

(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: **C 07 K 14/195 C 07 K 16/12 C 07 K 17/02**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1990 01829**

(22) Indleveringsdag: **1990-07-31**

(24) Løbedag: **1989-01-31**

(41) Alm. tilgængelig: **1990-07-31**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2003-02-17**

(86) International ansøgning nr: **PCT/US89/00388**

(86) International indleveringsdag: **1989-01-31**

(85) Videreførelsesdag: **1990-07-31**

(30) Prioritet: **1988-02-01 US 150688**

(73) Patenthaver: **American Cyanamid Company, One Portland Square, Portland, Maine 04101, USA**

(72) Opfinder: **Garvin Bixler, 92 Squirrel's Heath Road, Fairport, NY 11450, Storbritannien**

Subramonia Pillai, 286 Vollmer Parkway, Rochester, NY 14623, USA

Richard Insel, 167 Oakdale Drive, Rochester, NY 14618, USA

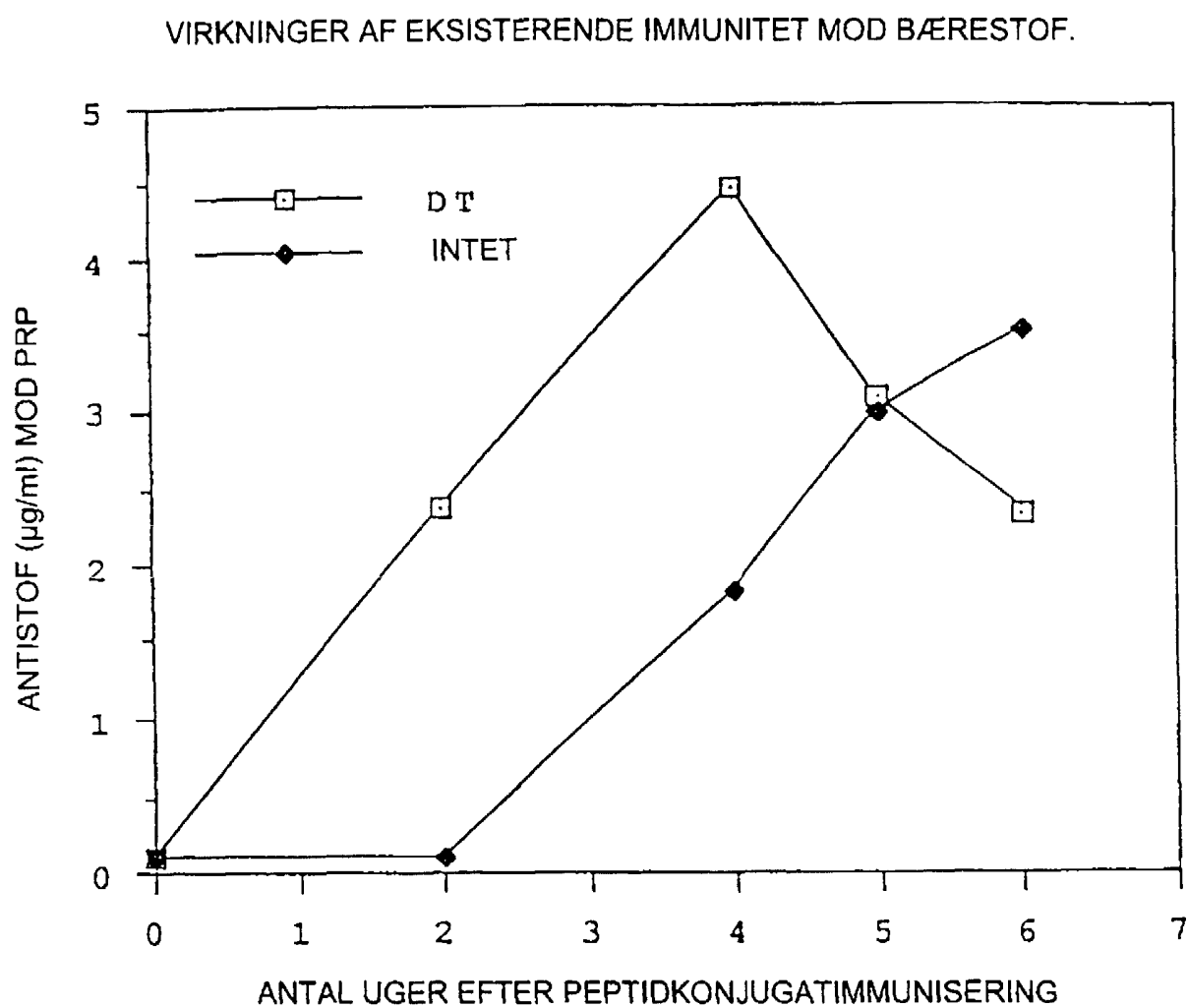
(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Oligopeptider, immunogene konjugater heraf med et antigen samt vacciner indeholdende disse konjugater**

(56) Fremdragne publikationer:
Infection and Immunity bind 55, side 1498-1502
EP A 245045

(57) Sammendrag:

Den forliggende opfindelse angår hidtil ukendte T-celleepitoper fra bakterieprodukter. Epitoperne ifølge opfindelsen kan anvendes ved fremstillingen af konjugater mellem epitoperne og medicinsk værdifulde antigener, haptener eller antigendeterminanter. Disse konjugater er i stand til at fremkalde antistofreaktioner mage til konjugater af antigener covalent koblet til bærestofproteiner, og de tilvejebringer i et vaccinepræparat en sikker og mere økonomisk konjugatvaccine.

*Fig. 5*

1. Opfindelsens område.

Den foreliggende opfindelse angår oligopeptider, immunogene konjugater heraf med et antigen samt vacciner indeholdende disse konjugater. Nærmere betegnet omfatter 5 vaccinerne et antigen, en antigendeterminant eller haptent konjugeret til en T-celleepitop af et bakterieprodukt. De her omhandlede vacciner er i stand til effektivt at fremkalde produktionen af beskyttende antistoffer imod de anvendte immunogener, medens det på samme tid undgås at anvende 10 større proteinbærestofmolekyler.

2. Opfindelsens baggrund.

Frembringelsen af en beskyttende immunreaktion imod et givet smitstof hos hvirveldyr afhænger til at begynde med af tilvejebringelsen af den hensigtsmæssige stimulans 15 af værtens immunsystem. Selve den smitsomme organisme tilvejebringer typisk talrige, immunstimulerende forbindelser, eller antigener, ved selve naturen af dens cellemembranmaterialer eller ved de stofskifteprodukter, som den frigiver i værtens legeme. Disse stoffer, sædvanligvis større molekyler, såsom proteiner, lipopolysaccharider eller glycoprotein, 20 erkendes af immunsystemet som fremmede og fremkalder én eller flere forskellige typer af reaktion fra værten i en anstrengelse på at fjerne eller uskadeliggøre den invaderende organisme. Antigenet kan stimulere sensibiliserede lymphocyter (T-celler), som tilvejebringer cellemedieret immunitet. 25 Alternativt kan et antigen også stimulere B-lymphocyter til initiering af syntesen og udskillelsen af frit antistof i blodet eller andre legemsvæsker (humoral immunitet) og kan operere med B-lymphocyter. Udviklingen af legemets beskyttende immunreaktion afhænger af opnåelse af et tærskelniveau 30 af stimulering af det ene eller begge disse systemer, dvs. aktiveringen af B-celler med samarbejde fra aktiverede T-celler (se nedenfor). Midlertidig immunitet imod infektion kan ofte tilvejebringes ved at give et individ i forvejen 35 dannede antistoffer fra et andet individ af samme eller en anden art, og dette er kendt som passiv immunitet. Et eksem-

pel på en sådan immunitet er den beskyttelse, som et foster eller en nyfødt får ved placentaoverføring af antistoffer fra moderen samt overføring gennem modermælk. Et andet eksempel er den pulje af gamma-globulin fra voksne, som kan anvendes til forhindring eller modifikation af virkningerne af udsættelse for mæslinger, skoldkopper, hepatitis, kopper og tetanus. Disse erhvervede antistoffer udnyttes i den sidste ende ved vekselvirkning med antigenerne eller kataboliseres af legemet, og derved går beskyttelsen til sidst tabt. En mere permanent form for beskyttelse gives ved aktive immuniseringer ved vaccination, som stimulerer værtsens eget immunsystem til frembringelse af beskyttende antistoffer ved aktivering af B- og T-lymphocytter. Kort fortalt giver vaccination en aktiv, beskyttende immunitet ved anvendelse af en harmløs eller ikke-virulent form af et antigen, f.eks. en dræbt eller genetisk ændret bakterie eller et isoleret polysaccharid eller glycoprotein fra cellevæggen eller kapslen af mikroorganismen, som en primær stimulans af immunsystemet. Dette fremkalder en ret langsom reaktion i antistofproduktion, som når et maksimum og tager af. Legemet er imidlertid blevet alarmeret om eksistensen af antigenet, og næste gang der sker en udsættelse, formodentlig med den levende, virulente organisme, iagttages der en sekundær reaktion, med en langt hurtigere og rigelig produktion af antistoffer. Denne anden reaktion vil typisk være tilstrækkelig til at forhindre mikroorganismen i at etablere sig tilstrækkeligt til at være i stand til at bevirke en maksimal infektion.

2.1.1. Mekanisme for B-celleaktivering.

Når et antigen kommer ind i legemet, kan i det mindste en del deraf optages og digerereres af phagocytiske macrofager, men andre dendritiske macrofager (antigenfremvisende celler eller APC) inkorporerer imidlertid antigenet i deres overflademembran med det formål at præsentere og aktivere lymphocytter. Tidlig i B-celleudviklingen udvikler hver enkelt celle en disposition for en speciel antigenbindende specifi-

citet og producerer antistof med specificitet for antigenet på sin celleoverflade. Den første præsentation af et antigen for en antigenspecifik B-celle resulterer i en langsomt stigende syntese af antistoffet, sædvanligvis domineret af
5 IgM. Dette er den primære reaktion, som er den type reaktion, som typisk stimuleres af vaccination, og den bevirker modningen af B-lymphocyten til en plasmacelle, som er yderst specialiseret for antistofproduktion. Ved et andet møde med samme antigen, almindeligvis i form af en ansporing af en
10 levende mikroorganisme, som bærer antigenet, har systemet allerede lært at erkende antigenet, og der sker en langt hurtigere og større reaktion (sekundær reaktion), domineret af IgG. Denne "oplæring" har sin basis i de længe levende hukommelsesceller, som fortsætter med at cirkulere efter
15 den første udsættelse for antigen, og disse hukommelses-B-celler bærer på deres overflader de immunoglobuliner, som binder stærkt med det geninvaderende antigen, hvilket hurtigt producerer nyt antistof og, under de bedste omstændigheder, forhindrer smitstoffet i at bevirke sygdom.

20 2.1.2. B- og T-cellesamarbejde.

Ovenstående diskussion præsenterer, på en meget almen måde, mekanismen for B-cellestimulering og antistofproduktion. I realiteten fungerer B-cellerne imidlertid ikke fuldstændigt uafhængigt ved frembringelsen af en beskyttende
25 reaktion. Selv om T-celler ikke selv udskiller antistof, er en type af T-celle, hjælper-T-celler, hyppigt nødvendige som assistance ved stimuleringen af B-cellen, fordi vekselvirkningen af visse antigener med overfladebundne antistoffer alene hyppigt er utilstrækkelig til stimulering af B-cel-
30 levækst og udskillelse af opløseligt antistof. Hjælper-T-cellerne vekselvirker også med og erkender antigener på overfladen af antigenfremvisende macrofager og udvikler antigenerkendelse. Derefter erkender T-cellerne antigen på overfladen af macrofager og medierer aktivering og differentering af hvilende B-celler. Via udskillelsen af opløselige
35 faktorer forøger B-cellevækstfaktorer antallet af aktiverede

B-celler ved vekselvirkning med deres overfladereceptorer, og en modningsfaktor standser formering og stimulerer differentieringen til antistofudskillende plasmaceller.

Visse specifikke typer af antigener skal engagere T-celleassistance ved fremkaldelse af den rigtige reaktion fra T-celler. Sagt alment er sådanne antigener, hvori en determinant kun forekommer én gang pr. molekyle, såsom et asymmetrisk protein, stærkt afhængige af T-cellevekselvirkning og må sætte sin lid til sine andre determinanter eller T-celleepitoper på molekylet for at blive erkendt af T-celler. Derefter sender T-cellen formodentlig til B-cellen et ekstra signal, som hjælper antigenstimuleringen af B-cellerne til at blive mere effektiv.

2.2. Bærestofeffekt.

Visse typer af molekyler, såsom små peptider eller haptener, er af naturen dårligt immunogene eller svagt immunogene, idet de ikke frembringer en antistofreaktion under nogen omstændigheder. Andre molekyler, såsom visse bakteriekapselpolysaccharider (CP) kan være stærkt immunogene hos voksne, men det dårligt udviklede immunsystem hos børn har ikke held til at frembringe en passende beskyttelsesreaktion.

For at undgå de problemer, som man møder ved frembringelse af en immunreaktion med svagt immunogene molekyler, f.eks. små peptider, haptener og CP, er der blevet gjort forsøg på at forøge deres immunogenicitet ved at binde dem til "bærestof"-molekyler. Disse bærestoffer er mest almindeligt store immunogene proteiner, og den tilsigtede virkning af disse konjugater er at efterligne den T-cellesamarbejdsvirkning, som indtræder med naturligt immunogene molekyler. Med andre ord vil polysaccharidet covalent bundet til et bærestof fremkalde T-celledeltagelse i antistofproduktion som følge af T-cellens reaktion på tilstedeværelsen af determinanterne på bærestoffet. Vekselvirkningen mellem T- og B-cellerne vil derefter skride frem på den sædvanligvis iagttagne måde, som skitseret ovenfor med henblik på store, immunogene proteiner. Ved at engagere T-cellerne med bæ-

stofdeterminanter vil B-cellerne begynde antistofproduktion ikke alene mod selve bærestoffet, men også mod det bundne polysaccharidmolekyle. Denne tilnærmelse til forøgelse af immugeniciteten af små eller dårligt immunogene molekyler er blevet udnyttet med godt resultat i årtier (se f.eks. 5 Goebel et al., J. Exp. Med. 69, 53, 1939), og der er beskrevet mange vaccinepræparater, hvori rensede kapselpolymere er blevet konjugeret til bærestofproteiner for at skabe mere effektive vaccinepræparater ved udnyttelse af denne 10 "bærestofeffekt".

F.eks. har Schneerson et al., (J. Exp. Med. 152, 361-376, 1980) beskrevet *Haemophilus influenzae* b-polymer-proteinkonjugater, som giver immunitet mod angreb af sygdomme forårsaget af denne mikroorganisme. Hensigten med 15 konjugeringen har været at overvinde den aldersbetingede, immunologiske opførsel af kapselpolymere hos børn. Polymerene er blevet konjugeret til en række forskellige proteiner, herunder serumalbumin, *Limulus polyphemus*-hæmocyanin og diphtheriatoxin, ved hjælp af et tilknytningsmiddel, såsom 20 adipinsyredihydrazid.

Det er blevet vist, at konjugater af PRP (polyribosyl-ribitolphosphat, en kapselpolymer i *H. influenzae* b) er mere effektive end vacciner baseret på polysaccharidet alene (Chu et al., Infect. Immun. 40, 245, 1983; Schneerson et 25 al., Infect. Immun. 45, 582-591, 1984). Det er også blevet vist, at konjugeringen omgår den dårlige antistofreaktion, som sædvanligvis iagttages hos børn, når de immuniseres med et frit polysaccharid (Anderson et al., J. Pediatr. 107, 346, 1985; Insel et al., J. Exp. Med. 158, 294, 1986).

30 Geyer et al. (Med. Microbiol. Immunol. 165, 171-288, 1979) har fremstillet konjugater af visse kapselpolysaccharidfragmenter fra *Klebsiella pneumoniae* koblet til en nitrophenylethylaminlinker ved reduktiv aminering, og den derivatiserede sukkerart er derefter blevet knyttet til proteiner 35 ved anvendelse af azokobling.

2.1.1.1. Bærestofproteiner.

Det er i vid udstrækning accepteret, at anvendelsen af bærestofprincippet udgør en effektiv metode til forbedring af vacciner indeholdende kapselpolymere. Disse polymer-protein-konjugater har imidlertid også deres ulemper, især til human anvendelse. F.eks. er antallet af proteiner, som er etisk accepteret til anvendelse som potentielle bærestofproteiner til indgivelse til mennesker, relativt begrænset. De to primære proteiner, som i øjeblikket er til rådighed til human anvendelse, er tetanustoxoid og diphtheriatoxoid. Et andet værdifuldt bærestofprotein er CRM₁₉₇, et protein, som har en enkelt aminosyreændring i forhold til nativt diphtheriatoxin, men som af naturen er ikke-toksisk, og som bibeholder en immugenicitet praktisk taget identisk med den hos det native protein. Talrige hensyn påvirker også rutineanvendelsen af disse kendte bærestofproteiner. F.eks. betyder det begrænsede antal til rådighed værende proteiner, at et stort antal vaccineprodukter vil være baseret på ét af disse proteiner, og flere vaccinationer med materialer konjugeret med dette begrænsede antal bærestoffer forøger sandsynligheden for, at der kan indtræde uønskkelige reaktioner mod disse proteiner efter gentagen immunisering. Tilstedeværelsen af i forvejen eksisterende antistoffer kan også tilskynde til uheldige, lokale eller systemiske, immunologiske overfølsomhedsreaktioner. Endvidere eksisterer der også den mulighed, at et protein indeholdt i konjugatet kan krydsreagere med normalt værtsvæv, hvorved muligheden for fænomener af autoimmuntypen opstår. Det er også muligt at fænomenet epitopisk undertrykkelse kan opstå med anvendelsen af konjugatvaccine. Kort fortalt iagttages dette fænomen, som først er beskrevet for nøglehullimpethæmocyankonjugater af Herzenberg et al. (J. Exp. Med. 155, 1741, 1982) og data rapporteret for tetanustoxoidkonjugater af Joliet et al. (Biochem. Biophys. Res. Comm., 117, 359, 1983) og Schulte et al. (J. Immunol. 135, 2319, 1985), når immunitet mod et protein, som er indeholdt i konjugatet, allerede eksisterer

hos den vaccinerede person, og det griber ind med frembringelsen af en reaktion mod det covalent koblede polysaccharid. Selv om dette endnu ikke er dokumenteret hos mennesker, kan denne undertrykkelse (hvis den indtræder) potentielt have
5 alvorlige implikationer ved udviklingen af konjugatvacciner.

Endelig er der adskillige iboende vanskeligheder, fordi proteinerne er produkterne fra en biologisk proces. Som et produkt fra et biologisk system vil der for det første være en uundgåelig variation fra portion til portion, og
10 denne variation kan potentielt ændre de T-celleafhængige karakteristika af proteinet eller dets samlede antigenicitet. Derfor er det nødvendigt med en strengere overvågning af produktionen med en ledsagende forøgelse i omkostninger. For det andet er der de indlysende forøgede omkostninger,
15 som er forbundet med fremstillingen og rensningen af et biologisk produkt.

Det er tydeligt, at der er et behov for et alternativ til de for tiden tilgængelige konjugatvacciner, hvilket alternativ vil undgå de immunologiske vanskeligheder, som
20 er forbundet med anvendelsen af disse vacciner, og dog bibeholde praktisk samme immugenicitet som de kendte, effektive vacciner. Det er nu blevet vist, at det er muligt at opnå en sådan vaccine ved konjugeringen af et antigen, en antigen-determinant eller haptent med en T-celleepitop af et bakterieprodukt.
25

2.3. T-celledeterminanter.

For øjeblikket er det endnu ikke klart, hvorledes T-celler erkender proteiner, eller hvad T-cellen erkender som en immunogen determinant.

30 I nogle år har der været almindelig enighed om, at proteindeterminanter, som binder antigenantistof, udviser to forskellige opbygninger. Determinanter i et protein kan eksistere som korte segmenter af den primære sekvens indeholdende aminosyrer direkte bundet ved hjælp af peptidbindinger.
35 Sådanne determinanter er blevet betegnet "sekventielle" eller "kontinuerte" determinanter. Alternativt kan en deter-

minant være sammensat af aminosyrer, som i den primære sekvens sidder i afstand fra hver andre, men som rumligt er tæt ved hverandre på grund af sekundær foldning. Determinanter, som udviser denne opbygning, er blevet betegnet "topografiske" eller, mindre flertydigt, "diskontinuerte" determinanter. Desuden er der almindelig enighed om, at antistoffer hos et protein erkender tilgængelige overfladeregioner, som er konformationelt afhængige, og som har en minimumlængde på 5-7 aminosyrerester.

10 T-celleerkendelse af proteiner er en mere kompleks proces end antistofbinding, og følgelig forstås den mindre klart. T-celler er almindeligvis blevet betragtet som erkendende kontinuerede determinanter. For mange år siden blev det vist, at T-celler kunne erkende både den native og den
15 denaturerede form af et protein, medens antistof ikke kunne (Maizels et al., Eur. J. Immunol. 10, 509, 1980). Denne erkendelse er blevet fortolket som visende eksklusiv erkendelse af sekventielle determinanter af T-celler og som visende en dichotomi mellem T- og B-celleerkendelse af proteiner
20 (Maizels et al., supra). Selv om dette ikke er afgjort, holder man imidlertid stadigvæk fast ved den forestilling, at T- og B-celler erkender fundamentalt forskellige strukturer (Benjamin et al., Ann. Rev. Immunol. 2, 67, 1984).

Kontroversen om, hvad der erkendes som en determinant
25 af T-celle, udstrækker sig også til, hvorledes en T-celle opfatter et protein. Det er meget klart fastslået, at immunsystemet erkender et protein på en genetisk begrænset måde, og at T-celler opfatter proteiner i sammenhæng med et Ia-molekyle på overfladen af en celle, som frembyder et antigen.
30 Det er blevet foreslået, at APC møder proteinet først, internaliserer det og digererer proteinet til mindre fragmenter. De små fragmenter af det oprindelige protein eksprimeres derefter i sammenhæng med Ia på overfladen af en APC, hvor det kan erkendes af T-celler. Derfor ville T-cellen kun se
35 et "behandlet" peptidfragment.

Selv om det stadigvæk ikke er klart, hvad en T-celle

opfatter, er der enighed mellem adskillige grupper, som anvender en mangfoldighed af modeller, om, at en region på 7-17 aminosyrerester er nødvendig til erkendelse. Så tidligt i 1972 blev det vist, at en poly-L-lysinpolymer på 7 rester fremkalder hypersensitivitet af den forsinkede type hos marsvin (Schlossman, Transplant. Rev. 10, 97, 1972). Senere studier med en mangfoldighed af naturlige proteiner, herunder fibrinopeptid, influenzahæmagglutinin, cytochrom, lysozym, ovalbumin og myoglobin, har angivet en minimal peptidstørrelse for T-cellestimulering på 7-17 aminosyrerester. Ved anvendelse af T-cellekloner med kendt specificitet har en størrelse på 10-14 rester vist sig at være nødvendig for en T-cellereaktion (Atassi et al., Biochem. J. 246, 307-312, 1987). Den større peptidstørrelse, som er nødvendig for T-celleerkendelse sammenlignet med de 5-7 rester, som er nødvendige til antistofbinding, kan genspejle de yderligere rester, som er nødvendige til ekspressionen af determinanten i sammenhæng med et Ia-molekyle.

Faktisk er vekselvirkningen mellem Ia og syntetiske peptider blevet påvist i adskillige modeller. En region, som er involveret i Ia-binding, en agretop, er blevet postuleret (Katz et al., J. Mol. Cell Immunol. 1, 3, 1983). Senere er plane membraner med Ia inkorporeret blevet anvendt til at præsentere syntetiske peptider for T-celler (Watts et al., PNAS 81, 7564, 1984). Senere studier har vist den direkte binding af syntetiske peptider til Ia-molekyler (Babbett et al., Nature 317, 359, 1985; Buss PNAS 83, 3968, 1986) som er blevet præsenteret på en genetisk begrænset måde afhængigt af oprindelsen af Ia-molekylerne (Groillet et al., Science 235, 865, 1987). I høj grad på grund af disse studier er det blevet postuleret, at en T-celleepitop vil bestå af en hydrofil region, som kan vekselvirke med T-celle-receptorer, og en hydrofob agretop, som binder til Ia-molekyler. Desuden antages det, at disse fragmenter, som repræsenterer kontinuerede determinanter, vil blive frembragt ved proteolytisk behandling af det oprindelige protein.

I et forsøg på at forudsige placeringerne af antistofbinding eller T-celledeterminanter er der blevet anvendt flere forskellige tilnærmelser. For nogle år siden har Hopp og Woods (PNAS 78, 3824, 1981; EP offentliggørelsesskrift
5 nr. 0.056.249; ZA patentskrift nr. 823.952) tildelt et numerisk hydrofob/hydrofil-indeks til hver af aminosyrerne og undersøgt den primære sekvens af adskillige proteiner i sammenhæng med dette indeks. Ifølge deres analyse korrelerer de kendte antistofbindingssteder i de undersøgte proteiner
10 med hydrofile regioner. En lignende tilnærmelse er blevet brugt af Kyte og Doolittle (J. Mol. Biol. 157, 105-132, 1982) ved anvendelse af et numerisk indeks med en lidt forskellig afstamning.

Senere er der blevet gjort forsøg på at korrelere
15 regioner i et protein med høj fleksibilitet eller segmentmobilitet med regioner af antistofbinding (Tainer et al., Nature 315, 327, 1985; Ann. Rev. Immunol 3, 501, 1985, Westhoff et al., Nature 311, 123, 1984). Ved denne tilnærmelse tilvejebringer data stammende fra røntgenstråle- eller
20 neutrontdiffraktionsmønstre en vurdering af den relative konformationelle variabilitet af en rest, hvilket udtrykkes som en atomtemperaturfaktor. En kurve over atomtemperaturfaktoren imod restnummeret angiver den relative mobilitetsgrad langs polypeptidkæden for et givet protein. Det er blevet
25 antaget, at regioner med høj mobilitet korrelerer med kendte antistofbindingssteder (Tainer et al., supra).

Af nogle grupper er T-celledeterminanter blevet betragtet som udvisende amfipatisk struktur, dvs. en determinant antages at være sammensat af en hydrofil region, som
30 binder til T-cellereceptoren, og ligeledes en hydrofob region til binding til Ia-molekyler. En T-celledeterminant i lysozym på 16 rester har vist sig at være sammensat af korte, på hinanden følgende serier af hydrofile rester (Allen et al., PNAS 81, 2489, 1984). Andre har imidlertid antydnet, at T-
35 celledeterminanter har en tilbøjelighed til at danne stabile spiralstrukturer, hvori de hydrofile rester stiller sig på

række på den ene overflade af spiralen, medens hydrofobe rester stiller sig på række på den modsatte overflade (DeLisi og Berzofsky, PNAS 82, 2489, 1985; Watts et al., PNAS 82, 7048, 1985). En algoritme til undersøgelse af en given proteinsekvens for regioner med en tilbøjelighed til dannelse af amfipatiske spiralstrukturer er blevet udviklet (DeLisi og Berzofsky, supra) og anvendt på adskillige proteinmodeller. I modsætning hertil fastholder nogle forskere, at T-celledeterminanter er associeret med β -drejninger i proteinet (Katz et al., J. Immunol. 135, 1386, 1985). Et klart billede af de faktorer, som er vigtige for forudsigelsen af T-celledeterminant, er endnu ikke dukket op.

Nogle grupper har erkendt betydningen af at medtage en T-celledeterminant som en del af en syntetisk vaccine. Ifølge US patentskrifter nr. 4.599.230 og 4.599.231 er der syntetiseret en peptidvaccine sammensat af T-celle- og B-celledeterminanter i overfladeantigenet fra hepatitis B-virus. Tilsvarende har en malariavaccine konstrueret af en T-hjælperepitop fra circumsporozoitproteinet været covalent bundet til B-cellehoveddeterminanten i dette protein (Good et al., Science 235, 1059, 1987). Det er interessant, at T-hjælperdeterminanten er blevet forudsagt ved hjælp af algoritmen ifølge DeLisi og Berzofsky, supra. Begge disse rapporter har anvendt T-celle- og B-celledeterminanter fra samme protein til konstruktion af vaccinen. I modsætning hertil har Leclerc et al., (Eur. J. Immunol. 17, 269, 1987) konstrueret en vaccine ved copolymerisation af et streptococpeptid, S-34, som i sin sekvens indeholder både T- og B-celledeterminanter, med et viruspeptid, som repræsenterer en B-celledeterminant fra hepatitis B-virus. T-celledeterminanten, som i dette tilfælde svarede praktisk taget til et nativt peptid, har givet viruspeptidet immogenicitet, hvorved det har fungeret som et bærestofmolekyle.

Infection and Immunity (Jolivet et al., 55:1498-1502, 1987) beskriver en syntetisk vaccine sammensat af fire syntetiske peptider, som er kemisk konjugeret til hinanden.

Peptiderne er dannet ud fra en parasitisk, en viral og to bakterielle komponenter (Streptococcus pyogenes M-protein og aminosyrerne 186-201 af diphtheriatoxin). I artiklen beskrives den mulighed, at to af peptiderne ved individuel afprøvning under visse betingelser (som ikke er beskrevet i artiklen) kan fungere som en T-celleepitop. Imidlertid er de to anførte peptider hverken toxiner, toxoider eller CRM. Faktisk undersøgte forfatterne et oligopeptid dannet ud fra diphtheriatoxin, men observerede en neutraliserende antistofreaktion, som er karakteristisk for en B-celleepitop snarere end en T-celleepitop. Diphtheriatoxin-peptidet blev ikke tilskrevet nogen T-celleaktivitet. Jolivet et al. anfører således intet om identiteten af T-celleepitoper i diphtheriatoxin, og det antydes heller ikke, at en T-celle-oligopeptid-epitop af et toxin, toxoid eller CRM kan anvendes effektivt som bærer til et ikke-relateret antigen.

EP patentansøgning nr. 0245045 beskriver immunogene konjugater bestående af fragmenter af kapselpolymerer og bakterielle toxiner eller toxoider. Imidlertid refererer denne ansøgning til hele toxiner eller toxoider, medens der ifølge den foreliggende opfindelse er identificeret mindre T-celleepitoper i disse molekyler. Desuden er antistofreaktionen observeret ved immunisering med de omhandlede konjugater rettet mod antigenet alene og ikke mod både bærepeptidet og antigenet. Det kan ikke ud fra EP 0245045 forudses, at ethvert lille fragment eller del af et bakterielt toxin, CRM eller toxoid kan fungere som bærer. EP 0245045 antyder hverken ønskeligheden af isolering af CRM-, toxin- eller toxoid-T-celleepitop-oligopeptider eller midler, ved hjælp af hvilke disse oligopeptider kan identificeres.

3. Resumé af opfindelsen.

Den foreliggende opfindelse angår et oligopeptid, som er ejendommeligt ved, at det i det væsentlige består af en T-celleepitop af et bakterietoxin, -CRM eller -toxoid, fortrinsvis diphtheriatoxin, tetanustoxin, pertussistoxin, -CRM eller -toxoid, især diphtheriatoxinet CRM₁₉₇. Sådanne

epitoper er anvendelige ved fremstillingen af vaccinepræparater, som i deres anvendelighed er analoge til tidligere kendte vacciner, som har udnyttet bærestofproteiner til forøgelse af antistofproduktionen. Blandt disse epitoper er
5 dem, som er isoleret fra bakterietoxiner, specifikt diphtheriatoxin eller krydsreaktivt materiale (CRM), og tetanustoxin. Som her og i patentkravene anvendt skal T-celleepitoper ifølge opfindelsen referere til T-celleepitoper som sådanne.

10 T-celleepitoperne kan anvendes i kombination med en ubeslægtet B-celledeterminant til opnåelse af signifikante mængder af antistofproduktion imod B-celledeterminanten uden produktion af antistoffer imod T-celleepitopen. Det har nu overraskende vist sig, at en sådan kombination kan
15 tilvejebringe praktisk taget lige så effektivt et niveau af antistofproduktion som den kombination af B-celledeterminant og bærestofprotein, som nu er gængs anvendt. Tilgængeligheden og den påviste anvendelighed af en sådan kombination gør det nu muligt at undgå de potentielt uønskelige, immunologiske
20 konsekvenser, som kan være forbundet med anvendelsen af vacciner baseret på bærestof-protein. Endvidere tilvejebringer anvendelsen af T-celleepitopen som sådan, i modsætning til et større peptid indeholdende epitopen, en økonomisk fordel, idet den let kan syntetiseres, samt en sikkerhedsfor-
25 del, idet anvendelsen af hele proteinet undgås.

Opfindelsen angår ligeledes et immunogent konjugat, som er ejendommeligt ved, at det i det væsentlige består af et antigen bundet til et oligopeptid ifølge opfindelsen. Konjugeringen af de to elementer i et vaccinepræparat mulig-
30 gør et mere effektivt niveau af antistofreaktion mod antigenet. Disse vacciner er anvendelige ved produktionen af antistoffer mod enhver type af antigen, herunder ikke alene antigener med relation til patogene organismer (bakterier, vira, parasitter), men også mod f.eks. allergener og cancer-
35 relaterede antigener. Konjugaterne er imidlertid især anvendelige ved formuleringen af vaccinepræparater under anven-

delse af antigener, som kun er svagt immunogene, dvs. de antigener, som traditionelt har måttet konjugeres til bærestofproteiner til opnåelse af et tilfredsstillende niveau af antistofproduktion.

- 5 Tilgængeligheden af disse konjugater muliggør ligeledes en metode til stimulering af en immunreaktion hos varmblodede dyr, ved hvilken metoden dyret får indgivet en immunogent effektiv mængde af et antigen, som har interesse, konjugeret til en T-celleepitop fra et bakterieprodukt.
- 10 Metoden omfatter beskyttende immunisering i den traditionelle forstand, dvs. podning imod et specielt mikroorganismepatogen, men den skal også forstås som omfattende enhver anden type behandling, hvor forøgelse i antistofproduktion vil være ønskeligt, og den her omhandlede metode kan f.eks.
- 15 anvendes ved stimulering af antistoffer imod tumorspecifikke eller tumorassocierede antigener eller ved produktionen af antistoffer imod gængs allergen. Metoden er også særlig anvendelig ved immuniseringen af menneskebørn, hvis immunsystem ikke er fuldt udviklet. Denne metode kan anvendes i
- 20 både terapeutisk og prophylaktisk sammenhæng.

Opfindelsen angår desuden en vaccine, som er ejendommelig ved, at den omfatter et immunogent konjugat omfattende mindst ét antigen bundet til et oligopeptid, som svarer til mindst én T-celleepitop af et bakterietoxin, -CRM eller

25 -toxoid i en farmaceutisk acceptabel grundmasse og eventuelt hjælpestof.

Opfindelsen angår endelig også et immunogent konjugat, som er ejendommeligt ved, at det i det væsentlige består af et oligopeptid ifølge opfindelsen konjugeret til en B-cellepitop fra et andet molekyle.

30

4. Beskrivelse af tegningen.

Fig. 1 viser den primære sekvens af CRM i standardkoden med et enkelt bogstav. De regioner, som har en tilbøjelighed til dannelse af amfipatiske spiralstrukturer, er

35 betegnet med tallet 1, og de sekvenser, som har potentiel T-cellepitopaktivitet, er understreget.

Fig. 2 viser HPLC-analyse af peptid 6. Fig. 2a viser et chromatogram af rått peptid 6. Stregen angiver regioner i pulje. Fig. 2b viser fornyet chromatografi af peptid 6 (fraktioner i pulje opnået ovenfor). Det syntetiske peptid er
5 blevet eleueret som beskrevet i teksten.

Fig. 3 viser udvalgte chromatogrammer af PTH-derivater af syntetisk peptid 6. Peptidet er blevet sekvenseret som beskrevet i teksten. Tallene angiver Edman-cyklusser. Spidserne a og b, som tjener som interne mærkestoffer, repræsenterer hhv. N',N-dimethyl-N'-phenylthiourinstof og N',N-diphenylthiourinstof. Cyklus 2 viser tilstedeværelsen af tyrosin, cyklus 5 valin, cyklus 9 isoleucin, cyklus 17 asparagin, cyklus 22 prolin og cyklus 28 glycin.
10

Fig. 4 viser Western pletanalyse af udvalgte peptid-konjugater, som er blevet påvist med monoklonalt antistof mod PRP. Fra venstre til højre indeholder kolonnerne molekylvægtstandarden (LMW), PRP (peptid 357-380), PRP (peptid 306-334), PRP-CRM, PRP og PRP kort (peptid 366-383).
15

Fig. 5 viser i diagramform virkningerne af forudgående udsættelse for bærestof, DT, på immunreaktionen mod PRP-(306-334).
20

Fig. 6 viser i diagramform en gengivelse af antistofreaktionen mod F-proteinkonjugater fra respiratorisk syncytialt virus (RSV).

25 5. Detaljeret beskrivelse af opfindelsen.

5.1. Bakterie-T-celleepitoper.

De forskellige udførelsesform for den foreliggende opfindelse er centreret om den erkendelse, at isolerede eller syntetiske T-celleepitoper fra bakterieprodukter kan tjene lige så effektivt som bærestofproteiner for antigener til immuniseringsformål. Det er ikke tidligere blevet vist, at T-celledeterminanten fra et bakterieprodukt, når den er bundet til et antigen, kan fungere på samme måde som det native helprotein konjugeret til samme antigen. Den viden, at en T-celleepitop fra et bakterieprodukt kan fungere lige
30 så effektivt som et bærestofprotein ved fremme af en anti-
35

stofreaktion, har åbnet døren for en helt ny klasse vacciner baseret på anvendelsen af de isolerede T-celleepitoper i kombination med en B-celledeterminant eller et helantigen.

Den efterfølgende diskussion tilvejebringer en detaljeret beskrivelse af midler til identifikation og isolering af hensigtsmæssige T-celleepitoper til anvendelse ifølge opfindelsen. Ud over at have tilsvarende immunogene egenskaber kan anvendelsen af epitoperne (i modsætning til anvendelsen af et intakt, nativt protein) undgå de potentielle problemer med hypersensitivitet, autoimmunitet og ekstensiv rensning, uden at det går ud over effektiviteten.

5.1.1. Teknik til identifikation af T-celleepitoper.

Selv om T-celleepitoper fra bakterieprodukter ikke tidligere er blevet identificeret, er der i litteraturen beskrevet flere metoder, som kan anvendes til identifikationen af én eller flere T-celleepitoper i et bakterieprodukt, som har interesse. F.eks. har DeLisi et al (PNAS 82, 7048, 1985; se også Margalite et al, J. Immunol. 138, 2213, 1987) antydnet, at potentielt epitopiske regioner kan lokaliseres ved identifikation af potentielle, amfipatiske α -spiral-regioner i molekylet. Rothbard et al. (Modern Trends in Human Leukemia VII, 1986) beskriver ligeledes en empirisk tilnærmelse til identifikation af T-celleepitoper ved undersøgelse af proteinets primære sekvens med hensyn til hydrofobicitet, ladning, polaritet og tilstedeværelsen af glycin- eller prolinrester. En sekvens, hvori en ladet rest eller en glycinrest efterfølges af to hydrofobe rester, antyder en potentiel T-celleepitop. Bixler et al. (Immunol. Comm. 12, 593, 1983; J. Immunogenet. 11, 245, 1984; J. Immunogenet. 11, 339, 1984) beskriver en strategi med syntese af overlappende, syntetiske peptider, som omfatter et helt proteinmolekyle, til afbildning af T-celleepitoper. En ny syntesemetode beskrevet af Gysen (Ciba Foundation Symposium 119, 130, 1986) muliggør syntese af en bred mangfoldighed af peptider i små mængder, hvilket tillader efterligningen af en mangfoldighed af potentielle bindingssteder, hvilket

på sin side tillader hurtig skandering af et molekyle. Mere traditionelle metoder, såsom enzymatisk eller kemisk digerering af proteiner, tilvejebringer peptidfragmenter, som let kan afprøves for T-celleaktivitet. F.eks. giver enzymer, såsom chymotrypsin, elastase, ficin, papain, pepsin eller trypsin, begrænsede og forudsigelige fragmenter ved spaltning af specificerede aminosyrebindinger. På samme måde frembringer kemiske forbindelser, såsom N-chlorsuccinimid, BPNS-skato, cyanogenbromid, myresyre eller hydroxylamin, også definerbare fragmenter ved deres indvirkning på proteiner. Tilstedeværelsen af den ønskede, T-cellestimulerende aktivitet i et givet fragment kan let fastslås, ved at rensede fragmenter underkastes en standard-T-celleformeringsprøve eller ved analyse af urensede fragmenter med en Western T-celleafprøvning (Young et al., Immunol. 59, 167, 1986).

5.1.2. Kilder til T-celleepitoper.

Der er en række bakterieprodukter, som tilvejebringer hensigtsmæssige kilder til potentielt anvendelige T-celleepitoper som følge af anvendeligheden af det native stammolekyle som et bærestofprotein. F.eks. kan proteiner fra ydermembranen fra forskellige gramnegative bakterier anvendes, såsom OMP fra *Haemophilus influenzae*. Hårene (fimbriae), de filamentøse, ikke-flagellære vedhæng, som findes på mange gramnegative bakterier, samt flagellin, proteinkomponenten i bakterieflageller, repræsenterer en potentiel kilde til T-celledeterminanter. Filamentøse hæmagglutiner (FHA) fra visse bakterier, f.eks. Pertussis, betragtes også som T-celledeterminantkilder.

Blandt de mest værdifulde bakterieproteiner til de her omhandlede formål er de velkendte bakterietoxiner, som med godt resultat er blevet anvendt som bærestofproteiner i traditionelle vaccinepræparater. Selv om de ovenfor omtalte bakterietoxiner og -toxoider er blevet anvendt i årevis til immunisering af mennesker, vides der meget lidt om deres erkendelse af immunsystemet. Den smule, som er blevet beskrevet i litteraturen, har ikke draget konklusioner. Triebel

et al. (Eur. J. Immunol. 16, 47, 1986) har undersøgt humane, perifere leukocyter for T-cellereaktivitet på fragmenter af diphtheriatoxin frembragt ved cyanogenbromidspaltning. Kun et begrænset sæt af store fragmenter er imidlertid blevet
5 betragtet, og en præcis afbildning af T-celledeterminanter har ikke været mulig. Derfor er en præcis T-celledeterminant i et bakterietoxin ikke tidligere blevet identificeret.

Den her omhandlede fremstilling af bakterietoxin-T-celledeterminant-konjugater kan baseres på et vilkårligt af
10 de kendte toxiner, som er alment anvendelige i deres native form som bærestoffer for antigenforbindelser, som kun er svagt immunogene. Blandt de kendte bakterietoxiner, -CRM'er eller toxoider er dem fra Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus, Pertussis og enterotoxigene bakterier, herunder
15 E.coli. De i størst udstrækning accepterede bærestofproteiner er imidlertid tetanus- og diphtheriatoxoid, som har en etableret sikkerhedshistorie. En især foretrukket T-celleepitop isoleres fra CRM₁₉₇, en ikke-toxisk mutant af diphtheriatoxin.

20 5.1.3. CRM₁₉₇-epitoper.

"Krydsreagerende materialer" eller CRM er genetisk ændrede proteiner, som antigenisk er mage til det native proteintoxin, men som alligevel er ikke toksiske. CRM fra diphtheriatoxin har allerede vist sig at være effektivt ved
25 forøgelse af antistofreaktionen på bakteriekapselpolymere (Anderson et al., J. Pediatr. 107, 346, 1985). Det krydsreagerende materiale, som er kendt som CRM₁₉₇, er bemærkelsesværdigt derved, at det har en enkelt aminosyreændring og immunologisk ikke kan skelnes fra det native diphtheriatoxin.
30 En kultur af Corynebacterium diphtheriae, stamme C7 (β-197), som producerer CRM₁₉₇-protein, er blevet deponeret hos American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, og er blevet tildelt accessionsnummer ATCC 53281.

Til lokalisering af potentielle T-celledeterminanter
35 i CRM, er opmærksomheden blevet fokuseret på amfipatiske spiralregioner af proteinet i overensstemmelse med teorien

(DeLisi og Berzofsky, PNAS 82, 2489, 1985). Placeringen bestemmes ved hjælp af en algoritme på en personlig computer og vurderes ved sammenligning af de resultater, som er opnået for analysen af hvalspermamyoglobin, som beskrevet i DeLisi og Berzofsky, supra. Derefter anvendes programmet på den kendte sekvens af CRM₁₉₇ (Collier, Bacteriol. Rev. 39, 54, 1975; Drazin et al., J. Biol. Chem. 254, 5832, 1979). Seks regioner af CRM udvælges til et detaljeret studium. Disse regioner syntetiseres ved en trinvis Merrifield-standardsyntese i fast fase.

Når først en given region i CRM er blevet verificeret eksperimentelt som indeholdende en T-celledeterminant eller en del deraf, har de præcise grænser for determinanten kunnet kortlægges. Dette er sket ved anvendelse af flere forskellige sæt af syntetiske peptider, som systematisk dissekerer den region, som har interesse. I det første sæt peptider er peptidets N-terminal blevet varieret ved successive additioner af 3-5 naturlige sekvensrester på én gang, medens der opretholdes en fast C-terminal. Dette muliggør en rå approximering af N-terminalgrænsen. For yderligere at forfine placeringen af grænsen er der blevet syntetiseret en anden række peptider, som dissekerer denne region ved enkelttrins-additioner af den naturlige sekvensrest til N-terminalen. I det tredje sæt peptider er C-terminalresterne blevet successivt udeladt i trin på 1-3 rester, medens der opretholdes en fast N-terminalgrænse. Da dette resulterer i progressivt kortere peptider, som kunne påvirke deres erkendelse på uheldig måde, har det været nødvendigt at kompensere for den faldende størrelse ved til N-terminalen at addere yderligere rester, som ikke har nogen relation til proteinets naturlige sekvens. Med både N- og C-terminalerne af determinanten kortlagt er et peptid svarende til den afbillede region blevet syntetiseret og verificeret som en T-celledeterminant.

Af de regioner, som er vist i fig. 1 som mulige T-celleepitoper, har peptidet i region 357-383 vist en væsent-

lig reaktion ved stimulering af diphtheriaprime (DT) lymfekirtelceller. Yderligere studier har lokaliseret epitopen til 359-383 i CRM₁₉₇. Sekvensen repræsenterer en T-celleepitop af CRM₁₉₇ og diphtheriatoxin. Det er blevet vist, at peptidet, når det kobles covalent til kapselpolymeren PRP, er effektivt til fremkaldelse af den ønskede antistofreaktion med PRP in vivo, og at det heller ikke frembringer antistoffer, som krydsreagerer med hele CRM eller DT-toxin. Dette peptid har derfor de karakteristika, som er ønskelige i et bakterietoxinkonjugat. En anden T-celleepitop er blevet lokaliseret til 306-334 i CRM.

5.1.4. Fremstilling af CRM-T-celleepitopen.

Som det vil ses under henvisning til nedenstående eksempler, kan der foretages en række variationer i peptidets længde, uden at aktiviteten af T-cellereaktionen påvirkes, og det må forstås, at den foreliggende opfindelse omfatter ethvert af de fragmenter af peptidet, som bibeholder stimulatorisk aktivitet, men som ikke forårsager de uheldige immunologiske reaktioner, som kan frembringes af de native proteiner. Det må også forstås, at den foreliggende opfindelse omfatter variationer i det aktive peptid, hvor der i den primære sekvens er foretaget aminosyreombytninger uden at påvirke peptidets aktivitet. Sådanne ombytninger er velkendte for en fagmand på området. F.eks. kan der foretages ombytninger på basis af ligheder i polaritet, ladning, opløselighed, hydrofobicitet, hydrofilicitet og/eller den amfipatiske natur af de involverede rester. Negativt ladede aminosyrer omfatter asparaginsyre og glutaminsyre, positivt ladede aminosyrer omfatter lysin og arginin, aminosyrer med uladede, polære hovedgrupper eller ikke-polære hovedgrupper med tilsvarende hydrofilicitetstal omfatter følgende: leucin, isoleucin, glutamin, serin, threonin, phenylalanin og tyrosin.

Fremstillingsmetoden kan udvælges blandt vilkårlige af dem, som er kendt på området peptidsyntese. Blandt de mere gængs anvendte teknikformer er kobling via Merrifield-syntesen i fast fase (J. Am. Chem. Soc. 96, 2986-2983, 1974),

hvor en beskyttet aminosyre er bundet til en harpikspartikel. Aminosyrer med funktionelle grupper, f.eks. tyrosin, er almindeligvis beskyttet med en letfjernelig blokeringsgruppe. Enhver af disse teknikformer er lige velegnet til det her omhandlede formål.

5.1.5. Tetanustoxinepitoper.

Ud over identifikationen af CRM₁₉₇-T-celleepitoper er også tetanustoxinmolekylet blevet undersøgt for tilstedeværelsen af T-celleepitoper. Til lokalisering af sådanne epitoper er tetanustoxinmolekylet blevet spaltet i ret store fragmenter ved anvendelse af en mangfoldighed af proteaser. Fragmenter frembragt på denne måde afprøves indledningsvis fra deres evne til stimulering af muse-T-celleformering. Et sæt af overlappende peptider, som omfatter de aktive fragmenter, er blevet syntetiseret og afprøvet for T-celleaktivitet. Foretrukne epitoper er peptiderne 961-980 og 1021-1040 i tetanustoxin.

5.2. Antigen-T-celleepitop-konjugater.

T-celleepitoperne ifølge opfindelsen kan kombineres værdifuldt med praktisk taget ethvert antigen, antigendeterminant eller haptent af medicinsk eller veterinær interesse, for hvilke en stigning i immunogenicitet ville være ønskelig. Disse antigener kan f.eks. associeres med smitstoffer af bakterie-, virus-, parasit- eller svampeoprindelse, og eksempler omfatter pneumococpolysaccharider, proteiner fra gonococydermembranen, adhæsionsproteiner fra *Mycoplasma pneumoniae* eller overfladesaccharider associeret med lipopolysaccharid i gramnegative bakterier. Yderligere antigener af denne type erkendes let af en fagmand på området.

En anden gruppe antigenmaterialer, som kan anvendes som B-celledelen i immunogenkonjugaterne er et vilkårligt af de kendte allergener. Eksempler på de typer af allergener, som ville vise sig anvendelige ved den foreliggende opfindelse, er B-celledeterminanter i ambrosie (Atassi et al., FEBS Letters 188, 96, 1985), rughejre (Standring et al., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 83, 96, 1987); midtprotei-

ner Der pI og Der f (Chapman et al., J. Immunol. 139, 1479, 1987); carbonhydratepitop af honningbigiftphospholysat A₂ (Weber et al., Allergy 42, 464, 1987); penicilloyldeterminanter (Ahlstedt et al., Int. Arch. Allergy App. Immunol. 5 61, 91, 1980); carbonhydratepitoper fra søpunge (Oka et al., J. Allergy Clin. Immunol. 80, 57, 1987) og Ascarisantigener (Darden et al., Immunol. Comm. 7, 393, 1978).

Inden for rammerne af den foreliggende opfindelse falder også tumorassocierede antigener. Blandt de bedre 10 karakteriserede antigener er det carcinoembryoniske antigen (Kuroki et al., Cancer Res. 46, 300, 1986; Laferti & Krantz, Mol. Immunol. 20, 421, 1983), det adenocarcinomaassocierede antigen DU-DAN-2 (Lan et al., Cancer Res. 45, 305, 1985) og det gastrointestinale/pancreasassocierede antigen (Magnani 15 et al., Cancer Res. 43, 5489, 1983).

Af potentiel interesse er ligeledes forskellige antigener associeret med autoimmunsygdomme, såsom rheumatoid arthritis og lupuserythematoser.

Det må forstås ud fra ovenstående diskussion, at 20 anvendelsen af udtrykket antigen skal forstås således, at det omfatter enten hele antigenet eller én af dets determinanter, og det skal ligeledes forstås som omfattende haptensmolekyler, som kunne gavne ved en forøgelse i den immunreaktion, som sker med konjugation til en bakterie-T-cellepitop. 25 Ovenstående liste over antigener har kun til formål at eksemplificere, og yderligere, anvendelige antigener vil let erkendes af en fagmand på området.

5.2.1. Kapselpolymere.

Som det er nævnt ovenfor, er bakteriekapselpolymere 30 blandt de grupper af antigener, som har potentiale til at blive effektivt anvendt i en vaccine, men som kun er svagt immunogene hos unge mennesker. Som anvendt i nærværende beskrivelse refererer udtrykket "kapselpolymere" til sukkerholdige polymere, såsom polymere af sukkerarter, sukkersyrer, 35 aminosukkerarter, polyvalente alkoholer og sukkerphosphater, og det refererer ikke til aminosyreholdige polymere. I den

medicinske litteratur betegnes disse "kapselpolymere" hyppigt som "kapselpolysaccharider", selv om de kan indeholde andre bindinger end glycosidbindinger og andre bestanddele end sukkerarter, såsom de ovenfor anførte.

5 Kapselpolymerene (CP) kan stamme fra mange forskellige typer af bakterier. Disse typer omfatter *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus*-arter, herunder *pneumoniae* (især serotyper 1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F og 23F), *pyogenes* og *agglactiae*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae*,
10 *Pseudomonas aeruginosa* og *Staphylococcus aureus*.

CP fra forskellige bakterier varierer i stor udstrækning i immunogenicitet i et menneskes første leveår. Nogle er moderat aktive, såsom *Streptococcus pneumoniae*, serotype 3, og *Neisseria meningitidis*, serogruppe A. Modtageligheden
15 for systemisk infektion af indkapslede bakterier er større i det første leveår. Immunogenreaktionen på mange bakteriekapselpolymere hos børn er aldersafhængig, dvs. immunokompetencen mod CP vokser til voksniveauer ved en alder på ca. 6 år.

20 Blandt de inaktive CP'er er dem fra *Haemophilus influenzae*, type b, *Streptococcus pneumoniae*, serotyper 6 og 12, samt *Neisseria meningitidis*, serogruppe C. Eksempler på CP, som stimulerer en mellemliggende reaktion hos børn, er *Streptococcus pneumoniae*, serotyper 19 og 51. Der findes
25 også i organismer, såsom *Neisseria meningitidis*, serogruppe B, polysaccharider, som ikke er immunogene hos nogen aldersgruppe.

Ikke-bakteriepolymere kan stamme fra gær og svampe, f.eks. *Cryptococcus neoformans*, eller saccharidenheder, som
30 særegent findes på cancerceller, eller dem, som findes associeret med allergener.

5.2.2. Andre antigener.

Andre antigener, som kan anvendes ved fremstillingen af en immunogenkonstruktion, omfatter antigener udvalgt fra
35 den gruppe, som består af mikroorganismeantigener, virusantigener, tumorantigener, allergener og autoimmunrelaterede

antigener. Eksempler på mikroorganismeantigener omfatter ydermembranproteinerne (f.eks. fra *Haemophilus influenzae* eller *Branhamella catarrhalis*) og overfladeproteinerne (f.eks. M-proteinet fra *Streptococcus pyogenes*). Eksempler
5 på virusproteiner omfatter F- og G-proteinerne i respiratorisk syncytialt virus (RSV).

5.2.3. Fremstilling af antigen-epitop-konjugater.

Antigen-epitop-konjugaterne ifølge opfindelsen kan fremstilles ved en vilkårlig af de biologisk acceptable
10 metoder, som er kendt på området til kobling af antigener til bærestoffer. For at sikre den mest effektive udnyttelse af de her omhandlede konjugater er koblingsmetoden fortrinsvis covalent kobling. Mange sådanne metoder er for tiden til rådighed til kobling af poly- og oligosaccharider, pro-
15 teiner og peptider til peptidbærestoffer. De fleste metoder skaber enten amin- eller amidbindinger eller i visse tilfælde thioestere.

Koblingskemien kan til en vis udstrækning ændres via syntesen af modificerede analoge af en T-celleepitop. Sådanne
20 modifikationer kan f.eks. omfatte additionen af lysin eller cystein til N-terminalen i peptidet med eller uden et afstandsgivende element. Kapaciteten hos sådanne analoge til stimulering af T-celler er blevet sammenlignet med kapaciteten af det ikke modificerede peptid.

25 (a) Polysaccharider eller oligosaccharider til peptider.

En anvendelig metode til saccharidkobling er reduktiv aminering. Poly- og oligosaccharider har frie, reducerende endegrupper, som kan reduktivt amineres til nitrogenet i den N-terminale aminosyre eller ϵ -aminogrupper i lysin i
30 peptidet. Den dannede binding er en sekundær amin. Alternativt kan poly- eller oligosaccharidet oxideres, f.eks. ved hjælp af periodation, til opnåelse af interne og/eller terminale aldehydfunktioner. Aldehydgrupperne kan også reduktivt amineres til den N-terminale aminosyre eller til ϵ -
35 aminogrupperne i lysin i peptiderne.

Korte, bifunktionelle, afstandsgivende grupper med

en aminogruppe i den ene ende og en aktiv gruppe, såsom amino, maskeret aldehyd, carboxylsyre eller aktiv ester eller en thiogruppe, i den anden ende kan reduktivt amineres til saccharidet og derefter kobles til peptidet gennem den anden endegruppe i afstandsgiveren. α -Aminocaprønsyre og 4-aminobutyldimethylacetal er eksempler på en sådan afstandsgivende gruppe.

Omsætning af terminale, reducerende sukkerarter med O-phenylendiamin og nitrophenylhydraziner giver substituerede 1-phenylflavazoler. Kobling af de funktionaliserede saccharider til peptider sker ved omdannelsen af nitrogruppen til en diazofunktion.

Aktivering af saccharidhydroxylgrupper er en alternativ metode. Hydroxylgrupper i saccharider kan aktiveres ved anvendelse af enten cyanogenhalogenid (normalt cyanogenbromid) eller carbonyldiimidazol til opnåelse af en derivatiseret hydroxylgruppe, som kan koble til den N-terminale aminogruppe eller ϵ -aminogrupeer i peptidet. Den dannede binding er enten et isourinstof eller et carbamat.

Som en yderligere metode kan saccharider med funktionelle carboxylsyregrupper, såsom uronsyregrupper eller aldon-syrefunktioner, kobles til N-terminale aminogrupeer og ϵ -aminogrupeer i lysin i peptider ved aktivering af carboxylgrupperne ved dannelsen af aktive estere ved anvendelse af carbodiimider eller isobutylchlorcarbonater. Den resulterende binding er en amidbinding.

Ligeledes kan polysachharider eller oligosaccharider med frie aminogrupeer kobles til peptider enten gennem carboxyterminalen eller den N-terminale aminosyre. Kobling til carboxylterminalenden eller til aminosyrer, såsom glutaminsyre, sker ved aktivering af carboxylsyrefunktionen med carbodiimider som ovenfor beskrevet. Kobling til N-terminalt nitrogen eller lysin sker ved anvendelse af en bifunktionel, afstandsgivende gruppe, såsom et disuccinimidylsubstrat, som reagerer i begge ender med aminofunktioner.

(b) Proteiner eller peptider til peptider.

Carboxylsyrefunktioner kan aktiveres ved hjælp af carbodiimider eller chlorcarbonater til opnåelse af aktive estere, som kan omsættes med aminogrunder på peptidet. Den resulterende, dannede binding er en amidbinding.

Den mere almene metode til kobling af proteiner eller peptider til peptider er ved anvendelse af bifunktionelle, tværbindende reagenser. Disse er små, afstandsgivende molekyler med aktive grupper i begge ender. De afstandsgivende molekyler kan have identiske eller forskellige aktive grupper ved de to ender. De mest gængse, aktive funktionaliteter, koblingsgrupper og dannede bindinger er:

1. Aldehyd - amino - sekundær amin.
2. Maleimido - sulfhydryl - thioether.
- 15 3. Succinimido - amino - amid.
4. Imidatestere - amino - amid.
5. Phenylazider - amino - phenylamin.
6. Acylhalogenid - sulfhydryl - thioether.
7. Pyridyldisulfider - sulfhydryl - disulfid.
- 20 8. Isothiocyanat - amino - isothiourinstof.

5.3. Formulering og indgivelse af vacciner.

De her omhandlede konjugater er anvendelige ved fremstillingen af vaccinepræparater til behandling af en vilkårlig type af mikroorganismeinfektion. Konjugaterne kan kombineres med ethvert af de gængs anvendte, farmaceutisk acceptable bærestoffer, såsom vand, fysiologisk saltopløsning, ethanol, polyoler (glycerol eller propylenglycol) eller vegetabiliske olier, samt ethvert af de vaccinehjelpestoffer, som er kendt på området. De kan også inkorporeres i liposomer. Som her anvendt omfatter "farmaceutisk acceptable bærestoffer" ethvert og alle opløsningsmidler, dispergeringsmedier, antibakterielle og antifungale midler, isotoniske og absorptionsforsinkende midler og lignende. Supplerende, aktive ingredienser kan også anvendes.

Indgivelsesmåden er typisk parenteral, dvs. intrave-

nøs, intramuskulær, intraperitoneal eller subcutan. Oral indgivelse er også mulig. Den mængde konjugat, som anvendes i en sådan vaccine, vil variere afhængigt af identiteten af det anvendte antigen. Justering og manipulering af etablerede dosisintervaller, som anvendes sammen med traditionelle bærestofkonjugater, til tilpasning til de her omhandlede konjugatvacciner, falder inden for en fagmands viden. F.eks. er den typiske dosering af de kendte bærestofkonjugater omfattende PRP og CRM ca. 1-25 μ g peptid. De her omhandlede vacciner og metoder er ligeledes særligt anvendelige, fordi de fleste børn allerede er blevet "primet" ved indgivelse af diphtheria- og tetanusvacciner kort tid efter fødslen. Konjugaterne ifølge den foreliggende opfindelse tilsigtes anvendt ved behandlingen af både umodne og voksne, varmblodede dyr, især mennesker. De sygdomme, for hvilke der kan opnås effektiv prævention ved den her omhandlede fremgangsmåde, vil være indlysende for en fagmand på området ved læsning af nærværende beskrivelse. Ligeledes er anvendelsen af de her omhandlede metoder og konjugater ikke begrænset til prophylaktisk anvendelse; men terapeutisk anvendelse er også omfattet.

Ved en foretrukket udførelsesform omfatter konjugatet et bakteriekapselantigen eller et antigenfragment deraf konjugeret til T-celleepitopen fra et diphtheriatoxin. Denne kombination er anvendelig ved behandlingen af meningitis. Denne tilstand, som almindeligvis forårsages af H. influenzae b, forekommer hos børn, som er mindre end 6 år gamle, idet ca. 60% af tilfældene forekommer i børn på under 2 år. Beskyttelse imod denne sygdom har været vanskelig at opnå hos børn på under 18 måneder med traditionelle vaccinepræparater. De her omhandlede præparater frembringer imidlertid et væsentligt niveau af antistofproduktion på grund af T-cellererkruttering.

De efterfølgende, ikke-begrænsende eksempler tilvejebringer en påvisning af fremstillingen og effektiviteten af de her omhandlede T-celleepitopkonjugater.

6. Eksempler.

6.1. Fremgangsmåde til peptidsyntese i fast fase.

Syntetiske peptider er blevet konstrueret ved anvendelse af den trinvis tilnærmelse i fast fase ifølge

5 Merrifield (1963) på en peptidsyntetisator Applied Biosystems Model 430A. Alle syntetiske peptider er blevet samlet på en uopløselig copolymerharpiks bestående af styren og divinylbenzen. Alle aminosyrer, som er anvendt ved samlingen af disse peptider, er blevet tilført med α -aminogruppen beskyttet ved hjælp af en t-BOC-gruppe (t-butyloxycarbonyl). Peptidkæderne knyttes til harpiksen gennem en "PAM"-linker (phenylacetamido).

Princippet ved fastfasesyntese kan kortfattet beskrives som følger. Et ækvivalent af den t-BOC-beskyttede aminosyre opbevaret som et tørt pulver i et individuelt
15 hætteglas opløses med dichlormethan (DCM) og overføres til aktivatorbeholderen, hvor det aktiveres med et halvt ækvivalent dicyclohexylcarbodiimid (DCC) til opnåelse af det (α -aminobeskyttede, t-BOC) aminosyresymmetriske anhydrid, som anvendes som acyleringsmidlet. Det symmetriske anhydrid-derivat overføres i koncentratorbeholderen, medens det uopløselige biprodukt, dicyclohexylurinstof, opløses med methanol-DCM og skylles ud af aktivatorbeholderen. I koncentratorbeholderen fjernes DCM og erstattes med N,N-dimethylformamid
20 (DMF), som er det opløsningsmiddel, som anvendes til forøgelse af effektiviteten af koblingsreaktionen mellem det symmetriske anhydrid og de peptider, som samles på belastede PAM-harpikser. Efter opløsningsmiddelombytningen sættes det symmetriske anhydrid derefter til reaktionsbeholderen. Før
25 tilførslen af det symmetriske anhydrid i DMF er peptidharpiksen i reaktionsbeholderen blevet N-(α)-afbeskyttet med en TFA/DMC-blanding, vasket med DCM og neutraliseret med en N,N-diisopropylethylamin/DMF-opløsning. Efter tilsætningen af symmetrisk anhydrid til reaktionsbeholderen gennemføres
30 koblingsreaktionen, hvilket resulterer i den covalente tilknytning af det aktiverede carboxyl i t-BOC-aminosyren til

den afbeskyttede α -aminogruppe i det harpiksbundne peptid. Når syntesen er afsluttet, tømmes reaktionsbeholderen efterfulgt af vask med DMC, hvorved peptid-harpiksen præpareres til en anden syntesecyklus.

5 De symmetriske anhydridderivater er blevet anvendt som acyleringsmidlerne for de fleste aminosyrer med undtagelse af asparagin, glutamin og arginin. Disse tre aminosyrer er blevet koblet som 1-hydroxybenzotriazolestere. De reaktive sidekæder i aminosyrer er blevet beskyttet under syntesen
10 af peptidkæderne. De anvendte beskyttelsesgrupper har været O-benzyl for Asp og Glu, benzyl for Ser og Thr, 4-methylbenzyl for Cys, tosyl for Arg og His, 2-Cl-carbobenzoylcarbonyl for Lys, O-(p-brombenzyloxycarbonyl) for Tyr og formyl for Trp. Fuldstændigheden af koblingen på hvert enkelt trin er
15 blevet overvåget ved hjælp af en kvantitativ ninhydrinprøve (V.K. Sarin et al., 1981), som måler tilbageværende, frie α -aminogru-
per på peptid-harpiksen. Typisk er der opnået koblingseffektiviteter på over 99,5%. Hvis koblingseffektiviteten er uacceptabel, gentages syntesen med en "dob-
20 beltkoblings"-cyklus af den vanskelige rest.

Efter syntese spaltes hvert peptid individuelt på harpiksen med 10 ml vandfrit, flydende HF, hvortil der er sat 1 ml dimethylsulfid, og 1 ml af en 1:0,2 molær blanding af anisol og p-thiocresol. Disse spaltningsreaktioner gen-
25 nemføres ved -8°C i 50 minutter. Når harpiksen først er fraspaltet, vaskes den med portioner på 3-25 ml vandfri diethylether til fjernelse af eventuelle, organiske urenheder, som kunne være tilbage. Til sidst ekstraheres det rå peptidmateriale fra harpiksen med vaskninger på 3-10 ml af
30 en fortyndet (30% vol/vol) opløsning af iseddikesyre i vand. Ekstrakterne kombineres i en 100 ml pæreformet kolbe, og eddikesyre/vand-opløsningen fjernes ved rotationsfordampning. Den nedtørrede rest, som bliver tilbage, optages i et minimalt volumen af 0,1% TFA/ H_2O , overføres til en 150 ml fryse-
35 tørringskolbe, fryses hurtigt i flydende nitrogen og fryse-
tørres natten over.

6.2. Kemisk karakterisering af syntetiske peptider.

Renheden af det syntetiske peptid fastslås først ved HPLC med omvendt fase, fortrinsvis ved anvendelse af to forskellige gradientbetingelser. Et peptid, som i HPLC-chromatogrammet eluerer som en enkelt, homogen spids med mere
5 end 95% af det totale areal, underkastes direkte aminosyresekvensering til yderligere analyse.

A. HPLC-analyse. Det fraspaltede, rå peptidmateriale analyseres ved HPLC på en analytisk "Vydac C₄"-kolonne (4,6
10 mm x 250 mm) ved anvendelse af en gradient af 0-60% acetonitril over 30 minutter. Hvis gradienten er utilstrækkelig, ændres den tilsvarende til optimering af spidsopløsningen i den rå blanding. Ligeledes tages andre chromatografiske faktorer, såsom kolonnestørrelser, pakningseffektivitet, partikelstørrelser, bindingskemi af pakningsmaterialer og
15 opløselighedskarakteristika af peptidblandingerne, i betragtning gennem hele HPLC-rensningsprocessen. Når først en hensigtsmæssig adskillellesprotokol er opnået for hvert enkelt peptid, oversættes disse gennemløbsbetingelser til en halv-præparativ metode ved anvendelse af en "Vydac C₄"-kolonne
20 (10 mm x 250 mm) til opnåelse af mg til gram mængder af et rensset produkt. Renset materiale rechromatograferes derefter under analytiske gennemløbsbetingelser til bestemmelse af slutrenheden af produktet, idet et acceptabelt niveau er
25 over 95%.

B. Aminosyresekvensanalyse. Før sekvensering opløses det lyofiliserede peptid i 0,1% TFA/vand. Ca. 500 picomol anbringes som en plet på et polyprenovertrukket glasfiberpapir før starten af en automatiseret Edman-sønderdeling,
30 som gentager sig selv, med en Applied Biosystems 477A protein/peptid-sekvensator med pulseret væske forsynet med en on-line PTH-analysator model 120A. Efter hver Edman-sønderdeling omdannes det ud fra hver enkelt aminosyre dannede phenylthiazolinonderivat til det mere stabile phenylthiohydantoinderivat (PTH) ved behandling med 25%'s TFA ved 64°C
35 i 20 minutter.

PTH-derivaterne adskilles ved HPLC med omvendt fase over en "Brownlee C-18"-kolonne (220 mm x 2,1 mm) ved anvendelse af et gradientsystem med to opløsningsmidler bestående af opløsningsmiddel A (pr. liter): 5%'s tetrahydrofuran indeholdende 3M natriumacetatpuffer (27,0 ml med pH 3,8 og 6,2 ml med pH 4,6), og opløsningsmiddel B (pr. liter): acetonitril indeholdende 500 nanomol oxidationsmiddelfjernende middel, N,N-dimethyl-N-phenylthiourinstof (DMPTU). Til forbedring af formen af chromatografiske spidser og opløsning af PTH-histidin og PTH-arginin sættes 0,5 ml 12,5%'s trimethylamin til opløsningsmiddel A. De nominelle HPLC-parametre er som følger: strømningshastighed 200 μ liter/minut, detektorbølgelængde 254 nm, kolonnetemperatur 55°C. Optimal adskillelse af PTH-derivater opnås med følgende lineære gradient: 12% B på tidspunktet 0 minutter, 38% B på tidspunktet 18 minutter, 38% B på tidspunktet 25 minutter, 90% B på tidspunktet 25,1 minutter, 90% B på tidspunktet 29 minutter. PTH af hver cyklus identificeres ved sammenligning med et standardchromatogram af en blanding af PTH-aminosyrer (Applied Biosystems).

6.3. T-celleaktivering.

A. Muse-T-celleformering.

Lymfekirtler fra lyske og periaorta høstes aseptisk fra mus, som i forvejen er immuniseret med en optimal dosis af antigen emulgeret (1:1 vol:vol) i Freund's komplette adjuvans. En enkelt cellesuspension fremstilles i RPMI indeholdende 10% oksefosterserum. Efter en enkelt vask resuspenderes cellerne i RPMI uden serum og tælles ved trypanblåudelukkelse med et fasekontrastmikroskop. Celletallet indstilles til en koncentration på 3×10^6 celler/ml i RPMI indeholdende 2% normalt museserum. Forskellige koncentrationer af antigener, mitogener eller andre kontrolmaterialer fremstilles i RPMI uden serum, og 0,1 ml portioner anbringes in triplo i fladbundede, vævskulturbehandlede plader med 96 huller. Et bredt interval af doser anvendes rutinemæssigt for alle antigener. Til disse plader sættes 0,1 ml cellesuspension.

Derved er den opnåede slutcellekonzentration 3×10^5 celler/hul i medier indeholdende 1% museserum. Efter tilsætning af cellerne anbringes kulturerne i en befugtet inkubator med 5% CO₂ ved 37°C. Efter 3 døgns inkubering pulseres kulturerne i 18 timer med 1 µCi/hul [³H]-thymidin og høstes til tælling ved væskescintillation. Thymidininkorporering udtrykkes som gennemsnittet af gentagne forsøgsværdier minus gennemsnittet af gentagne, ikke-stimulerede værdier (baggrund).

10 B. Human-T-celleformering.

Blod indsamles fra frivillige i heparinbehandlede glas og fortyndes derefter (1:1) med varmt (37°C) RPMI uden serum. Leukocyter fra perifert blod isoleres ved at 25 ml af det fortyndede blod lægges som et lag over 15 ml "Ficoll®" histopaque (Sigma). Efter centrifugering (1500 opm., 5 minutter) ved stuetemperatur opsuges cellerne ved "Ficoll®"-blod-skillefladen og vaskes (3 gange) med RPMI indeholdende 10% oksefosterserum. Efter den sidste vask resuspenderes cellerne i RPMI uden serum og tælles ved trypanblåtudelukkelse ved anvendelse af fasekontrastmikroskopi. Celletallet indstilles på $0,75 \times 10^6$ celler/ml i RPMI indeholdende 20% humane sera i pulje. Forskellige koncentrationer af antigener, mitogener eller andre kontrolmaterialer fremstilles i RPMI uden serum, og 0,1 ml portioner anbringes in triplo i rundbundede, vævs-kulturbedhandlede plader med 96 huller. Et bredt interval af doser anvendes rutinemæssigt for alle antigener. Til disse plader sættes 0,1 ml cellesuspension. Derved er den opnåede slutcellekonzentration $0,75 \times 10^5$ celler/hul i medier indeholdende 10% humant serum. Efter tilsætning af cellerne anbringes kulturerne i en befugtet inkubator med 5% CO₂ ved 37°C. Efter 6 døgns inkubering pulseres kulturerne i 6-8 timer med 1 µCi/hul [³H]-thymidin og høstes til tælling ved væskescintillation. Thymidininkorporering udtrykkes som gennemsnittet af gentagne forsøgsværdier minus gennemsnittet af gentagne, ikke-stimulerede værdier (baggrund).

6.4. Fremstilling af HbO-peptid-konjugater.

A. Fremstilling af oligosaccharid af Haemophilus influenzae type b (HbO).

Polysaccharidet af Hib (PRP) opløses i vand, og der
5 tilsættes en tilstrækkelig mængde natriumphosphatpuffer
(2M, pH 7,0) til at bringe slutopløsningen på 0,2 M fosfat.
Natriummetaperiodat (0,2X mol PRP) tilsættes på én gang
under hurtig omrøring. Opløsningen henstår i mørke ved 4°C
natten over. Det rå oligosaccharid ultrafiltreres på først
10 en membran med afskæring ved en molekylvægt på 30.000 til
fjernelse af de større oligosaccharider, og filtratet ultra-
centrifugeres på en membran med en afskæring ved en molekyl-
vægt på 10.000 til fjernelse af oligosacchariderne med lavere
molekylvægt under bibeholdelse af retentatet. Retentatet
15 chromatograferes på en "Biogel® P-100"-kolonne i saltopløs-
ning, og fraktionerne analyseres for ribosegrupper og redu-
cerende grupper ved hhv. Orcinol- og Park-Johnson-prøverne.
Typisk har oligosacchariderne en gennemsnitlig Dp på 20.
Det rensede oligosaccharid frysetørres derefter og opbevares
20 ved -20°C.

B. Syntese af HbO-peptid-konjugater.

Peptidet opløses i vandfrit DMSO ved en koncentration
på 5 mg/ml. Derefter sættes opløsningen til en 2X molmængde
frysetørret HbO. Den mængde HbO, som anvendes ved reaktionen,
25 kan varieres fra 1X til 2X afhængigt af den type peptidkon-
jugat, som skal syntetiseres, dobbelt- eller enkeltendet.
Reaktionsblandingen inkuberes ved 37°C i 24 timer, hvorefter
der tilsættes 10X mol (baseret på HbO) natriumborhydrid
opløst i et lille volumen DMSO. Opløsningen inkuberes i
30 yderligere 24 timer, og derefter tilsættes der et volumen
vand lig med volumen af DMSO. Overskydende natriumborhydrid
omsættes med en lille mængde eddikesyre, og produktet opløses
i vand eller saltopløsning. Uomsat peptid kan fjernes ved
størrelsesudelukkelseschromatografi eller dialyse ved anven-
35 delse af en membran med en afskæring ved en molekylvægt på
6000-8000. Konjugering af HbO til peptidet verificeres ved

Western pletanalyse.

6.4.1. Polyacrylamidgelelektroforese (PAGE).

PRP-peptid-konjugater opløses i 100 μ liter af en prøvepuffer (0,2M Tris-puffer indeholdende 5% SDS, 0,025% bromphenolblåt, 10^{-1} M 2-ME og 20% glycerol) og opvarmes i 5 minutter til 100°C. De fleste rutineanalyser er gennemført ved anvendelse af Bio-Rad miniproteingelsystemet (Redmond, CA). Gelerne er 1,5 mm tykke, og adskillelsesgelen indeholder 15% acrylamid med et forhold mellem acrylamid og bis på 30:0,8, 0,375M Tris-HCl, pH 8,8, og 0,1% SDS. Stablingsgelen indeholder 4,8% acrylamid med samme forhold mellem acrylamid og bis, 125 mM Tris-HCl, pH 7,0, og 0,1% SDS.

10-15 μ liter indeholdende 1-10 μ g prøver påføres hver enkelt kolonne. Efter elektroforese farves gelerne i mindst én time med 0,125% 's "Coomassie® blue" i ethanol:eddikesyre:vand (5:1:5) og affarves derefter i samme opløsningsmiddelsystem uden farvestoffet. I forvejen farvede molekylvægtstandarder (phosphorylase b, 92.500; okseserumalbumin, 69.000; ovalbumin, 43.000; carbonanhydrase, 30.000) anvendes som assistance ved bestemmelsen af de relative molekylvægte af proteinerne. En duplikerende gel uden farvning anvendes til Western-analyse.

6.4.2. Western pletanalyse.

Prøver adskilt på PAGE overføres elektroforetisk på nitrocellulosemembraner i et Hoeffer "Transphor"-apparat ved 0,45 mA i 90 minutter i 25 mM Tris, 383 mM glycin, pH 8,8, ved stuetemperatur. Når først proteinoverføringen er afsluttet, gennemvædes nitrocellulosemembranerne i "BLOTTO" (5% 's fedtfri tømælk i phosphatpufret saltopløsning) ved 37°C i 1 time. Membranerne sonderes med en forudbestemt koncentration af antistoffer imod PRP eller CRM₁₉₇ i 1 time ved 37°C og vaskes med "BLOTTO" i 20 minutter ved 37°C. Bundne antistoffer påvises med peberrodperoxidasekonjugeret gede-anti-mus (Kirkegaard og Perry, M.D.) ved en fortynding på 1:250 "BLOTTO" i 1 time ved 37°C. Pletterne vaskes 3 gange med PBS og fremkaldes med PBS indeholdende 0,01% hydro-

genperoxid og 0,06% 4-chlor-1-naphthol (Sigma Chemical Co., MO) i methanol i 20 minutter ved stuetemperatur. Reaktionen standses, ved at filtrene overføres til destilleret vand, og filtrene tørres ved dupning.

5 6.4.3. Immunisering.

Til priming af muse-T-celler opløses diphtheriatoxid, CRM eller CRM-peptider i phosphatpufret saltopløsning og emulgeres i samme volumen Freund's komplette adjuvans. Mus får 0,1 ml af emulsionen indeholdende en optimal kon-
10 centration af antigen subcutant ved haleroden. Maksimal T-cellereaktionsevne iagttages rutinemæssigt 1 uge senere.

Til immunisering for antistofreaktioner får mus rutinemæssigt 2,5 µg PRP-CRM-konjugat eller 5 µg PRP-peptid-konjugater suspenderet i phosphatpufret saltopløsning. Kon-
15 jugaterne indgives i et volumen på 0,1 ml intramuskulært uden anvendelse af adjuvans. Eventuelle efterfølgende immuniseringer indgives med 2 ugers mellemrum under anvendelse af samme dosis og indgivelsesvej.

6.4.4. Farr-afprøvning.

20 Antistof mod PRP bestemmes ved standardiseret Farr-radioimmunoafprøvning. Forskellige fortyndinger af sera, serumstandarder og prøvekontroller fremstilles i oksefoster-sera, og portioner på 25 µliter overføres, to af hver, til 1,5 ml Eppendorf-glas. [³H]-PRP (50 µliter) med [³⁶Cl]-spor-
25 stof sættes til alle glas. Prøverne omhvirvles og inkuberes natten over ved 4°C. 75 µliter mættet ammoniumsulfat sættes til alle prøver, hvorefter prøverne omhvirvles og inkuberes ved 4°C i 40 minutter. Den ovenstående væske frasuges forsigtigt, og 400 µliter destilleret vand sættes til alle perler.
30 Efter omhvirvling anbringes hele indholdet i hætteglasset og selve hætteglasset i et scintillationshætteglas indeholdende 10 ml scintillationsfluidum. Efter kraftig omrøring tælles hætteglassene på en væskescintillationstæller. Koncentrationen af antistof bundet til PRP beregnes, ved sammen-
35 ligning med en kendt standard, ud fra den lineære del af en afbildning af CPM og serumfortyndinger.

6.4.5. ELISA-afprøvning.

Antistof mod CRM bestemmes ved en standard-ELISA-afprøvning. Til gennemførelse af afprøvningen overtrækkes polystyrenplader med 96 huller natten over ved 37°C i en befugtet inkubator med en 100 µliter/hul CRM₁₉₇ (1 µg/ml i 0,1M carbonateret puffer, pH 9,6). Hullerne vaskes (3 gange) med fosfatpufret saltopløsning (PBS) indeholdende 0,05% "Tween®-20" og blokeres med 200 µliter/hul PBS indeholdende 0,1% gelatine i 45 minutter ved stuetemperatur. Efter vask (2 gange) med PBS-"Tween®" tilsættes 100 µliter/hul af sera fortyndet med fortyndingsmiddel (PBS indeholdende 0,05% "Tween®-20" og 0,1% gelatine). Pladerne inkuberes i 90 minutter ved stuetemperatur og vaskes derefter (3 gange) med PBS-"Tween®". Et sekundært antistof (100 µliter/hul af en fortynding 1:1000 af gede-muse-alkalisk phosphatase-konjugat) i fortyndingsmiddel tilsættes og inkuberes i 60 minutter ved stuetemperatur og vaskes (3 gange) med PBS-"Tween®". Substrat (100 µliter/hul p-nitrophenylphosphat, 1 mg/ml, i diethanolamin indeholdende MgCl₂ x 6H₂O ved pH 9,8) tilsættes og inkuberes i 60 minutter ved stuetemperatur, hvorefter reaktionen bringes til standsning ved tilsætning af 150 µliter/hul 2M natriumhydroxid. Den optiske tæthed ved 410 og 690 nm aflæses ved anvendelse af en "Bio-Tec 310"-autoaf-læser.

25 6.4.6. Bestemmelse af immunoglobulinklasse og -underklasse.

Klassen og underklassen af de antistoffer, som er specifikke for PRP, bestemmes ved en ELISA-afprøvning. Polystyrenplader med 96 huller overtrækkes med en fortynding 1/2000 af PRP-tyramin i PBS. Antigenet (100 µliter/hul) inkuberes i 90 minutter ved 37°C, hvorefter pladerne vaskes (2 gange) med PBS og blokeres ved inkubering i 60 minutter ved stuetemperatur med 200 µliter/hul PBS indeholdende 0,1% gelatine. Efter vask (2 gange) med PBS tilsættes 50 µliter forsøgssera fortyndet i fortyndingsmiddel (PBS indeholdende 0,05% "Tween®-20" og 0,1% gelatine), og pladerne inkuberes i 2 timer ved stuetemperatur og vaskes derefter automatisk

med PBS indeholdende 0,1% "Tween®-20". Til hullerne sættes 100 µliter/hul af en hensigtsmæssig fortynding af gede- eller kanin-anti-museimmunoglobulin-alkalisk phosphatase-konjugat (klasse- eller underklassespecifikt) i 2 timer ved 5 stuetemperatur. Pladerne vaskes automatisk som ovenfor. Til hullerne sættes 200 µliter substrat (p-nitrophenylphosphat, 1 mg/ml, i diethanolamin indeholdende $MgCl_2 \times 6H_2O$ ved pH 9,8) og inkuberes i 60 minutter ved stuetemperatur. Afhængigt af tilgængeligheden af anti-sera-enzym-konjugater kan der 10 imidlertid anvendes andre enzym-substrat-kombinationer. Reaktionen bringes til standsning ved tilsætning af 50 µliter/hul 2M natriumhydroxid. Den optiske tæthed ved 410 og 690 nm aflæses ved anvendelse af en "Bio-Tec 310"-autoaf-læser.

15 6.5. Frembringelse af tetranustoxinfragmenter.

Tetanusexotoxin gøres opløseligt ved opvarmning til 100°C i 5 minutter i prøvepuffer indeholdende 0,1 M DTT og 2% SDS og underkastes derefter SDS-PAGE. To prominente bånd af proteiner, som repræsenterer H- og L-kæderne i tetanus- 20 toxinet, udskæres fra SDS-gelen og ekstraheres ved elektro-eluering i 3 timer ved 25 V i 50 mM NH_4CO_3 , 0,2% SDS og 1 mM DTT ved pH 8,2. Efter elektroeluering lyofiliseres materialet og rekonstitueres derefter umiddelbart før T-celle-formeringsafprøvningen. C-fragment fås kommercielt fra Cal- 25 biochem, CA.

Proteinfragmenter, som viser sig at være særligt aktive til tilskyndelse af muse-T-celler, underkastes proteolytisk digereret i et forsøg på yderligere definition af T-cellepitoper. Ved anvendelse af et digereringsystem 30 sammensat af 0,125 M Tris-HCl, 0,05 M DTT, 0,5% SDS og 10% glycerol ved pH 7,0 inkuberes proteinfragmenter ved 37°C i 30 minutter med enten 67 µg/ml chymotrypsin, 5 µg/ml pronase, 3 µg/ml ficin, 0,4 µg/ml subtilisin eller 62,5 µg/ml v8 protease. Peptider frembragt på denne måde kan adskilles 35 ved HPLC med omvendt fase ved anvendelse af en "Vydac C4"-kolonne. Derefter kan de isolerede fragmenter afprøves for

evnen til stimulering af T-celler.

6.6. Resultater.

6.6.1. Forudsagte T-celleepitoper i CRM.

Algoritmen ifølge DeLisi og Berzofsky (DeLisi og
5 Berzofsky, PNAS 82, 2489, 1985) for projektion af poten-
tielle, amfipatiske regioner anvendes på den primære sekvens
af CRM som en første tilnærmelse. Computeranalyse af moleky-
let afslører 6 regioner i proteinet, som vist i fig. 1, som
opfylder kriterierne for en mulig T-celleepitop. Disse regi-
10 oner identificeres som resterne 1-17, 112-135, 229-256,
306-334, 350-380 og 386-408. Hver af disse regioner er sam-
mensat af et minimum på 7 efter hver andre følgende rester,
som, når de undersøges i sammenhæng med proteinets primære
sekvens, har en tilbøjelighed til dannelse af en α -spiral-
15 struktur. Desuden er også regionen 158-173 blevet udvalgt
arbitrært til at tjene som et negativt kontrolmateriale, da
det ud fra computerprojektion ikke forventes at danne en α -
spiralstruktur. Disse peptider har derfor været i fokus
for indledende studier til afbildning af T-celleepitoperne
20 i CRM.

6.6.2. Analyse af syntetiske peptider.

De syntetiske CRM-peptider er sammen med deres amino-
syresekvenser anført i tabel I. Som ovenfor beskrevet er de
forskellige sæt af overlappende peptider blevet frembragt
25 ved additioner til de N-terminale ender af ekstra aminosyre-
rester ved en fastfasetilnærmelse.

Tabel I
Syntetiske CRM-peptider

	CRM-peptid-sekvenser	Gennemsnitlig trinvis koblingsfektivitet (%)	Kumulativt teoretisk udbytte (%)	Renhed bestemt ved HPLC (%)
CRM-peptid 1	307 — I L P G I G S V H G I A D G A V H H N T E E I V A Q S I A L S S — 337	99,2	79,5	58,0
peptid 2	312 — S V H G I A D G A V H H N T E E I V A Q S I A L S S — 332	99,2	82,1	47,0
peptid 3	317 — A D G A V H H N T E E I V A Q S I A L S S — 327	99,1	84,7	71,0
peptid 4	322 — H H H T E E I V A Q S I A L S S — 322	99,2	89,1	65,0
peptid 5	327 — H T E E I V A Q S I A L S S — 327	99,2	90,7	68,0
CRM-peptid 6	358 — A Y N F V E S I I N L F Q V V H N S Y N R P A Y S P G — 383	99,3	83,8	66,0
peptid 7	363 — E S I I N L F Q V V H N S Y N R P A Y S P G — 378	99,4	88,4	66,0
peptid 8	368 — N L F Q V V H N S Y N R P A Y S P G — 373	99,5	92,9	86,0
peptid 9	373 — H N S Y N R P A Y S P G — 368	99,8	98,6	98,0
peptid 10	378 — N S Y N R P A Y S P G — 363	99,7	97,1	100,0
CRM-peptid 11	383 — L F Q V V H N S Y H R P A Y S P G — 358	99,4	92,3	81,0
peptid 12	388 — F Q V V H N S Y N R P A Y S P G — 353	99,5	93,3	78,2
peptid 13	393 — Q V V H N S Y N R P A Y S P G — 348	99,5	94,0	73,0
peptid 14	398 — V V H N S Y N R P A Y S P G — 343	99,5	94,5	97,0
peptid 15	403 — V H N S Y N R P A Y S P G — 338	99,6	96,0	97,0

* De oprindelige epitopbestemmelser er blevet foretaget med et G i stilling 362 i stedet for et E som et resultat af en skrivefejl.

Tabel I viser også den gennemsnitlige, trinvis koblingseffektivitet for hvert syntetisk peptid. I alle tilfælde overstiger den gennemsnitlige effektivitet 99%. Baseret på den trinvis koblingseffektivitet er de kumulative, teoretiske udbytter af syntesen også blevet beregnet, og denne teoretiske værdi angiver det procentvise udbytte af de peptider, som har den korrekte aminosyresekvens efter afslutning af syntesen. Sidste kolonne i tabel I viser renheden af råpeptidblandingen som bestemt ved HPLC-analyse med omvendt fase. En typisk HPLC-analyse af et rå syntesemateriale (peptid 6) er vist i fig. 2a. Peptidet eluerer som en hovedspids ved 25,8 minutter og beløber sig til 66% af det totale areal. Fraktioner af dette peptidmateriale er blevet opsamlet, koncentreret og rechromatograferet som vist i fig. 2b. Det resulterende chromatogram angiver en renhed på 95% eller derover. I alle tilfælde er rå peptidmaterialer med en renhed på under 95% (tabel I) blevet underkastet ét eller flere yderligere HPLC-gennemløb til opnåelse af et homogent slutprodukt.

Den korrekte sekvens af de syntetiske peptider, som vist i tabel I, er blevet verificeret ved direkte aminosyresekvensering. Som et illustrativt eksempel viser fig. 3 udvalgte chromatogrammer af PTH-derivater, med forkortelser i enkeltbogstaver, ud fra 0,5 nanomol HPLC-renset peptid 6 pletteret på TFA-behandlede glasfiberskiver. Numrene svarer til Edman-cyklopen, spidserne a og b er hhv. N',N-dimethyl-N'-phenylthiourinstof og N',N-diphenylthiourinstof, som er biprodukter som et resultat af Edman-reaktionen. Hver af PTH-chromatogrammerne er afbilledet i en målestok efter den største, identificerede aminosyrespids. Som forventet vokser niveauet af "baggrundsstøj" med højere cyklusnummer, men ikke desto mindre er aminosyrespidsidentifikationen for de angivne cyklusser i overensstemmelse med den kendte sekvens (tabel I). Inspektion af de "forudgående" rester (Kent et al., 1982) for hver cyklus antyder også fraværelsen af udeladelsspeptider, og dette understøtter yderligere homogeniteten

af slutproduktet.

6.6.3. Western pletanalyse af PRP-peptid-konjugater.

Den covalente kobling af PRP til de forskellige peptider er blevet verificeret kvalitativt ved Western pletanalyse med monoklonale antistoffer, som er specifikke for PRP. Som vist i fig. 4 har alle de undersøgte peptidkonjugater (PRP, peptid 357-380; PRP, peptid 306-334; og PRP kort, peptid 366-383) vist sig at bestå af et bredt, kontinuerligt interval af tilsyneladende molekylvægt. Noget materiale er blevet tilbageholdt i stablingsgelen. Mønstrer af peptidkonjugaterne er meget lig mønstret af PRP-CRM. I modsætning hertil har PRP alene, som ikke ville forventes at adhærere til nitrocellulose ved overføring, ikke kunnet påvises. Dette antyder derfor, at de påviste bånd repræsenterer PRP covalent koblet til proteiner eller peptider bundet til nitrocellulosen. Det brede bånd af disse konjugater kan skyldes glycosylering af peptider med flere forskellige oligosaccharidtyper.

6.6.4. Immugenicitetspeptidprofil for muse-T-celle.

For at verificere eksperimentelt, om de forudsagte regioner af CRM faktisk er i stand til at tilskynde en T-celleformeringsreaktion eller ej, er reaktionen af DT-primede lymfekirtelceller på disse peptider blevet undersøgt. Som vist i tabel II har lymfeknudeceller opnået ud fra DT-immune mus som forventet reageret specifikt på DT og CRM, men ikke TT. Desuden har disse celler også frembragt en væsentlig reaktion på ansporing in vitro med én af de formodede T-celleepitoper, specifikt region 357-380. Der er også iagttaget marginale reaktioner på regionerne 306-334 og 386-408. Der er ikke iagttaget nogen reaktion på region 158-173, det negative kontrolpeptid, eller et ubeslægtet RSV-peptid. Desuden har cellerne reageret hensigtsmæssigt på både T-cellemitogenet, Con A, og B-cellemitogenet, lipopolysaccharid (LPS). Af de seks potentielle T-celleepitoper, som er identificeret ved computeranalyse har derfor kun region 357-380 været i stand til at stimulere en T-cellereaktion ved den

anvendte musemodel.

Tabel II

Reaktion af Diphtheriatoxoid-primede muse-T-celler på de computerprojicerede, amfipatiske regioner i CRM.

5	Grupper	[³ H]-Thymidininkorporering som ΔCPM + SD	Anspørings- dosis in vi- tro som μg/ml
10	Proteiner		
	DT	64.055 ± 4.572	10
	CRM	51.258 ± 1.262	100
	TT	675 ± 6	1
	Peptider		
15	CRM(1-17)	274 ± 28	50
	CRM(112-125)	0	5
	CRM(158-173)	47 ± 6	100
	CRM(229-256)	833 ± 113	100
	CRM(306-334)	1.000 ± 197	1
20	CRM(357-380)	12.232 ± 231	100
	CRM(386-408)	2.478 ± 33	1
	RSV-peptid	0	1
	Mitogener		
	Con A	59.092 ± 2.344	1
25	LPS	60.529 ± 5.135	100
	Baggrund (som cpm)	1.319 ± 269	-

^a Mus er blevet immuniseret med en optimal koncentration af 50 μg DT emulgeret i Freund's komplette adjuvans.

30 ^b Kulturerne er blevet ansporet med et bredt interval (0,05-100 μg/ml) af proteiner eller peptider. Kun den maksimalt iagttagne reaktion er vist.

6.6.5. Peptidanalogueimmunogenicitetsprofil for muse-T-celle.

Til undersøgelse af muligheden for alternativ koblingskemi er der blevet fremstillet modificerede analoge af CRM-T-celleepitopen 366-383. Modifikationer har omfattet
5 additionen af lysin eller cystein til peptidets N-terminal med eller uden et afstandsgivende element. Derefter er kapaciteten af de analoge til stimulering af muse-T-celler blevet sammenlignet med kapaciteten hos det ikke-modificerede peptid.

10 Resultaterne af T-cellestimuleringsprøver er vist i tabel III. Studiet viser, at de analoge af CRM-peptidet 366-383, ved sammenligning med selve 366-383, bibeholder det meste af kapaciteten til stimulering af DT- eller CRM₁₉₇-primede T-celler. Der kan derfor foretages signifikante
15 ændringer i T-celleepitopen uden at forringe dens kapacitet til stimulering af T-celleaktivitet. Som vist kan disse modifikationer have det formål at forbedre koblingen (det viste eksempel tilvejebringer ϵ -aminogruppen til mere effektiv kobling), at tilvejebringe adgang til forskellige koblingsteknologier (det viste eksempel tilvejebringer en cysteinrest) eller at forbedre T-cellereaktiviteten (ikke vist).
20 Disse modifikationer udstrækker anvendeligheden af peptidbærestoffer ved at muliggøre konjugeringen af et bredt område af B-celleepitoper.

Tabel III

Virkninger af modifikation af CRM-peptid 366-383 på T-celle-
erkendelse.

		[³ H]-Thymininkorporering som Δcpm	
5 Ansporing		DT-primet	CRM-primet
Proteiner			
	DT	81.825	31.348
	CRM	63.348	88.009
10	TT	804	0
CRM-peptider			
	157-173	1.935	1.147
	357-383	23.047	16.009
15	366-383	43.263	22.722
	369-383	40.489	28.198
Modificerede CRM-peptider			
	L- (366-383)	35.202	26.705
20	LG- (366-383)	33.354	22.852
	CG- (366-383)	46.141	26.337
	RSV-peptid	1.726	0
25	Mitogener		
	Con A	42.017	34.117
	LPS	57.143	40.520
30	Baggrunds- medier (som cpm)	1.537	1.210

6.6.6. Immunogenicitetspeptidprofil for human T-celle.

Ud over at undersøge muse-T-cellereaktionen på de formodede T-celleepitoper er peptidreaktionsprofilen eller leukocyter fra perifert blod fra flere frivillige mennesker
5 blevet undersøgt. Individerne er blevet udvalgt tilfældigt og er ikke blevet immuniseret med overlæg med DT før afprøvning. Derfor er det blevet forventet, at reaktionen på DT varierer som et resultat af individuelle historier og af deres særegne genetiske sammensætning. To af de fire individer har frembragt meget lave reaktioner på DT eller CRM
10 og har ligeledes været ikke-reagerende på et vilkårligt peptid (data ikke vist), hvilket viser, at peptiderne har manglet enhver mitogen, ikke-antigenspecifik aktivitet. Som vist i tabel IV har de resterende individer reageret i væsentlig grad på DT, CRM og TT og har frembragt varierende grad af reaktion på ansporing in vitro med hvert af CRM-peptiderne. Overensstemmende og positive reaktioner i begge individer er blevet noteret med peptiderne 306-334, 353-383 og 386-408. En positiv reaktion på phytohemagglutinin (PHA),
15 et humant T-cellemitogen, er også blevet iagttaget.
20

Tabel IV

Reaktion af humane leukocyter fra perifert blod på de computerprojicerede, amfipatiske regioner af CRM

5	Grupper	[³ H]-Thymidininkorporering som Δcpm ±SA (Anspøringsdosis in vitro som μg/ml) ^a			
		SP		VM	
10	Proteiner				
	DT	244.776 ± 2.889	(10)	88.595 ± 8.635	(10)
	CRM	186.076 ± 21.208	(5)	100.938 ± 12.805	(5)
	TT	38.917 ± 6.911	(5)	143.955 ± 13.502	(20)
15	Peptider				
	CRM(1-17)	18.329 ± 403	(100)	6.932 ± 278	(10)
	CRM(112-135)	10.990 ± 1.895	(100)	8.505 ± 214	(10)
	CRM(158-173)	1.324 ± 83	(100)	5.346 ± 2.052	(5)
20	CRM(229-256)	6.803 ± 1.753	(50)	6.111 ± 379	(10)
	CRM(306-334)	7.974 ± 1.194	(100)	18.023 ± 733	(10)
	CRM(357-380)	10.351 ± 1.077	(100)	13.004 ± 881	(100)
	CRM(386-408)	14.160 ± 653	(100)	23.337 ± 3.531	(10)
25	RSV peptid	0	(5)	5.201 ± 1.079	(5)
	Mitogener				
	PHA	161.956 ± 9.267	(5)	37.881 ± 3.293	(5)
30	Baggrund (som cpm)	2.024 ± 79		1.694 ± 1.778	

^a Kulturerne er blevet ansporet med et bredt interval (0,05-100 μg/ml) af proteiner eller peptider. Kun den maksimalt iagttagne reaktion er vist.

6.6.7. Anti-peptid-T-cellereaktioner.

Efter at det er vist, at regionen 357-380 i CRM erkendes af DT-primede T-celler som en T-celleepitop, har det været nødvendigt at bestemme, om peptidet selv er et effektivt immunogen eller ej. Derfor er SJL-mus blevet immuniseret med 100 μ g CRM (357-380) eller 50 μ g DT eller CRM. En yderligere gruppe mus har fået 100 μ g CRM (306-334) som et alternativt peptid for at påvise specificitet af reaktionen. Som vist i tabel V har T-celler fra mus immuniseret med DT reageret som forventet på DT, CRM og peptidet CRM (357-380). Et lignende reaktivitetsmønster er blevet iagttaget med celler fra mus immuniseret med CRM, selv om reaktionerne på CRM og peptidet har været væsentlig højere. Det er interessant, at celler primet med CRM (357-380) har reageret specifikt på ansporing med CRM (357-380) samt krydsreageret på CRM-proteinet. I modsætning hertil har celler primet med CRM (306-334) ikke frembragt en signifikant reaktion på ansporing in vitro med noget af de undersøgte proteiner, og det har kun været svagt reagerende på ansporing med selve det immuniserende peptid 306-334. Alle cellerne har imidlertid reageret hensigtsmæssigt på både Con A og LPS. Det er tydeligt, at region 357-380 ikke alene er en T-celledeterminant i CRM, da den erkendes af celler primet med det native protein, men den er også i stand til at inducere anti-peptid-T-celler, som kan erkende det native protein.

Tabel V

T-Cellereaktioner efter peptid- eller proteinpriming i SJL-mus

Ansporing in vitro	[³ H]-Thymidininkorporering som Acpm $\pm$ SA			
	DT		Primingsantigener	
			CRM(306-334)	CRM(357-380)
CRM				
DT				
TT				
Peptider				
CRM(306-334)				
CRM(357-380)				
CRM(158-173)				
RSV-peptid				
Mitogener				
Con A				
LPS				

aMus er blevet immuniseret med 50 μ g protein, en DT eller CRM, eller 100 μ g peptid, enten CRM(306-337) eller CRM(357-380), emulgeret i Freund's komplette adjuvans.

bKulturerne er blevet ansporet med et bredt interval (0,05-100 μ g/ml) af proteiner eller peptider. Kun den maksimale iagttagne reaktion er vist.

6.6.8. Forfinelse af T-cellegrænser.

Til afgrænsning af den minimale sekvens i region 357-380, som er nødvendig til fremkaldelse af en T-cellereaktion, er der blevet syntetiseret et sæt peptider, som varierer ved N-terminalen. Desuden er C-terminalen for at sikre, at den fulde T-celleepitop ville være inden for dette sæt peptider, blevet etableret ved rest 384, som er fire rester ud over grænsen for det aktive peptid, 357-380. Derfor er følgende peptider blevet fremstillet og afprøvet for T-celle-reaktivitet: 357-383, 362-383, 366-383, 372-383 og 373-383. Som vist i tabel VI har mus primet med enten DT eller CRM reageret på samme måde på enten peptidet 357-380 eller peptidet 357-383, selv om reaktionen på 357-383 har været en smule højere. Det kortere peptid 362-383 har været ækvivalent med 357-383 til stimulering af DT-primede T-celler, men har været mere effektivt end det længere peptid til stimulering af CRM-primede T-celler. Det er interessant, at fjernelse af fire yderligere rester, peptid 366-383, har haft en dramatisk virkning på T-celleerkendelse. Med både de DT- og CRM-primede T-celler er der blevet iagttaget en stærkt forøget reaktion efter ansporing in vitro med dette peptid. Fjernelse af yderligere rester, som vist med peptiderne 372-383 og 373-383, har resulteret i nedsatte T-cellereaktioner i både de DT- og CRM-primede celler. Desuden har begge grupper af celler reageret hensigtsmæssigt på DT, CRM og mitogenerne.

Tabel VI
T-Cellereaktioner af proteinprimede SJL-mus på et sæt af peptider i regionen 357-383 af i CRM
[³H]-Thymidininkorporering som ACPM ± SA
(Dosis som µg)

Ansporing in vitro	Priming:		DT	(Dosis som µg)		CRM
Proteiner						
DT	46.701 ± 1.439	(10)		34.027 ± 3.659	(10)	
CRM	99.933 ± 2.581	(200)		177.440 ± 4.278	(100)	
PRP-CRM	54.644 ± 885	(100)		126.700 ± 10.402	(200)	
TT	0	(200)		405 ± 31	(5)	
Peptider						
CRM(357-380)	2.885 ± 89	(50)		10.401 ± 622	(200)	
CRM(357-383)	6.637 ± 202	(50)		13.411 ± 451	(50)	
CRM(362-383)	6.222 ± 1.432	(0,1)		19.673 ± 249	(10)	
CRM(366-383)	32.154 ± 1.615	(200)		36.732 ± 580	(50)	
CRM(372-383)	3.996 ± 931	(5)		10.661 ± 707	(200)	
CRM(373-383)	876 ± 66	(5)		8.637 ± 1.644	(50)	
CRM(306-334)	674 ± 8	(0,1)		4.838 ± 547	(5)	
CRM(158-173)	421 ± 9	(100)		5.007 ± 1.016	(200)	
RSV-peptid						
Mitogener						
Con A	41.989 ± 3.206	(1)		48.819 ± 3.323	(1)	
LPS	61.277 ± 4.477	(50)		59.705 ± 1.207	(50)	
Baggrund (som cpm)	1.661 ± 419			696 ± 57		

a Mus er blevet immuniseret med en optimal koncentration af 50 µg DT eller CRM emulgeret i Freund's komplette adjuvans.

b Kulturerne er blevet ansporet med et bredt interval (0,1-200 µg/ml) af proteiner eller peptider. Kun den maksimale iagttagne reaktion er vist.

Til yderligere afgrænsning af epitopen i denne region er der blevet syntetiseret to sæt peptider. Det ene sæt peptider består af en række peptider med en C-terminal fast ved resten 383, medens N-terminalen varieres trinvis fra 5 resten 357 til resten 373. Det andet sæt peptider har bibeholdt N-terminalen ved resten 366, medens C-terminalen har varieret trinvis fra resten 375 til 383. Begge sæt peptider er blevet afprøvet ved T-celleformering.

Der er gennemført tre individuelle forsøg med tilsva-
10 rende resultater. Et repræsentativt forsøg er vist i tabel VII. Ved kortlægning af N-terminalen er der i både de DT- og CRM-prime grupper iagttaget sammenlignelig T-celleaktivitet med peptidundersættet 353-383 til 370-383 inklusive. Udeladelse af N-terminalresterne 371, 372 eller 373 har
15 resulteret i udtalte nedgange i T-celleaktivitet. Denne iagttagelse antyder kraftigt, at N-terminalgrænsen for T-celleepitopen er rest 369 eller 370. Ved forsøget for opløsning af C-terminalen har resultaterne vist, at maksimal T-celleaktivitet er opnået med peptidet 366-383. Alle udeladel-
20 ser af C-terminalresterne har resulteret i nedsat T-celleaktivitet. Dette resultat antyder, at C-terminalen af epitopen er ved resten 383 eller derudover. Som kortlagt ved disse studier vil T-celleepitopen være lokaliseret til 369 (370)-383 i CRM₁₉₇.

Tabel VII

Kortlægning af N- og C-terminalgrænser for C-celledeterminanten i region 357-383 i CRM ved anvendelse af lymfeknudeceller fra diphtheriatoxoid eller CRM-primede SJL-mus.

5	Ansporing in vitro	[³ H]-Thymidininkorporering som ΔCPM in vitro	
		DT-primet	CRM-primet
10	Proteiner anvendt som kontroller:		
	Diphtheriatoxoid	109.534	51.632
	CRM	97.002	159.663
	Tetanustoxoid	0	1.347
15	CRM-peptider anvendt til N-terminal kortlægning:		
	CRM(357-383)	43.577	41.641
	CRM(362-383)	35.785	46.637
	CRM(366-383)	57.081	44.403
	CRM(367-383)	55.624	48.589
20	CRM(368-383)	50.543	63.718
	CRM(369-383)	54.354	61.941
	CRM(370-383)	73.461	64.320
	CRM(371-383)	30.980	47.411
	CRM(372-383)	17.460	24.343
25	CRM(373-383)	4.178	2.598
	CRM-peptider anvendt til C-terminal kortlægning:		
	CRM(366-381)-Gly	43.429	39.983
	CRM(366-379)-Gly	31.265	36.370
	CRM(366-377)-Gly	15.073	20.023
30	CRM(366-375)-Gly	6.333	6.326
	CRM-peptider anvendt som kontroller:		
	CRM(158-173)	590	733
	CRM(306-334)	3.435	1.151

Tabel VII (fortsat)

Kortlægning af N- og C-terminalgrænser for C-celledeterminanten i region 357-383 i CRM ved anvendelse af lymfeknudeceller fra diphtheriatoxoid eller CRM-primede SJL-mus.

5	Ansporing in vitro	[³ H]-Thymidininkorporering som ΔCPM in vitro
		DT-primet CRM-primet
10	Ubeslægtet peptid anvendt som kontrol:	
	RSV	0 1.409
	Mitogener:	
	Con A	32.952 45.771
15	LPS	65.765 67.100
	Baggrund (som cpm)	2.501 2.007

6.7. Anti-PRP- og anti-CRM-reaktion fremkaldt af peptidkonjugater.

Efter at der forud er lokaliseret en determinant for T-celleerkendelse i CRM, har det været nødvendigt at bestemme, om den afgrænsede region har kunne virke som et effektivt bærestofmolekyle for PRP eller ej. Desuden har det også været af interesse at bestemme, om udsættelse i forvejen for bærestofproteinet, DT, har ændret erkendelsen af PRP-konjugaterne. I overensstemmelse hermed er mus blevet immuniseret med DT, TT eller saltopløsning emulgeret i Freund's komplette adjuvans. En uge senere er grupperne af dyr blevet immuniseret med et PRP-konjugat. En anden konjugatimmunisering er blevet indgivet efter et tidsrum på 2 uger. Antistofreaktionen mod PRP fremkaldt i disse dyr er vist i tabel VIII. Primære (vist ved dag 21) antistofreaktioner på PRP er blevet påvist efter immuniseringer med både PRP-CRM og, signifikant, PRP-(357-380) af de dyr, som i forvejen er blevet behandlet med DT eller saltopløsning. Da antistof mod PRP har været tydeligt i begge disse grupper, ser det ud til, at udsættelse i forvejen for DT ikke har indflydelse på frembringelsen af en antistofreaktion. Snarere har PRP-(357-380) i sig selv været tilstrækkeligt til frembringelse af en primær reaktion mod PRP, hvis størrelse har været meget lig med den reaktion, som er frembragt af PRP-CRM. Sekundære reaktioner mod PRP er også blevet påvist efter immuniseringer med PRP-CRM og PRP-(357-380). Disse resultater viser tydeligt, at en konjugatvaccine sammensat af PRP og syntetisk peptid er i stand til at frembringe antistoffer mod PRP.

Tabel VIII
Antistofreaktion på PRP-CRM-konjugatvaccine eller på PRP-CRM-peptidkonjugater i diphtheriatoxid-primede mus.

Immunisering på dag		Antistof mod PRP ($\mu\text{g/ml}$) på dag ^b					
0	7	21	7	21	32	42	49
DT	PRP-CRM	PRP-CRM	<0,10	2,94	8,40	8,72	4,58
DDT	PRP-(357-383)	PRP-(357-383)	<0,10	3,29	1,39	6,49	8,43
DDT	PRP-(306-334)	PRP-(306-334)	<0,10	<0,10	5,95	<0,10	<0,10
DDT	PRP-(229-256)	PRP-(229-256)	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
DDT	PRP-RSV	PRP-RSV	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
TT	PRP-CRM	PRP-CRM	<0,10	0,43	5,02	4,05	1,03
TTT	PRP-(357-383)	PRP-(357-383)	<0,10	<0,10	2,08	2,87	3,45
TTT	PRP-(306-334)	PRP-(306-334)	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
TTT	PRP-(229-256)	PRP-(229-256)	<0,10	<0,10	0,16	<0,10	<0,10
TTT	PRP-RSV	PRP-RSV	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
SA	PRP-CRM	PRP-CRM	0,24	3,85	11,46	9,32	10,77
SSA	PRP-(357-383)	PRP-(357-383)	<0,10	2,32	3,89	3,85	4,17
SSA	PRP-(306-334)	PRP-(306-334)	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
SSA	PRP-(229-256)	PRP-(229-256)	<0,10	<0,10	0,31	0,21	0,29
SSA	PRP-RSV	PRP-RSV	<0,10	<0,10	0,22	0,22	0,28

^a Mus er blevet immuniseret med en optimal koncentration af 50 μg DT emulgeret i Freund's komplette adjuvans og derefter ansøret med 5 μg peptid- eller 2,5 μg konjugatvaccine i saltopløsning i uge 1 og uge 3.
^b Sera er indsamlet fra individuelle mus 7, 21, 32, 42 og 49 dage efter immunisering med DT. Seraprøver fra en given gruppe er derefter blevet slået sammen til radioimmunoafprøvning.

En sekundær reaktion på PRP er også blevet i iagttaget efter immunisering med PRP-(306-334). Det må erindres, at denne region ved computeranalyse er blevet afbildet som indeholdende en T-celleepitop, men den har dog udvist minimal kapacitet til stimulering af T-celler opnået fra dyr primet med diphtheriatoxoid eller CRM₁₉₇. Desuden har dette peptid ikke været effektivt ved priming for en anti-peptid-reaktion. Det er interessant, således som det er vist i fig. 5, at reaktionen efter immunisering med PRP-(306-334) er fremkaldt i de dyr, som i forvejen har været udsat for toxoidet, DT. Sammenfattende er det blevet vist, at CRM-peptid 306-344 er anvendeligt som et bærestofmolekyle for PRP. Selv om standardformeringsprøver ikke overbevisende har vist, at denne region er en T-celleepitop, understøtter disse forsøg, som viser den positive indflydelse af forudgående udsættelse for det intakte protein, den konklusion, at denne region faktisk er en T-celleepitop.

Det er også af betydning at fastslå, om peptidkonjugaterne frembringer antistoffer, som krydsreagerer med hele CRM-proteinet. Derfor er disse sera også blevet screenet ved ELISA for anti-CRM-antistoffer. Som vist i tabel IX er bindingsaktivitet til CRM kun blevet påvist hos de dyr, som er immuniseret med PRP-CRM eller forbehandlet med DT. Ingen af peptidkonjugaterne frembringer, når de injiceres i de TT- eller saltopløsningsbehandlede grupper, antistoffer imod CRM.

Tabel IX
Antistofreaktion på PRP-CRM-konjugatvaccine eller på PRP-CRM-peptidkonjugater i diphtheriatoxid-primede mus.

Immunisering på dag		Antistof til CRM som reciprok af serumfortynding på dag ^b					
0	7	21	7	21	32	42	49
DT	PRP-CRM	PRP-CRM	200	>51.200	>51.200	>51.200	>51.200
DT	PRP-(357-383)	PRP-(357-383)	400	>51.200	>51.200	>51.200	>51.200
DT	PRP-(306-334)	PRP-(306-334)	200	>51.200	>51.200	>51.200	>51.200
DT	PRP-(229-256)	PRP-(229-256)	1.600	>51.200	>51.200	>51.200	>51.200
DT	PRP-RSV	PRP-RSV	800	>51.200	>51.200	>51.200	>51.200
TT	PRP-CRM	PRP-CRM	<20	25.600	>51.200	>51.200	>25.600
TT	PRP-(357-383)	PRP-(357-383)	20	<20	<20	<20	<20
TT	PRP-(306-334)	PRP-(306-334)	<20	<20	<20	<20	<20
TT	PRP-(229-256)	PRP-(229-256)	<20	<20	<20	<20	<20
TT	PRP-RSV	PRP-RSV	<20	<20	<20	<20	<20
SA	PRP-CRM	PRP-CRM	100	25.600	>51.200	>51.200	>51.200
SA	PRP-(357-383)	PRP-(357-383)	20	<20	<20	<20	<20
SA	PRP-(306-334)	PRP-(306-334)	<20	20	40	20	20
SA	PRP-(229-256)	PRP-(229-256)	<20	<20	<20	<20	<20
SA	PRP-RSV	PRP-RSV	<20	<20	20	<20	<20

^a Mus er blevet immuniseret med en optimal koncentration af 50 µg DT emulgeret i Freund's komplette adjuvans og derefter ansøret med 5 µg peptid- eller 2,5 µg konjugatvaccine i saltopløsning i uge 1 og uge 3.
^b Sera er indsamlet fra individuelle mus 7, 21, 32, 42 og 49 dage efter immunisering med DT. Seraprøver fra en given gruppe er derefter blevet slået sammen til ELISA.

Efter de ovenfor skitserede metoder til PRP-CRM-podning er mus også blevet immuniseret med konjugater af forskellige, typespecifikke pneumococpolysaccharider og CRM. Resultaterne af disse podninger vist i tabel X. Også her
 5 viser disse data, at en B-celledeterminant indeholdende antigen konjugeret til en bakterie-T-celleepitop effektivt kan frembringe en immunreaktion hos det podede individ.

Tabel X

10 Antistofreaktioner på typespecifikke pneumococpolysaccharider indgivet på et bærestofmolekyle af et syntetisk peptid.

15	Immunisering		Typespecifikt antistof som µg/ml i uge				
	Oligosacc.	Bærestof	Adjuvans	0	2	4	6
20	Type 14	Peptid	-	<0,10	0,19	2,67	NA
		Peptid	+	<0,10	0,41	3,74	NA
25		CRM	-	<0,10	0,39	0,55	NA
	Type 19	Peptid	-	<0,10	<0,10	0,20	NA
		Peptid	+	<0,10	<0,10	0,73	NA
30		CRM	-	<0,10	<0,10	NA	NA

Mus immuniseres med typespecifikt pneumococoligosaccharid koblet til CRM₁₉₇ eller til CRM-peptidet 357-380. Konjugatet
 35 indgives i uge nul og to med eller uden 100 μg alun som adjuvans. Antistofværdier er blevet bestemt ved en standard-Farr-afprøvning.

Uafhængig bekræftelse af anvendeligheden af PRP-peptid-konjugatet som den vaccine er opnået ved funktionsanalyse
 40 af det frembragte antistof. PRP kobles ved reduktiv aminering til CRM-peptidet 369-383, som forventes snævert at nærme sig den minimale sekvens, som er nødvendig til stimulering af T-celler. PRP-peptid eller PRP-CRM anvendes uden adjuvans

til immunisering af SJL-mus i ugerne nul og to. Sera indsamles som vist i tabel XI og afprøves for baktericid aktivitet in vitro imod to stammer af *H. influenzae*, Eagan eller det kliniske isolat Hst54. En stigning i titer på fire gange
5 betragtes som immunologisk signifikant.

Tabel XI

10 Baktericid aktivitet af antistof frembragt ved immunisering med PRP-peptid eller PRP-CRM-konjugat.

	Immunogen	Baktericid aktivitet i uge efter immunisering		
15		0	2	4
20	Aktivitet imod Eagan			
	PRP-CRM	<1/5	1/20	1/20
	PRP-CRM(369-383)	<1/5	1/10	1/20
25	Aktivitet imod Hst54			
	PRP-CRM	1/5	1/80	1/10
	PRP-CRM(369-383)	<1/5	1/40	1/10
30				

Som vist i tabel XI har det antistof, som er frembragt efter immunisering med enten PRP-CRM eller PRP-peptid signifikant baktericid aktivitet imod begge stammer, som det fremgår af stigningen i titer på fire gange mellem uge nul og uge to. Desuden er den forskel i maksimum, som opnås mellem PRP-peptid- og PRP-CRM-immuniserede dyr, ikke signifikant forskellig. Antistof frembragt af peptidkonjugatet
40 er funktionelt ækvivalent med det antistof, som fås efter immunisering med det native protein.

6.8. Anti-PRP- og anti-CRM-reaktion frembragt af konjugater omfattende en modificeret peptidanalogs.

Efter at det er fastslået, at en modificeret analog
45 af CRM-T-celleepitopen 366-383 har kapacitet til stimulering

af muse-T-celleformering, har det være nødvendigt at fastslå, om en sådan analog kan fungere som et effektivt bærestofmolekyle. PRP er ved reduktiv aminering blevet koblet til lysinanalogen af CRM-peptidet 366-383 via ϵ -aminogruppen.

- 5 Efter konjugering er forskellige doser af PRP-[Lys]-CRM(366-383) blevet anvendt til immunisering af SJL-mus uden adjuvans. Dyrene får injektioner i ugerne nul og fire. Sera indsamles med de i tabel XII viste mellemrum og afprøves for antistof, som er specifikt for PRP.

10

Tabel XII

Indledende antistofstudium, som undersøger additionen af N-terminalt lysin til CRM-bærestofpeptidet 366-383, hos SJL-mus.

15

Antistof ($\mu\text{g/ml}$) mod PRP i uge efter immunisering

20

Immunogen	Dosis	0	2	4	8
PRP-[Lys]-CRM(366-383)	10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
	5	<0,10	0,16	0,77	2,43
	2,5	0,28	0,31	0,34	1,10
	1,0	<0,10	0,20	1,71	1,85
	0,5	<0,10	0,10	0,98	1,30
	0,1	<0,10	0,75	2,22	2,64
PRP	2,5	<0,10	<0,10	<0,10	0,34
PRP-CRM	2,5	<0,10	1,06	2,37	9,60

35

Som vist i tabel XII frembringer adskillige doser af peptidkonjugatet PRP-[Lys]-CRM(366-383) antistof specifikt for PRP, som overstiger koncentrationen 1 $\mu\text{g/ml}$. Dette studium viser derfor, at lysinanalogen af CRM-peptidet 366-383 har anvendelighed som bærestofmolekyle.

40

6.9. Tetanustoxinepitoper.

Tetanustoxinfragmenterne H, L og C er blevet afprøvet for deres evne til stimulering af muse-T-celleformering. Alle tre fragmenter har frembragt en væsentlig T-celleakti-

vitet, men som vist i tabel XIII har C-fragmentet imidlertid været tydeligt overlegent. Stimulerende aktivitet er også blevet afprøvet ved den mononucleare celleafprøvning med humant, perifert blod. Som vist i tabel XIV har T-cellehoved-
 5 aktiviteten hos dette individ været forbundet med den tunge kæde i tetanustoxinet.

Tabel XIII

10 T-cellereaktioner i tetranustoxoidprimede SJL-mus på tetanus-toxinfragmenter.

[³H]-Inkorporering (cpm)

15	Ansparing	Forsøg nr. 1	Forsøg nr. 2
	Tetanustoxoid	50.890	45.284
	Diphtheria	0	0
20	C-Fragment	22.180	44.328
	H-Kæde	18.629	29.870
	L-Kæde	26.655	12.543
25	Con A	23.354	40.588
	LPS	39.946	42.578
	Baggrunds- medier (som cpm)	655	1.082

Tabel XIV

Humane formeringsreaktioner på tetranustoxoid- og tetranus-
toxinfragmenter.

5

	Antigen	[³ H]-Thymidininkorporering som Δcpm	Dosis som μg/ml
10	Con A	14.539	-
	PHA	17.110	-
	PHA + pufferkontrol	25.621	-
	LPS	5.053	-
	Tetanustoxin	90.271	10
15	Tung kæde	78.830	1
	Let kæde	64.290	100
	C-Fragment	41.306	50
	Diphtheriatoxoid	7.973	100

20

Fragment C, som har vist sig at være meget aktivt til stimulering af formeringen af muse-T-celler, er blevet underkastet proteolytisk digereret ved hjælp af pronase, ficin, subtilisin eller V8. SDS-PAGE af de rå, enzymatiske digereret af tetanustoxinfragment C har ikke vist noget påviseligt, intakt fragment C efter digereret med de fire ovenfor angivne enzymer. Derefter er digereretene blevet afprøvet for deres evne til stimulering af muse-T-celler. Tre af proteasedigereringsblandingerne (pronase, subtilisin og V8) har bibeholdt væsentlig T-celleaktivitet som vist i tabel XV. De data, som er vist i tabel XV, antyder, at enten pronase- eller V8-proteasedigeret vil give peptidfragmenter, som er særligt anvendelige ved kortlægning af T-cellepitoper.

30

Tabel XV

Enzymatisk digerering af tetranustoxin C-fragment - T-celleformeringsstudier^a.

5	Enzym	Dosis som ($\mu\text{g/ml}$) ^b	[³ H]-Thyminininkorporering som Δcpm		
10	Reaktion på C-fragment				Enzym alene
	Behandling:	Ingen	Enzym	Puffer	
15	Pronase	1	45.254	27.681	702 0
	Ficin	0,1	4.357	4.179	2.243 332
	Subtilisin	1	45.254	19.884	702 0
	V8	0,5	21.903	30.264	8.187 0
20					

^a Kontrolreaktioner som Δcpm (dosis ved maksimal reaktion): TT 102.730 (5); C-fragment 120.126 (100); DT 397 (0,5); Con A 31.343 (1) og LPS 39.750 (50). Baggrundsreaktionen er 1334 cpm.

25 ^b Dosis af fragment C i enzymatisk digerering. "Ingen" refererer til reaktionen på fragment C alene ved den dosis, hvor der er opnået en maksimal reaktion i digereringen.

Til yderligere afgrænsning af potentielle T-celle-
 30 epitoper i fragmenter frembragt ved V8-digerering, er disse fragmenter blevet adskilt ved HPLC med omvendt fase. Fem fraktioner er opsamlet og analyseret ved SDS-PAGE. Fire af de fem fraktioner har vist sig at indeholde hovedpeptider, og de er alle blevet afprøvet ved muse-T-celleformeringsaf-
 35 prøvningen. Som vist i tabel XVI har fraktionerne 3, 4 og 5 frembragt en signifikant T-cellereaktion. Fraktion 3 indeholder et hovedbånd med en molekulvægt på 10K, og fraktionerne 4 og 5 indeholder hovedbånd på hhv. ca. 22K og 17K.

Tabel XVI

Formeringsreaktion af tetanustoxoidprimede T-celler på fragment C og peptider fra fragment C.

5		Max. CPM $\pm$ SA (Dosis som μ g/ml)
	Medium	945 $\pm$ 234
	CA 1,0 μ g/ml	37.758 $\pm$ 687
10	LPS 50,0 μ g/ml	61.390 $\pm$ 2.662
	Tet.toxoid	149.578 $\pm$ 10.581
	Diphth.toxoid	879 $\pm$ 26
	C-Fragment	140.025 $\pm$ 10.156
15	Proteasefrak. 1	1.270 $\pm$ 8
	Proteasefrak. 2	1.828 $\pm$ 240
	Proteasefrak. 3	5.158 $\pm$ 372
	Proteasefrak. 4	14.772 $\pm$ 1.308
	Proteasefrak. 5	23.065 $\pm$ 1.181
20		

Til yderligere analyse af V8-digereringsfragmenterne er fraktionerne 1-5 blevet adskilt ved SDS-PAGE, overført til "Immobilon[®]"-papir (Millipore) og sekvenseret direkte.

25 Partielle sekvenser af de to fragmenter, båndet på 22K fra fraktion 4 og båndet på 17K fra fraktion 5, er blevet bestemt og sammenlignet med den kendte sekvens i tetanustoxin (Eisel et al., EMBO J. 5, 2495-2502, 1986). Baseret på molekylvægt-bedømmelser ud fra SDS-PAGE og sekvenseringsdata har man

30 draget den slutning, at fragmentet på 22K svarer til tetanustoxinresterne 1128-1309, og fragmentet på 17K svarer til resterne 974-1116.

Til tydeligere lokalisering af T-celleepitoperne i C-fragmentet er strategien med anvendelse af overlappende,

35 syntetiske peptider blevet anvendt. Denne strategi har krævet syntesen af 37 peptider med en længde på 19-20 rester og med en overlapning på 7 rester til undersøgelse af den primære sekvens af C-fragmentet. Da proteasedigereringsstudierne

har antydnet, at T-celleaktiviteten potentielt er associeret med fragmenterne på 17K og 22K, har de indledende anstrengelser været fokuseret på den kraftigste af disse to regioner. Som vist i tabel XVII er overlappende syntetiske peptider, 5 som begynder ved resten 973, og som spænder over en del af regionen 974-1116, blevet undersøgt for T-celleaktivitet. Af de undersøgte peptider har tetanustoxinpeptid 961-980 og 1021-1040, som falder inden for C-fragmentet, fremkaldt signifikante T-celleformeringsreaktioner ved hjælp af tetanustoxoidprimede muselymfocyter. Der er således ved anvendelsen af denne teknik blevet lokaliseret to potentielle T-10 -cellepitoper i tetanustoxinfragment C.

Tabel XVII

T-cellereaktioner af tetanustoxoidprimede lymfekirtelceller på overlappende, syntetiske peptider omfattende en udvalgt region af tetanusfragment C.

5			
10	Ansporing in vitro	[³ H]-Thymidininkor- porering som Δcpm	Dosis som (μg/ml)
	Proteiner		
	Tetanustoxoid	242.421	5
	Tetanusfragment C	296.801	100
15	Diphtheriatoxoid	3.892	1
	Tetanustoxinpeptider		
	961-980	32.276	100
	973-992	10.457	100
20	997-1016	6.347	100
	985-1004	3.600	50
	1009-1028	5.130	100
	1021-1040	100.332	50
	1273-1292	11.230	50
25	Mitogener		
	Con A	44.077	1
	LPS	86.740	50
30	Baggrunds- medier (som cpm)	3.639	

7.0. Antistofreaktion på ikke-carbonhydrat-hapten-konjugater.

35 B-celleepitopen fra protein F fra respiratorisk syncytialt virus (RSV) er blevet koblet til CRM-T-celleepitopen 369-383 eller til det intakte, native protein. SJL-mus er blevet immuniseret i ugerne nul og to med 5 μg vægtækvivalent af peptiderne 369-383 blandet med alun. Sera er blevet ind-
40 samlet. Som vist i fig. 6 er der frembragt antistof mod

RSV-F-proteinet efter immunisering med B-celleepitopen i RSV (283-315) koblet til enten helt CRM eller til CRM-peptidet 369-383. Dette forsøg viser anvendeligheden af CRM-peptidet 369-383 til at tjene som et bærestofmolekyle for
5 andre materialer end carbonhydrater. I dette tilfælde er det specifikke eksempel et peptid, som repræsenterer en B-celleepitop i et virusprotein.

P a t e n t k r a v .

1. Oligopeptid, k e n d e t e g n e t ved, at det i det væsentlige består af en T-celleepitop af et bakterietoxin, -CRM eller -toxoid, fortrinsvis diphtheriatoxin, 5 tetanustoxin, pertussistoxin, -CRM eller -toxoid, især diphtheriatoxinet CRM₁₉₇.

2. Oligopeptid ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det har en aminosyresekvens udvalgt fra den gruppe, som består af CRM₁₉₇ peptid 357-383, CRM₁₉₇ peptid 366-383, 10 CRM₁₉₇ peptid 369-383, CRM₁₉₇ peptid 306-334 og antigenfragment, -homolog eller -analog til disse.

3. Oligopeptid ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at toxinet eller toxoidet er tetanustoxin eller -toxoid, som har en aminosyresekvens udvalgt fra den gruppe, som 15 består af peptid 961-980 i tetanustoxin, peptid 1021-1040 i tetanustoxin og antigenfragment, -homolog eller -analog til disse.

4. Oligopeptid ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det har aminosyresekvensen Q V V H N S Y N R P A Y S P G, N L F Q V V H N S Y N R P A Y S P G, A Y N F V E 20 (eller G) S I I N L F Q V V H N S Y N R P A Y S P G, I L P G I G S V M G I A D G A V H H N T E E I V A Q S I A, V S A S H L E Q Y G T N E Y S I I S S M eller D K F N A Y L A N K W V F I T I T N D R .

25 5. Oligopeptid ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at en lysin- eller cysteinrest er koblet til aminoterminus, carboxyterminus eller dem begge, hvorhos lysin- eller cysteinresten fortrinsvis er koblet til amino- eller carboxyterminus gennem en glycinrest.

30 6. Immunogent konjugat, k e n d e t e g n e t ved, at det i det væsentlige består af et antigen bundet til et oligopeptid ifølge krav 1.

7. Konjugat ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at bakterietoxinet, -CRM'et eller -toxoidet fortrinsvis 35 er diphtheriatoxin, tetanustoxin, pertussistoxin, -CRM eller -toxoid, især diphtheriatoxinet CRM₁₉₇.

8. Konjugat ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at epitopen har en aminosyresekvens udvalgt fra den gruppe, som består af CRM₁₉₇ peptid 357-383, CRM₁₉₇ peptid 366-383, CRM₁₉₇ peptid 369-383, CRM₁₉₇ peptid 306-334, peptid
5 961-980 i tetanustoxin, peptid 1021-1040 i tetanustoxin og antigenfragment, -homolog eller -analog til disse.

9. Konjugat ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at antigenet er udvalgt fra den gruppe, som består af mikroorganismeantigener, virusantigener, parasitantigener,
10 tumorantigener, allergener og antigener med relation til autoimmuniteten, hvorhos antigenet fortrinsvis er en kapsel-polymer, en oligomer eller et fragment deraf, især et bakterielt antigen.

10. Konjugat ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at kapselpolymeren eller -oligomeren stammer fra Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis eller Salmonella typhi.

11. Konjugat ifølge krav 10, k e n d e t e g n e t ved, at kapselpolymeren er polyribosylribitolphosphat fra
20 Haemophilus influenzae.

12. Konjugat ifølge krav 10, k e n d e t e g n e t ved, at kapselpolymeren er fra serotype 1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F eller 23F fra Streptococcus pneumoniae.

13. Konjugat ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at antigenet er et bakterieydermembranprotein, et bakterieoverfladeprotein, et bakterieoverfladesaccharid eller et bakteriecellevægssaccharid, fortrinsvis et bakterieydermembranprotein fra Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Neisseria gonorrhoeae eller
25 Escherichia coli eller et bakterieoverfladeprotein, som er M-proteinet fra Streptococcus pyogenes eller et lipopolysaccharid fra en gramnegativ bakterie.

14. Konjugat ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at virusantigenet er F- eller G-proteinet fra respiratorisk syncytialt virus, fortrinsvis peptidet 283-315 i protein F fra respiratorisk syncytialt virus.
35

15. Immunogent konjugat, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter et antigen bundet til et oligopeptid, som har en aminosyresekvens udvalgt fra den gruppe, som består af Q V V H N S Y N R P A Y S P G, N L F Q V V H N S Y N R-
 5 P A Y S P G, A Y N F V E (eller G) S I I N L F Q V V H N-
 S Y N R P A Y S P G, I L P G I G S V M G I A D G A V H H-
 N T E E I V A Q S I A, V S A S H L E Q Y G T N E Y S I I-
 S S M og D K F N A Y L A N K W V F I T I T N D R .

16. Immunogent konjugat ifølge krav 15, k e n d e-
 10 t e g n e t ved, at antigenet er bundet til oligopeptidet gennem en lysin- eller cysteinrest koblet til en terminus i oligopeptidet, hvorhos lysin- eller cysteinresten fortrinsvis er koblet til oligopeptidterminus gennem en glycinrest.

17. Vaccine, k e n d e t e g n e t ved, at den omfat-
 15 ter et immunogent konjugat omfattende mindst ét antigen bundet til et oligopeptid, som svarer til mindst én T-celle-epitop af et bakterietoxin, -CRM eller -toxoid i en farmaceutisk acceptabel grundmasse og eventuelt hjælpestof.

18. Vaccine ifølge krav 17, k e n d e t e g n e t
 20 ved, at bakterietoxinet, -CRM'et eller -toxoidet fortrinsvis er CRM₁₉₇ eller tetanustoxin.

19. Vaccine ifølge krav 17, k e n d e t e g n e t
 ved, at epitopen har aminosyresekvensen i CRM₁₉₇ peptid 369-383, peptid 961-980 i tetanustoxin, peptid 1021-1040 i
 25 tetanustoxin og antigenfragment, -homolog eller -analog til disse.

20. Vaccine, k e n d e t e g n e t ved, at den omfat-
 ter et immunogent konjugat omfattende et saccharidantigen bundet til et oligopeptid, som svarer til mindst én T-celle-
 30 epitop af et bakterietoxin, -CRM eller -toxoid, i en farmaceutisk acceptabel grundmasse og eventuelt hjælpestof, hvorhos saccharidantigenet fortrinsvis er polyribosylribitol-phosphat fra Haemophilus influenzae.

21. Immunogent konjugat, k e n d e t e g n e t ved,
 35 at det i det væsentlige består af et oligopeptid ifølge krav 1 konjugeret til en B-celleepitop fra et andet molekyle.

ANALYSE AF CRM-PROTEIN FOR
AMFIPATISKE SPIRALFORMEDE REGIONER.

GADDVYDSSKSEFYHENS SYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDD
 ***11111111111111110001111000101111111001000000000

DWKEFYSTDNKYDAAGYSYDNENPLSGKAGGYVKYTYPGLTkVLAkV
 111010001101001111100111110001110010011111100000

DNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGS
 001011110000000111111101111111111111111000000110

SSVEYINNVEQAKALSYELEINFETRGRGQDAMYEYHAQACAGNRVR
 00101111110110000000000000000111111111111110111

RSYGSSLSCINLDVDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSSESPNKTYSE
 111100100000001111100000000110000001111111111111

EKAQYLEEFBQTALEHPELSEKTYTGTPVFAGANYAAVAVNYAQV
0111011111111111100000010010011111010111110010111

IDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVHGIADGAYHRNTEEIYAQSIALS
 0100111111001000011111111111111111111111111111100

SLMYAQAIPLYGELYDIGFAAYNEVⓈIINLFQVYHNSYNRPAYSPGH
 000011111111110000001111111111101111111111110100

KTQPFLLHDGYAVSVNTYEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGY
0111111111011101111111111000001110000000000000001

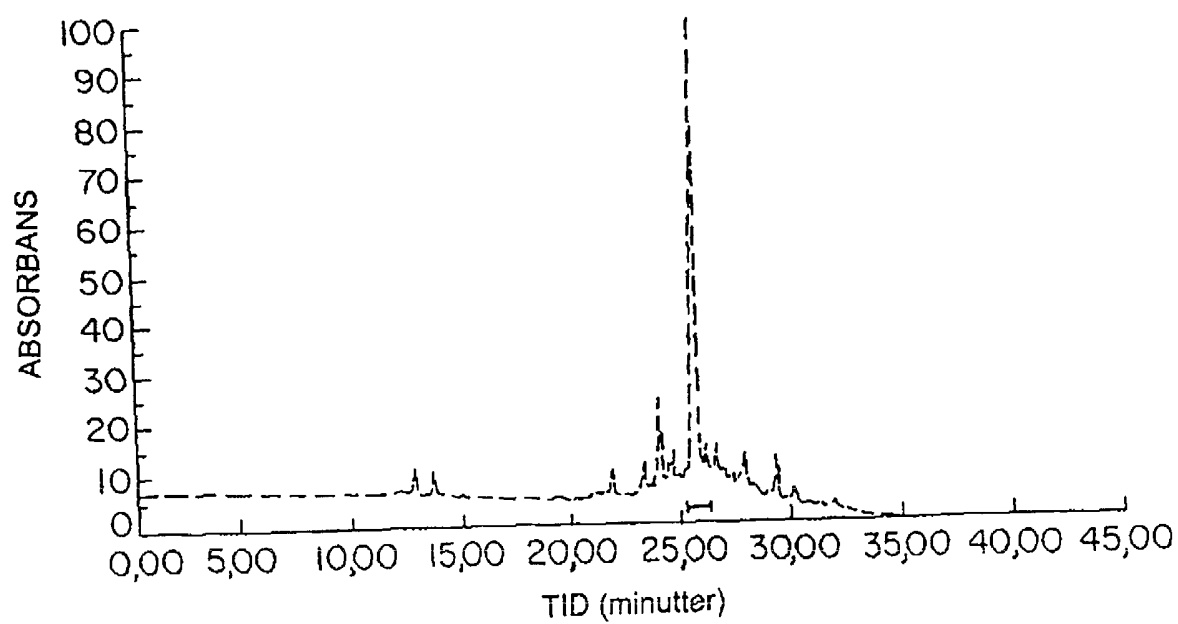
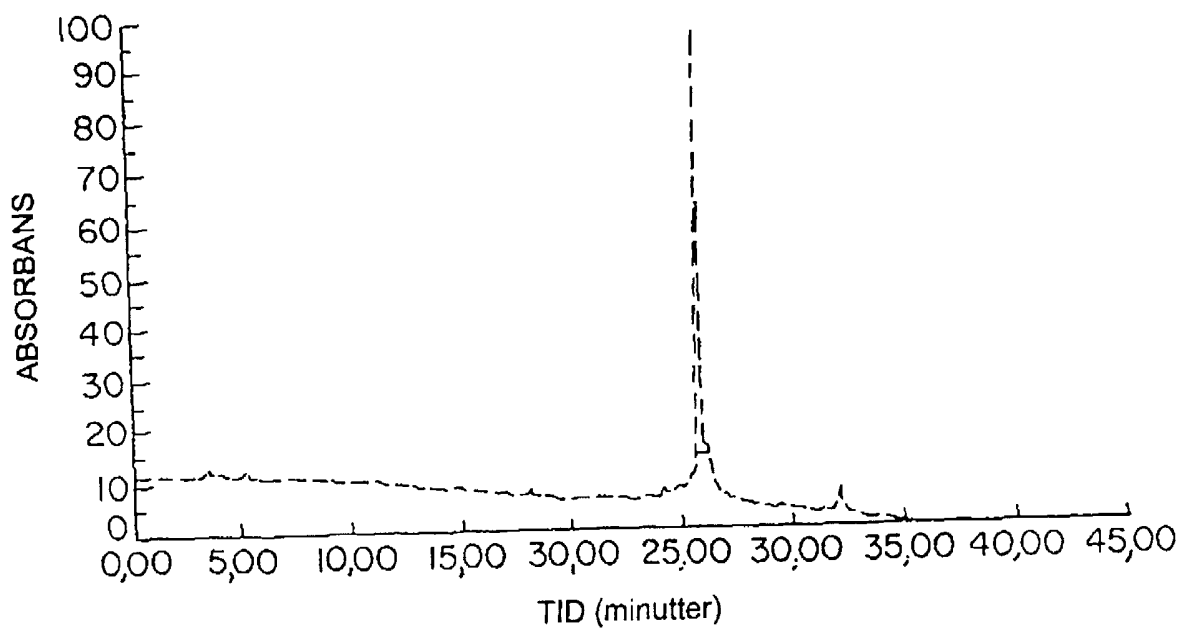
LLPTIPGKLDVYNKSKTHISYNGRKIRMRCAIDGDVTFCRPKSPVYVG
 11010000000000000000000000000000000001000000110000001

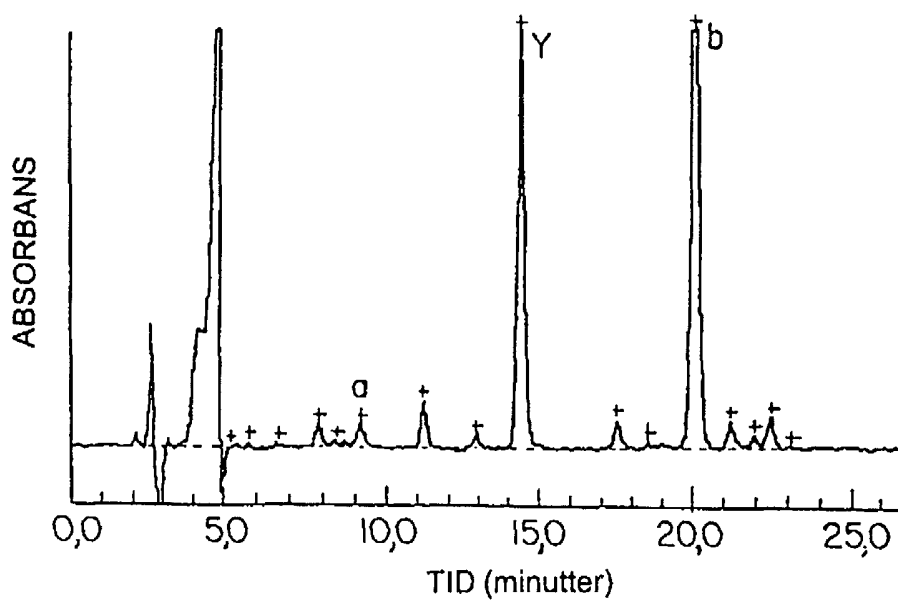
NGYHANLBVAFHRSSEKIHSEISSDSIGVLYQKTYDHTKYNSKLS
 110000000011111101000001111011101111111000000000

LEFEIKS
 0000***

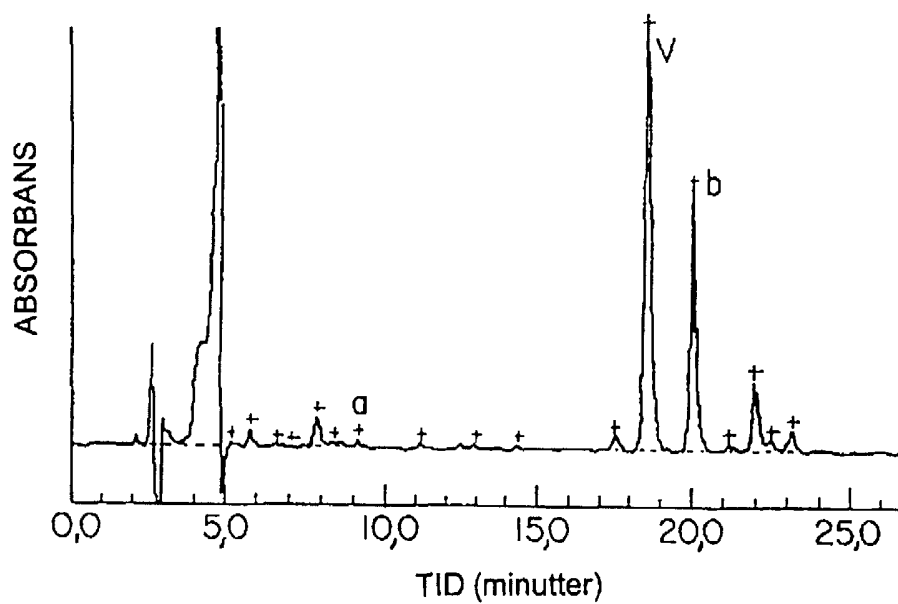
* ANALYSEN BLEV OPRINDELIG GENNEMFØRT MED ET G I
 POSITIONEN BETEGNET Ⓢ : ET E I DENNE POSITION ÆNDRER
 IKKE ANALYSEN.

Fig. 1

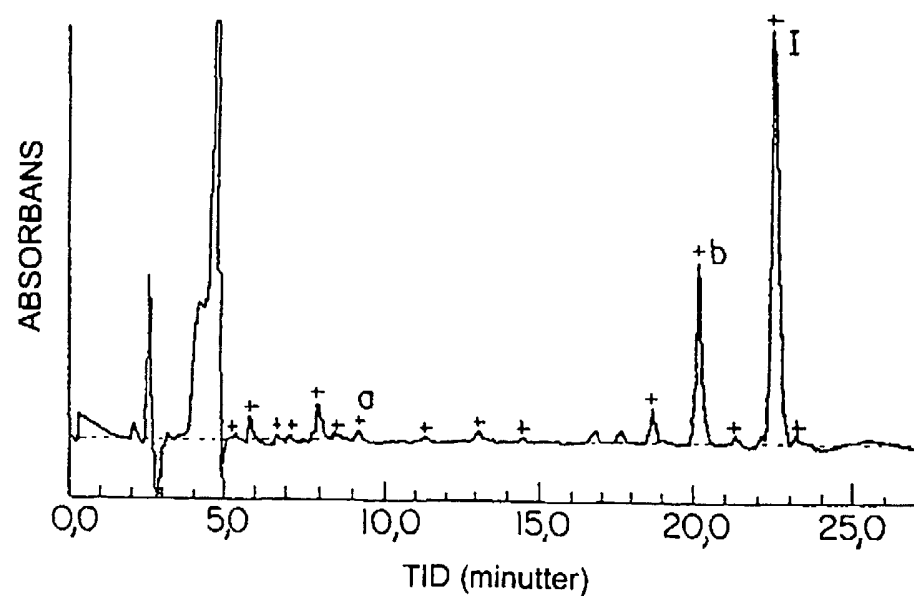
*Fig. 2a**Fig. 2b*

*Fig. 3a*

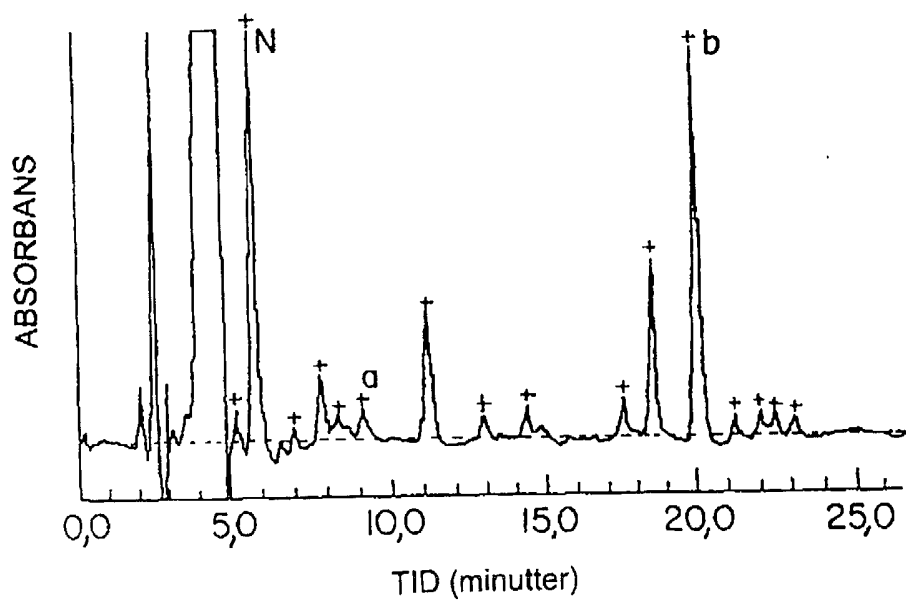
CYCLUS 2

*Fig. 3b*

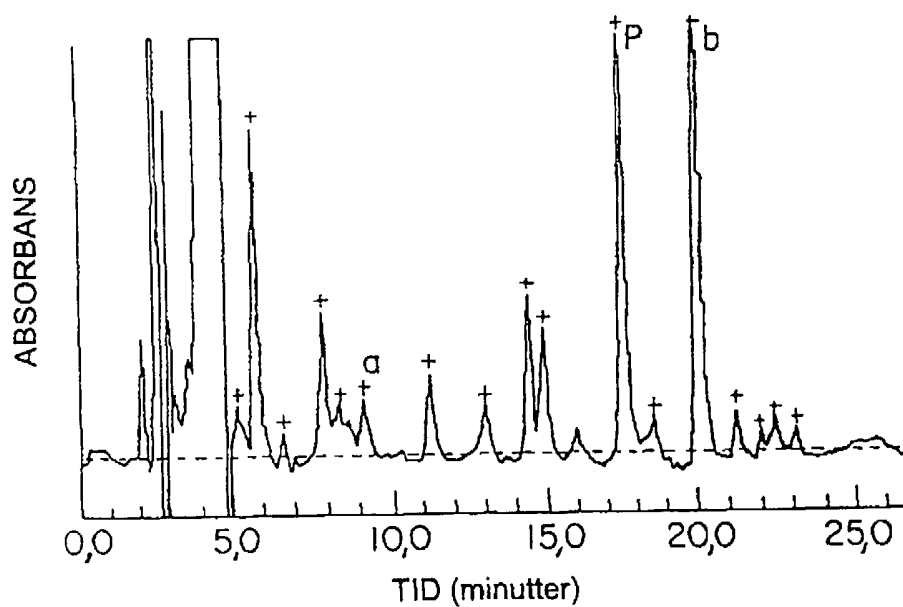
CYCLUS 5

*Fig. 3c*

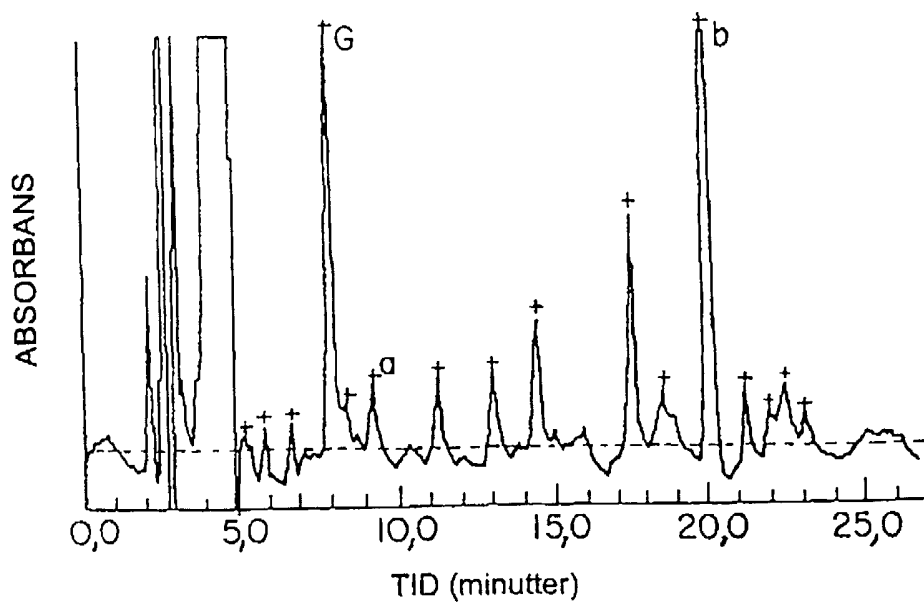
CYCLUS 9

*Fig. 3d*

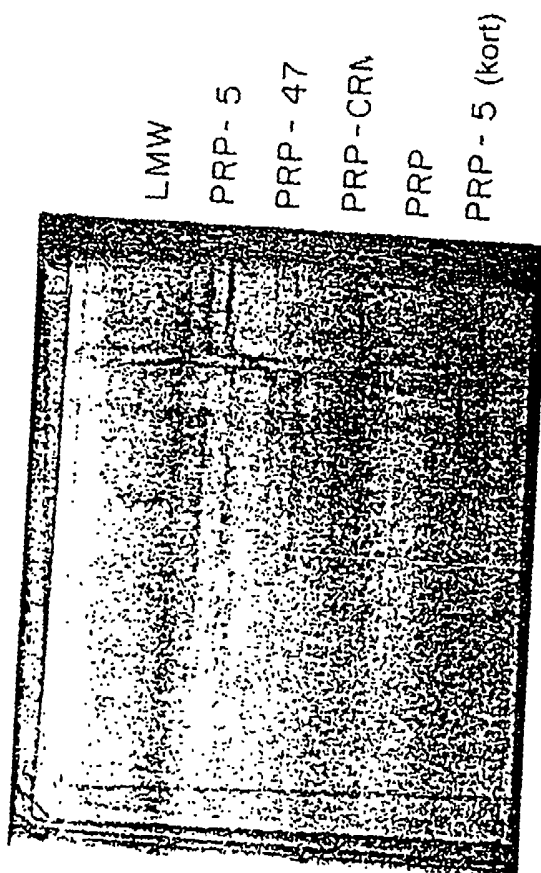
CYCLUS 17

*Fig. 3e*

CYCLUS 22

*Fig. 3f*

CYCLUS 28



LMW

PRP - 5

PRP - 47

PRP - CRN

PRP

PRP - 5 (kort)

Fig. 4

VIRKNINGER AF EKSISTERENDE IMMUNITET MOD BÆRESTOF.

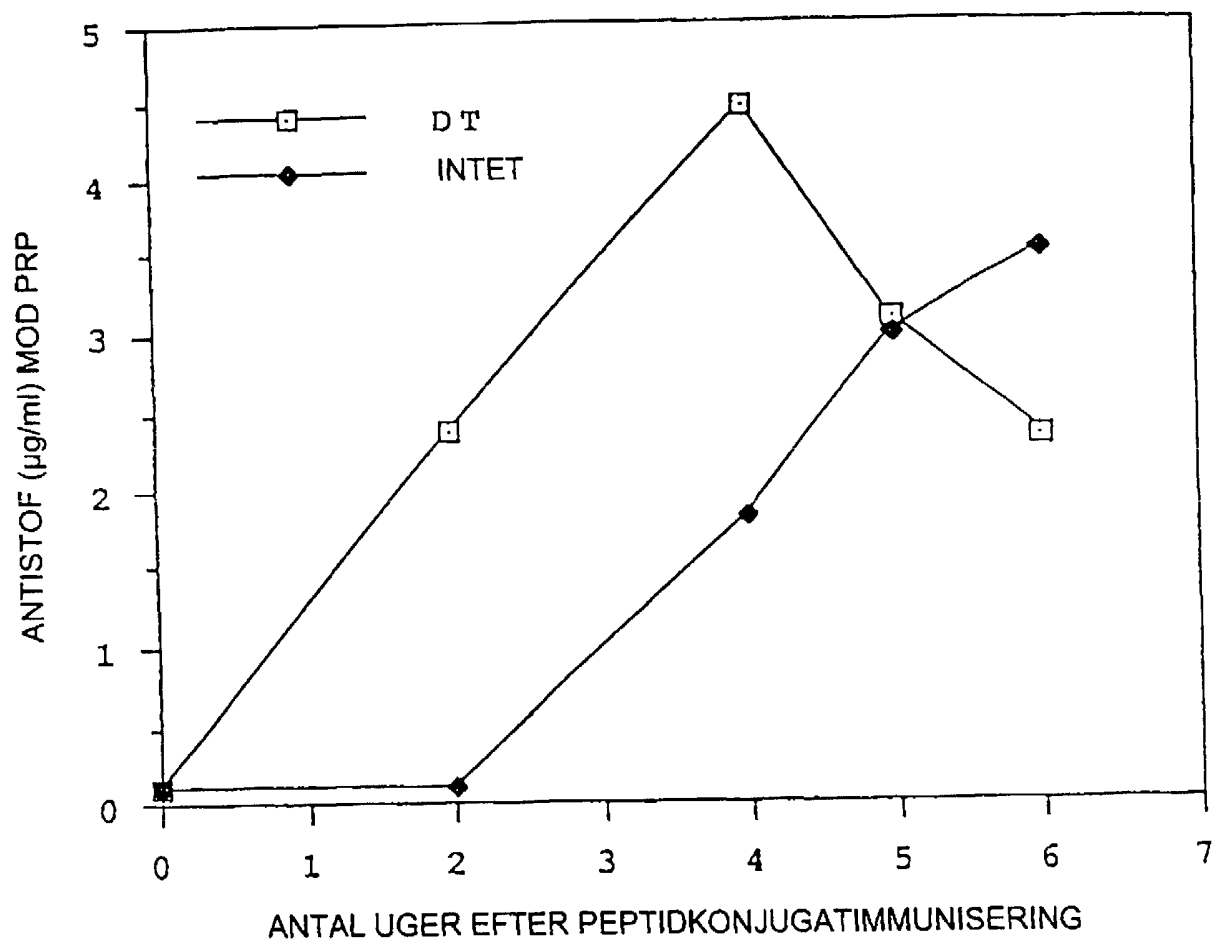


Fig. 5

ANTISTOFREAKTION MOD RSV F-PROTEIN.

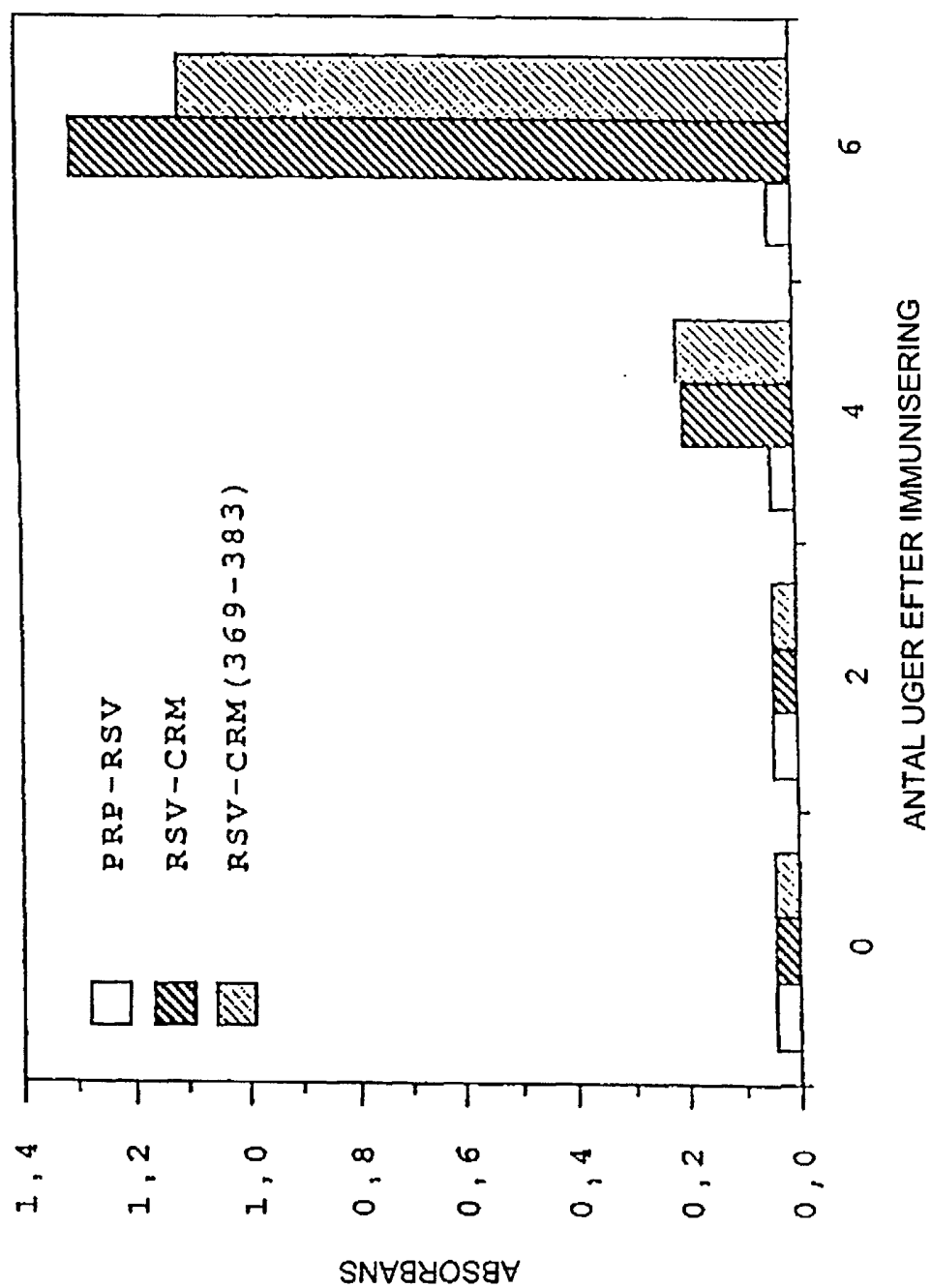


Fig. 6