandmolekylet for en bestemt receptor. Den således bestemte sekvens af monomere molekyler er mimotopen (defineret nedenfor) af den særlige ligand.

- 5 Den mimotop, som bestemmes ifølge den foreliggende fremgangsmåde, har ikke nødvendigvis noget tydeligt eller direkte forhold til det naturlige ligandmolekyle, men vil besidde dets evne til at reagere med receptoren, og faktisk kan den således bestemte mimotop modificeres til at inkorporere specifikke eller yderligere egenskaber i
- 10 reaktionen med receptoren. En sådan mimotop vil derpå kunne anvendes til at erstatte den naturlige ligand ved behandling eller forebyggelse af en bestemt sygdom, eller den kan anvendes til at formidle en bestemt biologisk virkning.

- De nedenfor anførte betegnelser, der anvendes i nærværende
- 15 beskrivelse, har følgende betydninger:

- receptor: et molekyle eller molekyلكompleks, der vil bindes specifikt til dets bestemte ligandmolekyle. Det er de receptorer, som ved binding med deres bestemte
- 20 ligand(er) formidler en biologisk funktion, der har størst interesse. Eksempler på receptorer indbefatter, men er ikke begrænset til, den almindelige klasse af receptorer, der er associeret med cellers overflademembran, og indbefatter f.eks. de immunologisk
- 25 vigtige receptorer på B-celler, T-celler, makrofager og lignende. Et andet eksempel er receptorer for acetylcholin på nerveceller, der bevirker at et nerve-signal sendes i neuronens længde, når receptor-molekylet reagerer med dets ligand, acetylcholin.

- 30 epitop: Den specifikke overflade på et antigenmolekyle, som tegnes af det område, der vekselvirker med den underklasse af receptorer, der er kendt som antistoffer.

- 35 catamer: et polymert molekyle, der har en nøjagtig fastlagt lineær sekvens, og som dannes ved kondensation af små molekyler. Bemærk, at denne betegnelse omfatter molekyler, til hvilke der anvendes forskellige typer af

- kondensationsreaktioner til forening af 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
- 5 8-catamer, at catameren er sammensat af otte små molekyler. Eksempler på catamerer omfatter et hvilket som helst givet peptid og et hvilket som helst givet oligo-saccharid.
- 10 monomer: et molekyle fra gruppen af små molekyler, der kan kondenseres sammen til dannelse af en catamer. Gruppen af monomere omfatter, men er ikke begrænset til, f.eks. gruppen af almindelige L-aminosyrer, gruppen af D-aminosyrer, gruppen af syntetiske
- 15 aminosyrer, gruppen af nukleotider og gruppen af pentoser og hexoser.
- 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.
- 20
- mimotop: catamer, som i mindst én af sine konformationer har et overfladeområde med den ækvivalente molekyktopologi til den bindingsoverflade af det ligandmolekyle, hvoraf den er en efterligning. I forbindelse med immunologiske receptorer efterligner mimotopen antigenets epitop.
- 25
- komplementær: betegner afpasning af de reagerede overflader på et ligandmolekyle og dets receptor til hinanden. Derfor kan receptoren og dens ligand beskrives som komplementære, og ydermere er kontaktoverfladernes
- 30 karakteristika komplementære til hinanden.
- 35
- paratop: Det forbindende sted på et antistof, der er komplementært til en bestemt epitop.

ligand-

molekyle: molekyle, der binder til en bestemt receptor, og, når den er bundet til denne, formidler den biologiske virkning, der er forbundet med denne bestemte receptor.

5

Eksempler på de receptorer, der kan undersøges ifølge den foreliggende fremgangsmåde, indbefatter, men er ikke begrænset til:

10

hormon-

receptorer: f.eks. receptorer for insulin og væksthormon. Bestemmelse af mimotoperne af de ligander, der binder til disse receptorer, kan føre til udvikling af en oral erstatning af de daglige injektioner, som diabetikere må tage for at mildne symptomerne ved sukkersyge, og i det andet tilfælde en erstatning for det sjældne humanvæksthormon, der kun kan opnås fra afdøde eller rekombinant DNA teknologi. Andre eksempler er de vasokonstriktive hormonreceptorer. Bestemmelse af mimotopen af den ligand, der binder til disse receptorer, kan føre til udvikling af medikamenter til kontrol af blodtryk.

15

20

opiatrecep-

25

torer:

bestemmelse af mimotoper af de ligander, der binder til opiatreceptorer i hjernen, kan føre til udvikling af mindre vanedannende erstatninger for morfin og lignende medikamenter.

mikroor-

30

ganisme-

receptorer:

bestemmelse af mimotoper af de ligander, der binder til en receptor, såsom specifikke transportproteiner eller enzymer, der er væsentlige for overlevelse af mikroorganismer, kan føre til en ny gruppe antibiotika. Af særlig værdi vil være antibiotika mod protozoer og de bakterier, der er resistente over for de medikamenter, der er i almindelig anvendelse.

35

enzymer:

f.eks. de enzymer, der er ansvarlige for spaltning af

5                   nervetransmittere. Bestemmelse af de mimotoper, der er i stand til at modulere virkningen af de enzymer, der spalter de forskellige nervetransmittere, kan føre til udvikling af medikamenter, der kan anvendes ved behandling af sygdomme i forbindelse med nerve-transmission.

10           antistoffer:   f.eks. ligandbindestedet på det antistofmolekyle, der forbinder sig med epitopen på det antigen, der er af interesse. Bestemmelse af en mimotop til epitopen kan føre til udvikling af vacciner, hvor immunogenet er baseret på en eller flere mimotoper, eller diagnostiske midler eller forbindelser, der er anvendelige ved den terapeutiske behandling af autoimmunsygdomme.

15                   Eksempler på ligander, der kan undersøges ved den følgende fremgangsmåde, indbefatter, men er ikke begrænset til:

20           toxiner  
og gifte:       f.eks. bindingsstedet på det toxinmolekyle, der reagerer med en bestemt receptor i legemet og giver det bestemte symptom(er) på intoxication. Bestemmelse af mimotoper til ligandens bindingssted kan føre til udvikling af medikamenter, som kan anvendes til behandling af forgiftninger, der forårsages af slanger eller andre giftige dyr, uden bivirkninger af heterologantivenenumet.

30           virus- og  
andre mikro-  
organismekap-  
selmolekyler: f.eks. det forbindende sted på et viruskapselmolekyle, der reagerer med en særlig receptor på celledmembranen i legemet, og som giver virusen lov til at invadere og således inficere den bestemte celle. Bestemmelse af mimotoper til dette forbindende sted kan føre til udvikling af medikamenter, der specifikt forhindrer intracellulær invasion af virus og således forhindrer deres replikation.

Det er et primært formål ved den foreliggende opfindelse at på-  
vise eller bestemme den ene eller flere korte sekvenser af monomerer  
(catamerer), der selektivt binder sig til en bestemt receptor til  
fremkaldelse af dets biologiske virkning. Disse catamerer vil være  
5 ligandens mimotoper. Denne viden er uvurderlig ved fremstilling af  
meget specifikke diagnostiske og terapeutiske midler.

Den mest almindelige gruppe af små molekyler, som kan kon-  
denseres sammen til dannelsen af en catamer, er gruppen af alpha-  
aminosyrer. Andre molekyler, som er forenelige med en anden valgt  
10 kemi, kan også anvendes. F.eks. de catamerer, der er dannet ud  
fra den specificerede sekvenskondensation af nukleotider eller  
saccharider. En anden gruppe af små molekyler vil være de ikke-  
genetisk kodede aminosyrer, såsom beta-aminosyrer, som med fordel  
kan anvendes til tilføjelse af en ekstra binding på specificerede  
15 positioner i catameren.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er baseret  
på den idé, at en given receptor vil reagere specifikt med en  
catamer, som er mimotop for den ligand, mod hvilken receptoren er  
rettet. Den bygger endvidere på moderne immunologiske metoder til  
20 bestemmelse af reaktionen mellem en receptor og dens ligand, når  
begge er til stede.

I beskrivelsen til AU patentansøgning nr. 45339/85 foreslås det  
at fremstille mimotoper, der er baseret på en generel længde på ca.  
8 monomerer. Det fremgår nu, at den foretrukne fremgangsmåde til  
25 fremstilling af mimotoper er ud fra kortere catamerer (to eller tre  
monomer lange), der er frembragt for alle kombinationer af mono-  
merer fra enten:

- i) to monomergrupper, der kan være identiske, eller
- ii) tre monomergrupper, hvoraf den midterste monomer i  
30 catameren udvælges fra en gruppe af specielt udvalgte  
monomerer, som giver kendte rumlige forhold for de to  
andre monomerer, og at de resterende monomerer i cata-  
meren stammer fra to monomergrupper, som kan være  
identiske.

Ydermere har det vist sig, at følsomheden ved bestemmelse af  
35 receptorernes binding er nedsat i nogle tilfælde, hvor monomeren  
syntetiseres i catamerpræparationer, som beskrevet i beskrivelsen til  
patentansøgning nr. 45339/85.

Det har nu vist sig, at reaktionen let bestemmes mellem en re-

ceptor og korte mimotoper. Når disse korte mimotoper kondenseres sammen, binder de til receptoren med enten en større affinitet eller med en større specificitet for denne receptor. Denne reaktion kan detekteres, selv når den korte mimotop, der præsenteres for receptoren, er så lille som to monomermolekyler lang. Ved bestemmelse af den optimale korte mimotop på hvert trin og derpå afprøvning af yderligere variationer kan den endelige struktur af en stærkt bindende mimotop bestemmes.

Ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringes der en fremgangsmåde til påvisning eller bestemmelse af den monomersekvens, der er topografisk ækvivalent til den ligand, som er komplementær til en bestemt receptor, som har interesse, og hidtil kendt viden angående identitet, struktur og sekvens af receptoren eller dens ligand er irrelevant. Fremgangsmåden omfatter:

1. at en flerhed af catamerer syntetiseres, hvor hver catamer har den almene formel:

$$D_2-D_1$$

hvor  $D_1$  repræsenterer en angivet monomer fra en første monomergruppe, og  $D_2$  repræsenterer en angivet monomer, der udvælges fra en anden monomergruppe, der kan være den samme som eller forskellig fra den første monomergruppe. Flerheden af catamerer omfatter catamerer, hvori hver angivet monomer varierer systematisk til at indeholde enheder fra de respektive monomergrupper,

2. at hver catamer bringes i kontakt med den receptor, der har interesse, og
3. at tilstedeværelsen eller mangel på binding mellem hver catamer og denne receptor påvises eller bestemmes.

Fremgangsmåden kan også omfatte:

- a. at en yderligere flerhed af catamerer syntetiseres, hvor hver catamer har den generelle formel:

$$D_3-D_2-D_1 \text{ eller } D_2-D_1-D_3$$

5 hvor  $D_1$  og  $D_2$  betegner det samme, som anført ovenfor, og fortrinsvis repræsenterer en kombination af monomerer, der svarer til en catamer, der binder til receptoren, og  $D_3$  betegner en angiven monomer, der udvælges fra en tredje gruppe af monomerer, der kan være den samme som eller forskellig fra enten den første eller den anden monomergruppe, og

10 b. at trinnene 2 og 3 udføres med den yderligere flerhed af catamerer.

Procedurerne ifølge trin a. og b. kan gentages for yderligere at "udvide" catamererne ved systematisk at tilføje yderligere monomerer til catamererne og afprøves på samme måde, som i trin b.

15 I et andet vigtigt aspekt kan fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse omfatte:

A. at en flerhed af catamerer syntetiseres, hvor hver yderligere catamer har den almene formel:



25 hvor  $D_1$  og  $D_2$  betegner det samme, som anført ovenfor, og Sp betegner et afstandsmolekyle (engelsk: spacer molecule), der kan modificere den relative orientering af monomererne  $D_1$  og  $D_2$ , og

B. at trinnene 2 og 3 ovenfor udføres med flerheden af yderligere catamerer.

30 Afstandsmolekylet "Sp", som beskrevet ovenfor, kan også indføres systematisk i alle mulige positioner af de "udvidede" catamerer, der er anført ovenfor, og afprøves på samme måde som i trin B. ovenfor.

35 I endnu et andet aspekt kan den foreliggende fremgangsmåde yderligere omfatte trin til systematisk erstatning af monomerer i en hvilken som helst af de catamerer, der er anført ovenfor, med deres optiske isomerer, enten individuelt eller i monomerkombinationer, og igen udføre trinnene 2 og 3, som beskrevet ovenfor.

I et yderligere aspekt kan fremgangsmåden yderligere omfatte

trin til systematisk erstatning af monomerer i en hvilken som helst af de catamerer, der er anført ovenfor, og som binder til den receptor, der har interesse, enten individuelt eller i monomerkombinationer, med andre monomerer, der udvælges fra den respektive monomergruppe (er) og igen udføre trinnene 2 og 3, som anført ovenfor.

Det fremgår, at fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse ikke kræver forudgående information om ligandens natur, og i særdeleshed kræver den ingen forkendskab om den monomersekvens, der udgør liganden. I virkeligheden er det ikke nødvendigt for udøvelse af nærværende opfindelse at kende oprindelsen eller identiteten af den ligand, mod hvilken receptoren er rettet. Ydermere gør opfindelsen ingen antagelser om naturen af liganden af den bestemte receptor. Fremgangsmåden vil identificere mimotoper af usammenhængende såvel som sammenhængende ligander. Det vil, på grund af selve naturen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, forstås at mimotoperne kan eller kan ikke bestå af enheder fra den samme gruppe af monomerer, som udgør den ligand, hvorefter den er en efterligning.

Den flerhed af catamerer, der kræves syntetiseret ved udøvelse af nærværende opfindelse, kan fremstilles ved en hvilken som helst af de kendte fremgangsmåder til catamersyntese. De foretrukne fremgangsmåder, når monomererne er aminosyrer, er at anvende fastfasemetoden, der er beskrevet i beskrivelsen til AU patentbeskrivelse nr. 25429/84, hvor hver catamer syntetiseres på en polyethylenbærer.

Det følgende er en detaljeret beskrivelse af en udførelsesform af den foreliggende opfindelse, når den anvendes til bestemmelse af en mimotop til en ligand, der er i stand til at binde til en receptor, når denne receptor er et antistof. I denne forbindelse omtales liganden almindeligvis som epitopen til antistoffet. Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse udføres fortrinsvis ved screening af en flerhed af syntetiserede catamerer mod et antistof, som har interesse. Antistoffet vil ideelt være et monoklonalt antistof, som kan fremstilles ved en hver af de sædvanlige fremgangsmåder. Polyklonalt antiserum fra mennesker og dyr kan anvendes, hvis en monoklonal antistofkilde med de ønskede egenskaber ikke står til rådighed, dog kan analyser af de resulterende data kompliceres, idet de observerede reaktioner kan hidrøre fra mere end ét monoklonalt antistof. Ved anvendelse af polyklonalt antiserum, kan det være nødvendigt at reducere anti-

stoffets uensartethed ved anvendelse af metoder, der er velkendt for fagfolk inden for området, f.eks. iso-elektrisk fokusering, HPLC-baseret chromatografi eller affinitetschromatografi.

Almindelige indikationer tyder på, at en epitop kan efterlignes af en catamer, der almindeligvis er ca. 6 monomerer lang, når monomererne stammer fra gruppen af alpha-aminosyrer. Det må dog forstås, at den foreliggende opfindelse ikke er begrænset til sekvenser, der er dannet af seks monomerer. 6-catamerens evne til at være mimotop for epitopen er ikke kritisk afhængig af en hver position, der har en særlig monomer. Det har vist sig, at visse positioner i de fleste mimotoper ikke er begrænset til en enkel bestemt monomer med hensyn til binding med receptoren.

#### A. Syntese af en flerhed af catamerer.

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:

$$Y-D_2-D_1-Lk-(\text{fast bærer}),$$

hvor Lk betegner et linkermolekyle, der tilvejebringer en passende endegruppe til kondensering af monomererne til den faste bærer.  $D_1$  og  $D_2$  repræsenterer angivne positioner, som er besat af monomerer, der er udvalgt fra kendte monomergrupper, men som forandres systematisk mellem catamererne. Det bør bemærkes, at den gruppe af monomerer, der anvendes til den angivne  $D_1$ -position, ikke behøver at være den samme gruppe af monomerer, der anvendes i den angivne  $D_2$ -position. Y i den generelle formel betegner endegruppen af catameren, og kan være, men er ikke begrænset til, f.eks. et hydrogenatom eller en acetylgruppe. Y kan også betegne et andet molekyle, der er koblet til catameren til bevaring af særlige egenskaber i de molekulære omgivelser af en peptidbinding ved den angivne aminoterminalposition.

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

I den foreliggende udførelsesform forberedes bærerstavene så-

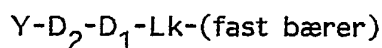
ledes, at monomererne kan kobles til dem ved kobling af et passende linkermolekyle.

Ved kobling til  $D_1$ -positionen vil hver stav blive behandlet med en reaktionsblanding, der kun indeholder en enkel monomer, såsom en beskyttende aminosyre eller lignende. I denne position vil hver af i monomererne blive koblet til j stave. Ved kobling til  $D_2$ -positionen behandles hver stav igen med en reaktionsblanding, der kun indeholder en enkel monomer, såsom en beskyttende aminosyre eller lignende. Hver af de j stave, som har en særlig monomer i  $D_1$ -positionen, vil få en forskellig monomer koblet til  $D_2$ -positionen. På denne måde vil en hver kombination af elementerne fra gruppen (grupperne) af monomerer forekomme i de  $i \cdot j$  stave.

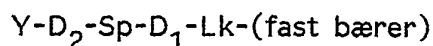
Derpå kobles den ønskede endegruppe Y under anvendelse af en passende kemi.

Efter syntese af flerheden af catamerer fjernes eventuelle sidekædebeskyttende grupper fra catamererne ved anvendelse af passende metoder, og de stavkoblede catamerer vaskes.

En foretrukken udførelsesform for opfindelsen er at syntetisere mere end ét sæt flerheder af catamerer til hjælp ved analysen af data. Såvel som syntetisering af catamerer med den generelle formel



som beskrevet ovenfor, kan der således yderligere fremstilles grupper af catamerer med den generelle formel



hvor Sp betegner et afstandsmolekyle, der kan begrænse den relative orientering af monomererne ved de angivne positioner til en særlig geometrisk konfiguration(er). Afstandsmolekylet kan også velovervejet udvælges til at tillade en større fleksibilitet af den relative geometriske konfiguration mellem monomererne i de angivne positioner,  $D_1$  og  $D_2$ . Det skal bemærkes, at medlemmerne af gruppen af afstandsmolekyler kan fremstilles ved kondensation af mere end én monomer. Eksempler på afstandsmolekyler indbefatter, men er ikke begrænset til, glycin (ca. lineær udvidelse), beta-alanin (forøget fleksibilitet), prolin (tvungen bøjning), glycyl-prolin (udvidet bøjning, på anden side kendt som modsat bøjning i proteinstruk-

turterminologien) og o-aminobenzosyre (en planar bøjning).

Ved at analysere resultaterne fra disse grupper af catamerer kan det foretrukne rumlige forhold mellem monomererne i mimotoperne afledes, som det vil fremgå af de passende eksempler nedenfor.

5

#### B. Afprøvning af flerheden af catamerer.

Flerheden af catamerer, der fremstilles som i A ovenfor, kontaktes derefter med det særlige antistof, som har interesse. Reaktionen mellem antistoffet og hver catamer kan derefter påvises ved en hvilken som helst af de sædvanlige metoder, f.eks. radio-immunoanalyse (RIA). Den foretrukne fremgangsmåde til påvisning er imidlertid anvendelse af den velkendte ELISA-analyse (engelsk: enzyme-linked immunosorbent assay).

Ved slutningen af hver analyse kan antistofferne fjernes fra catamererne ved f.eks. vask med en opløsning af 8M urinstof, 0,1% 2-mercaptoethanol og 0,1% natriumdodecylsulphat, efterfulgt af adskillige vask i phosphatpufferet saltopløsning. På denne måde kan flerheden af catamerer anvendes til afprøvning med mange andre antistoffer.

20

#### C. Analyse af data

Ved afprøvning af en gruppe af catamerer med antistof er det fundet, at visse catamerer vil fremvise påviselig binding med antistoffet. Disse reagerende catamerer identificerer anvendelige kombinationer af elementer fra gruppen (grupperne) af monomerer. Disse kombinationer af monomerer er korte mimotoper, der ved forlængelse kan binde til antistoffet med en større affinitet eller ændre specificiteten. Analyse af data lettes meget ved at indbefatte et antal kontrolpeptider i syntesen, som hjælper til bestemmelse af væsentlige reaktioner. Yderligere analyser af dataene kan udføres på et antal forskellige måder. Disse indbefatter:

1. at hver af disse reagerende kombinationer af monomerer permuteres til dannelsen af en liste over catamerer, som kan omfatte mimotoper, der binder til paratopen; hver catamer i denne liste kan betragtes som en mulig mimotop;
2. at kandidater fra listen over reagerende monomerkombinationer udtages, og at der yderligere syntetiseres grupper af catamerer, i hvilke den kendte reagerende monomerkombination

35

holdes konstant, og yderligere monomer tilsættes systematisk ved begge ender; i eksemplet ovenfor vil en egnet gruppe af sådanne catamerer således omfatte catamerer med formlerne

5  $Y-D_3-A_2-A_1-Lk-(\text{fast bærer})$

og

$Y-A_2-A_1-D_3-Lk-(\text{fast bærer})$

10 hvor  $A_1$  og  $A_2$  betegner den reagerende monomerkombination fra de tidligere resultater, og  $D_3$  betegner en ny angiven position, hvor hver af elementerne i monomergruppen varieres systematisk, og

3. at resultaterne fra forskellige grupper af en flerhed af catamerer kombineres, og at resultaterne analyseres for at deducere  
15 en enkel monomersekvens eller et lille antal af sådanne sekvenser, som vil binde til det antistof, der har interesse. Analyse af disse data er mulig, idet de reagerende monomerkombinationer nu er kendte, når de ligger ved siden af hinanden, ligesom de reagerende monomerkombinationer, når der er særlige  
20 geometriske konfigurationer mellem dem. På denne måde kan disse data således aflæses til at forudsige mimotopens struktur, når den er bundet til antistoffet; denne fremgangsmåde vil være mest fordelagtig, når det antistof, der anvendes til afprøvning af flerheden af catamerer, er et monoklonalt antistof.

25 Den procedure, der er anført i 2. ovenfor, kan gentages, indtil der ikke opnås nogen yderligere forstærkning af bindingen ved yderligere forlængelse af mimotopen. Ideelt bør mimotopsekvensen afprøves ved regulær syntese og afprøvning af udskiftningsnet for mimotopen til opnåelse af den optimalt bindende mimotop til yderligere  
30 forlængelse, som beskrevet i AU patentbeskrivelse nr. 25428/84.

#### D. Syntese af udvalgte catamerer.

De udvalgte catamerer kan syntetiseres ved anvendelse af lignende fremgangsmåder som de, der er beskrevet i A. Efter at de  
35 udvalgte catamerer er blevet syntetiseret, bringes de til reaktion med det antistof, som har interesse. Det er derefter simpelt at udvælge den catamer, der bindes stærkest til antistoffet.

Binding af mimotopen med antistoffet kan yderligere forstærkes ved at syntetisere en yderligere flerhed af catamerer, der er baseret

på sekvensen af den stærkest bindende mimotop. Denne flerhed af catamerer består af systematisk tilføjelse af afstandsmolekyler (-Sp-) i alle positioner af mimotopen, og hvor det er muligt, systematisk erstatte hver monomer i catameren med dens optiske isomer. Afprøvning af denne gruppe af catamerer med antistoffet vil give uvurderlig information om den relative orientering af monomererne og deres stereokemi, som det kræves for binding til antistoffet.

I de nedenfor anførte eksempler 1, 2, 3 og 4 bestemmes mimotoperne til det antigen, mod hvilket forskellige monoklonale antistoffer er frembragt. Den fastlagte monomergruppe er gruppen af almindelige L-alpha-syrer, med mindre andet er angivet. Linkermolekylet, -Lk-, er 3-amino-N<sup>1</sup>(6-aminohexyl)-propanamid, og endegruppen, Y-, er en acetylrest. I eksempel 5 nedenfor bestemmes mimotopen til en antigenisk determinant af humanchorionisk gonadotrophin, der inducerer et monoklonalt antistof. Linkermolekylet, -Lk-, er det samme som det, der anvendes i tidligere eksempler. Endegruppen, Y-, er enten  $\beta$ -alanyl- $\beta$ -alanin eller  $\beta$ -alanin. Den fastlagte monomergruppe udvides til at indbefatte D-optiske isomerer af almindelige alpha-aminosyrer og adskillige ualmindelige aminosyrer. I eksempel 6 nedenfor fastlægges mimotopen til et receptorsted på virus. Linkermolekylet, -Lk-, er det samme som i tidligere eksempler. Endegruppen, Y-, er enten  $\beta$ -alanyl- $\beta$ -alanin eller  $\beta$ -alanin. Den fastlagte monomergruppe udvides, som beskrevet i eksempel 5.

#### 25 Eksempel 1

Der frembringes et monoklonalt antistof mod spermhvalmyoglobin under anvendelse af almindelige fremgangsmåder. Dette monoklonale antistof afprøves mod en catamergruppe med den generelle formel:



Tre par af de reagerende monomerer binder til catamererne med næsten samme reaktion og væsentlig højere end andre monomerpar. Sekvenserne er E-F, E-L og E-H..

35 Der syntetiseres en yderligere catamergruppe, der omfatter alle 4-catamerer, der kan fremstilles fra monomergruppen; glutaminsyre (E), phenylalanin (F), histidin (H) og leucin (L). Følgende catamerer viste sig at binde væsentlig højere end de resterende catamerer:

14

L-H-E-F

L-H-F-E

F-L-H-E

F-H-L-E

H-E-F-L

5

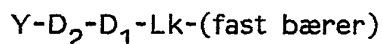
Denne lille gruppe af korte mimotoper kan nu blive kandidater til yderligere forlængelser.

10

### Eksempel 2

Der frembringes et monoklonalt antistof mod spermhvalmyoglobin under anvendelse af almindelige fremgangsmåder. Dette monoklonale antistof afprøves mod en catamergruppe med den generelle formel:

15

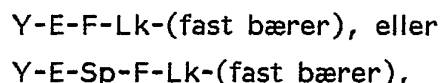


Tre par af de reagerende monomerer binder til catamererne med næsten samme reaktion og væsentlig højere end andre monomerpar. Sekvenserne er E-F, E-L og E-H.

20

Der syntetiseres yderligere seks catamergrupper under anvendelse af parrene E-F, E-L og E-H som udgangspunkter. Under anvendelse af E-F parret som et eksempel har catamererne i hver gruppe den generelle formel:

25

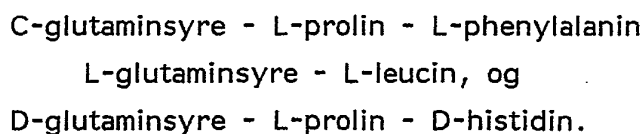


hvor Sp er et afstandsmolekyle fra gruppen af beta-alanin, glycin og L-prolin. Ydermere blev de L-optiske isomerer systematisk erstattet af de D-optiske isomerer af både glutaminsyre og phenylalanin.

30

De catamerer, der gav de bedste reaktioner fra hver catamergruppe, var

35



Disse resultater viser, at monomererne F og H placeres bedre ikke nærliggende E; ydermere placeres E og L bedst nærliggende.

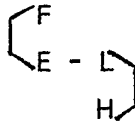
De optiske isomerer i catamererne, der giver den bedste binding, indicerer en struktur for en stærkt bindende mimotop, som beskrevet nedenfor. Det skal bemærkes, at sperhvalmyoglobinmolekylet har et område, som svarer til den forudsagte mimotop. Tydeligvis bliver

5 denne forudsagte mimotop en kandidat til yderligere forlængelse.

Strukturen nedenfor er en to-dimensionel gengivelse af det rumlige forhold mellem aminosyrerne, F, E, L og H, når de er bundet til et monoklonalt antistof mod spermhvalmyoglobin (se eksempel 2). Det skal bemærkes, at dette kun er en illustration, som

10 ikke må blive fortolket på den måde, at den illustrerede catamer er plan. Ydermere skal de bindinger, der forener F og E samt L og H, forstås som repræsenterende en afstand, der er større end en peptidbinding.

15



Når denne struktur sammenlignes med røntgenkrystallografi-strukturen af myoglobin, er det især af væsentlig interesse at bemærke, at sekvensen -F-L-E-L- findes i positionerne 135 til 138, og at der er to histidinenheder (i position 81 og 82) i umiddelbar nærhed af glutaminsyren i position 136. Dette giver en betragtelig tiltro til den foreslåede struktur af epitopen af det monoklonale

20 antistof.

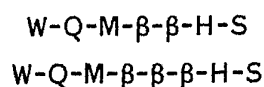
25

### Eksempel 3

En mimotop til et monoklonalt antiserum, der var frembragt mod mund- og klovsvygevirus, blev defineret til sekvensen W-Q-M-G-H-S.

30 Der blev syntetiseret en serie catamerer, hvori en beta-alaninenhed systematisk indførtes mellem monomererne. Sekvensen W-Q-M-β-G-H-S gav en reaktion, der er væsentlig større end basissekvensen, hvor β repræsenterer beta-alanin. Det har yderligere vist sig, at der opnås fremragende binding til antistoffet med sekvenserne:

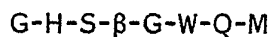
35



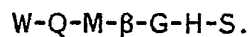
hvilket indicerer, at glycin i udgangsmimotopen er et afstandsmole-

kyle mellem to reagerende elementer, W-Q-M og H-S. Det fremgår således tydeligt, at mimotopen er fremstillet af to dele. Ydermere er foreningen af disse dele ikke kritisk for, om mimotopen er i stand til at reagere stærkt med antistoffet.

- 5 Der syntetiseres en yderligere catamergruppe, hvori den D-optiske isomer systematisk erstatter den L-optiske isomermonomer i udgangsmimotopen. Resultaterne fra afprøvning med antistoffet viser, at ved stærkest binding bør monomererne i hver element have samme optiske isomer, og at der er en præference for, at monomererne i
- 10 W-Q-M-elementet er de D-optiske isomerer, hvorimod monomererne i elementet H-S bør være L-optiske isomerer. Disse resultater kan forklares til at betyde, at epitopen til antistoffet er fremstillet af to nærliggende anti-parallele kæder, hvori kæderetningen er M-Q-W og i den anden kæde er H-S. Denne forudsigelse fører til det forslag,
- 15 at en anden mimotop til det monoklonale antistof vil være:



- Denne syntetiseres og viser sig at reagere med sammenlignelig
- 20 binding til antistoffet som den stærkt bindende catamer:



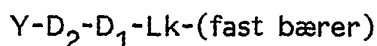
- Den måde, hvorpå de to elementer W-Q-M og H-S er forenet, er
- 25 således irrelevant for evnen til at kombinere med antistoffet så længe, at deres relative positioner forbliver den samme. Den bedste mimotop som en potentiel immunogen vil være en, hvori disse elementer er forenet fra begge sider for at minimere tilpasningsmobiliteten.

30

#### Eksempel 4

Et monoklonalt antistof (SO93-7), der er frembragt mod mund- og klovsvygevirus, afprøves med catamerer med den generelle formel:

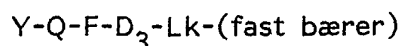
35



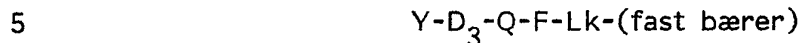
Det viser sig, at dipeptid Q-F reagerer væsentlig stærkere med det monoklonale antistof end med nogen andre dipeptider.

Der syntetiseres yderligere catamergrupper med de generelle

formler:

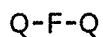
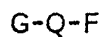
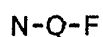
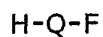


og

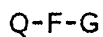


når disse catamergrupper omsættes med antiserum viser det sig, at følgende catamerer reagerer væsentlig bedre med det monoklonale antistof end nogle af de andre:

10



15



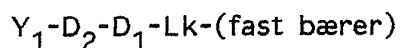
Denne lille gruppe af korte mimotoper kan nu blive kandidater til yderligere udvidelser.

20

#### Eksempel 5

Der frembringes et monoklonalt antistof (S218-4) mod human-chorionisk gonadotrophin under anvendelse af almindelige fremgangsmåder. Dette blev afprøvet med catamerer med den gerelle formel:

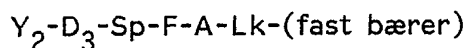
25



hvor  $Y_1$ - betegner  $\beta$ -alanyl- $\beta$ -alanin. Det viser sig, at dipeptidet i de angivne positioner, som binder stærkest til det monoklonale antistof, er F-A.

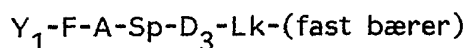
30

Der syntetiseres yderligere catamergrupper med de generelle formler:



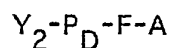
og

35

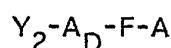


hvor Sp betegner et afstandsmolekyle, som er et element fra gruppen [ingen,  $\beta$ -alanin], og  $Y_2$ - betegner endegruppen,  $\beta$ -alanyl. Den monomergruppe, der anvendes i den angivne position  $D_3$ , udvides til

at indbefatte både L- og D-optiske isomerer af de almindelige alpha-aminosyrer og de usædvanlige aminosyrer,  $\alpha$ -aminosmørsyre,  $\gamma$ -aminosmørsyre, L-norleucin, sarcosin, ornithin, L-norvalin, L-homophenylalanin,  $\beta$ -alanin. Når disse catamergrupper omsættes med det monoklonale antistof, viser det sig, at de catamerer, der reagerer stærkest, er:

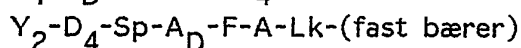
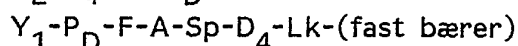
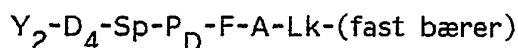


og

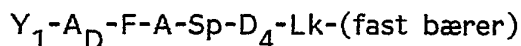


hvor  $P_D$  og  $A_D$  betegner de D-optiske isomerer af prolin henholdsvis alanin.

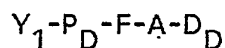
Der syntetiseres yderligere catamergrupper med de generelle formler:



og

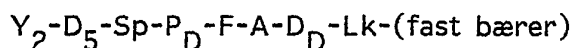


hvor den udvidede monomergruppe anvendes i den angivne position  $D_4$ . Når disse catamergrupper omsættes med det monoklonale antistof, viser det sig, at den catamer, der reagerer stærkest, er:

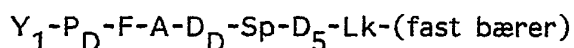


hvor  $D_D$  betegner den D-optiske isomer af asparaginsyre.

Der syntetiseres yderligere catamergrupper med de generelle formler:

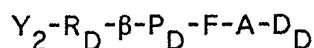


og



hvor den udvidede monomergruppe anvendes i den angivne position  $D_5$ . Når disse catamergrupper omsættes med det monoklonale antistof, viser det sig, at den catamer, der reagerer stærkest med antistoffet,

er:



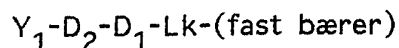
hvor  $\beta$  betegner  $\beta$ -alanin og er blevet indbefattet i syntesen af catameren som et afstandsmolekyle.

Forudbehandling af det monoklonale antistof med humanchorionisk gonadotrophin fjerner fuldstændigt antistoffets evne til at reagere med catameren  $\beta-R_D-\beta-P_D-F-A-D_D$ , hvilket således illustrerer mimotopens specificitet.

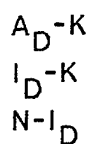
#### Eksempel 6

Dette eksempel illustrerer anvendelse af opfindelsen til påvisning af en mimotop til en receptor, der ikke er et antigen, imod hvilket et antistof er blevet frembragt. I dette eksempel påvises mimotoper i en receptor, til hvilken en virion binder. I dette tilfælde er afprøvningssystemet til påvisning af binding til catamererne blevet modificeret. I dette eksempel får de syntetiserede catamerer lov til at reagere med influenzaviruspartikler (stamme A-Shearwater/1/72). Efter reaktion vaskes catamererne for at fjerne ubundne viruspartikler. Tilstedeværelsen af bundne viruspartikler påvises ved at omsætte med et polyklonalt antistof (S227-1), der er blevet frembragt mod hæmagglutinin fra influenzavirus A/Shearwater/1/72. De antistoffer, der har reageret med den bundne virus, påvises på almindelig måde ved hjælp af ELISA.

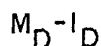
Der syntetiseres en catamergruppe med den generelle formel:



hvor endegruppen  $Y_1$  er  $\beta$ -alanyl- $\beta$ -alanin. Den monomergruppe, der anvendes i de angivne positioner  $D_1$  og  $D_2$ , består af D- og L-optiske isomerer af almindelige alpha-aminosyrer. Når catamererne omsættes med en suspension af influenzavirionerstamme A/Shearwater/1/72, binder partikler til dipeptiderne ved de anførte positioner:

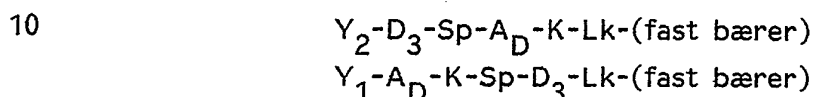


og

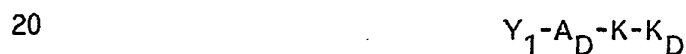


hvor suffikset "D" betegner den D-optiske isomer af den anførte aminosyre. Efter fjernelse af den bundne virus fra catamererne, omsættes catamererne med polyklonalt antistof S227-1 i samme koncentration som den, der anvendes til at påvise virus, for at sikre at de  
 5 toppe, der findes, skyldes binding af virus snarere end binding af polyklonalt antistof.

Der syntetiseres yderligere catamergrupper med den generelle formel:



hvor  $Y_1$ - betegner  $\beta$ -alaninendegruppen og Sp betegner en bestanddel fra gruppen af afstandsmolekyler, [ingen,  $\beta$ -alanin]. Den monomergruppe, der anvendes til at angive position  $D_3$ , er den udvidede  
 15 gruppe, der er beskrevet i eksempel 5. Når disse catamergrupper omsættes med influenzavirus stamme A/Shearwater/1/72 binder virionerne stærkest til catameren:



Dette eksempel viser, at opfindelsen kan anvendes til bestemmelse af mimotoper på receptormolekyler og ligander i almindelighed. Udførelse af fremgangsmåden begrænses kun ved evnen til at påvise  
 25 tilstedeværelse af binding til catamergruppen.

30

35

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til påvisning eller bestemmelse af den monomersekvens, som er topografisk ækvivalent med den ligand, der er komplementær til en særlig receptor, som er af interesse, k e n -  
 5 d e t e g n e t v e d ,

1. at der syntetiseret en flerhed af catamerer, hvor hver catamer har den generelle formel:

$$D_2-D_1$$

10

hvor  $D_1$  betegner en designeret monomer, der udvælges fra en første monomergruppe og  $D_2$  betegner en designeret monomer, der udvælges fra en anden monomergruppe, som kan være den samme som eller  
 15 forskellig fra den første monomergruppe, hvilken flerhed af catamerer omfatter catamerer, hvori hver designeret monomer systematisk varieres til at indeholde enheder fra en respektiv gruppe af monomerer,

15

2. at hver catamer kontaktes med receptoren, som er af  
 20 interesse, og
3. at forekomst eller fravær af binding mellem hver catamer og denne receptor påvises eller bestemmes.

20

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t v e d ,  
 at den yderligere omfatter:

25

- a. at der syntetiseres en yderligere flerhed af catamerer, hvor hver catamer har den generelle formel:

$$D_3-D_2-D_1, \text{ eller } D_2-D_1-D_3$$

30

hvor  $D_1$  og  $D_2$  betegner det samme, som anført ovenfor i krav 1, og  $D_3$  betegner en designeret monomer, som udvælges fra en tredje monomergruppe, der kan være den samme som eller forskellig fra enten den første eller den  
 35 anden monomergruppe, og

35

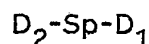
- b. at trin 2 og 3, som defineret i krav 1, udføres på denne yderligere flerhed af catamerer.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t v e d ,  
 at trin a. og b. gentages med systematisk addition af yderligere

monomerer til catamererne.

4. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at den yderligere omfatter:

- 5 a. at der syntetiseres en flerhed af yderligere catamerer, hvor hver yderligere catamer har den generelle formel:



10 hvor  $D_1$  og  $D_2$  betegner det samme, som defineret i krav 1, og Sp betegner et afstandsmolekyle, der kan ændre den relative orientering af monomererne  $D_1$  og  $D_2$ , og

- b. at trin 2 og 3, som defineret i krav 1, udføres på denne flerhed af yderligere catamerer.

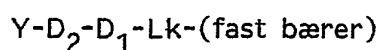
15 5. Fremgangsmåde ifølge krav 2 eller 3, k e n d e t e g n e t ved, at trin a. og b. gentages med systematisk indføring af et afstandsmolekyle, Sp, som defineret i krav 4, i alle mulige positioner af de yderligere flerheder af catamerer, som defineret i krav 2 eller 3.

20 6. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-5, k e n d e t e g n e t ved, at den yderligere omfatter systematisk erstatning af monomererne i enhver af de catamerer, der er refereret til ovenfor, med deres optiske isomerer, enten individuelt eller i monomerkombinationer, og at trin 2 og 3, som defineret i krav 1, igen udføres.

25 7. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-6, k e n d e t e g n e t ved, at den yderligere omfatter systematisk erstatning af monomererne i enhver af de catamerer, der binder med den receptor, som har interesse, enten individuelt eller i monomerkombinationer med andre monomerer, der udvælges fra den (de) respektive gruppe (grupper) af monomerer, og at trin 2 og 3, som defineret i krav 1, igen udføres.

30 8. 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:

35



hvor  $D_1$  og  $D_2$  betegner det samme, som defineret i krav 1, Lk betegner et linkermolekyle, og Y betegner catamerens endegruppe.

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

$$5 \quad Y-D_2-Sp-D_1-Lk-(\text{fast bærer})$$

hvor  $D_1$  og  $D_2$  betegner det samme som defineret i krav 1,  $Sp$  betegner det samme som defineret i krav 4, og  $Lk$  og  $Y$  betegner det samme som defineret i krav 8.

10

15

20

25

30

35