



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) UTLEGNINGSSKRIFT (11) Nr. 166465

(51) Int. Cl.⁸ G 01 N 33/53, 33/68

(83)

(21) Patentsøknad nr. 861104

(22) Inngivelsesdag 20.03.86

(24) Løpedag 23.07.85

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver COSELCO MIMOTOPES PTY. LTD.,
Cnr. Duerdin and Martin Streets,
Clifton 3168, Vic, AU

(86) Internasjonal søknad nr. PCT/AU85/00165

(86) Internasjonal inngivelsesdag 23.07.85

(85) Videreforingsdag 20.03.86

(41) Alment tilgjengelig fra 16.05.86

(44) Utlegningsdag 15.04.91

(72) Oppfinner HENDRIK MARIO GEYSEN, Knoxfield,
Vic, AU

(74) Fullmektig J.K. Thorsens Patentbureau A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 24.07.84, AU, 6188/84.

(54) Oppfinnelsens benevnelse FREMGANGSMÅTE FOR BESTEMMELSE AV
SEKVENSEN AV MONOMERER.

(57) Sammendrag Fremgangsmåte for påvisning eller bestemmelse av sekvensen av monomerer som er en topologisk ekvivalent av epitopen som er komplementær til en spesiell paratop og et antistoff av interesse, og som omfatter følgende trinn: 1) syntetisering av et antall katamerpreparater, hvor hvert av katamerpreparatene består av et antall katamerer hvor sammensetningen ved en eller flere angitte stillinger på hver katamer er kjent, og sammensetningen av de resterende stillinger er tilfeldig sammensatt av elementer fra en definert gruppe av monomerer, og antallet katamerpreparater omfatter preparater hvor sammensetningen ved de angitte stillingene varieres systematisk for å inneholde elementer fra en definert gruppe monomerer; 2) hvert av antallet katamerpreparater bringes i kontakt med det aktuelle antistoff; og 3) påvisning eller bestemmelse av nærværet eller fraværet av bindingen mellom hvert av antallet katamerpreparater og det gitte antistoffet for å påvise en partiell sekvens av mimotopene for paratopen av det gitte antistoff.

(56) Anførte publikasjoner Int. (WO) patentsøknad, publ. nr. 84/02983, 84/03564,
Scientific American, feb. 1983, 48-56,
Australisk (AU) patent nr. 25428/84.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for påvisning eller bestemmelse av monomerer som er en konformasjonsmessig ekvivalent av en epitop som er komplementær til en spesiell paratop av et antistoff av interesse.

Disse og ytterligere trekk ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen fremgår av patentkravene.

Betegnelsene som er oppført i det etterfølgende og som anvendes heri har de følgende betydninger:

- Epitop:** Den spesifikke overflaten av et antigenmolekyl som er beskrevet ved området som virker sammen med et antistoffmolekyl.
- Katamer:** Et polymermolekyl som har en nøyaktig definert sekvens og som er dannet ved kondensasjon av et nøyaktig antall små molekyler. Det skal bemerkes at denne betegnelse omfatter molekyler hvor forskjellige typer reaksjoner anvendes for å knytte sammen de små molekyler. Et tall foran ordet "katamer" indikerer at katameren er dannet ved kondensasjon av det indikerte antall små molekyler, for eksempel betyr 8-katamer at katameren utgjøres av åtte små molekyler. Eksempler på katamerer omfatter ethvert gitt peptid og ethvert gitt oligo-sakkarid.
- Monomer:** Et element fra gruppen av små molekyler som kan knyttes sammen til å danne en katamer. Gruppen av monomerer omfatter, men er ikke begrenset til, for eksempel, gruppen av vanlige L-aminosyrer, gruppen av D-aminosyrer, gruppen av syntetiske aminosyrer, gruppen av nukleotider og gruppen av pentoser og heksoser.
- Peptid:** En katamer hvori de små molekylerne er alfa-aminosyrer som er knyttet sammen gjennom peptidbindinger. Aminosyrene kan være L-optiske isomerer eller D-optiske isomerer.

166465

2

Mimotop: Katamer som i minst en av sine konformasjoner har et overflateområde med ekvivalent molekylær topologi med epitopen som den er en etterligning av.

Komplementær: Viser til at de reagerende overflater av en antistoff-paratop passer sammen med dens spesielle epitop. Disse overflater må passe sammen ved binding av en antistoff-paratop med dens epitop. Dermed kan paratopen og dens epitop beskrives som komplementære, og videre er kontaktflatens karakteristika komplementære til hverandre.

Paratop: Bindingsstedet på et antistoff som er komplementært til en spesiell epitop.

Det er allerede kjent at:

1. Et antigen er et makromolekyl som et protein eller polysakkarid som vanligvis, men ikke nødvendigvis, er fremmed overfor et menneske eller dyr og som ved innføring i menneske- eller dyrekroppen stimulerer en enten humoral eller cellulær immunrespons, eller begge;
2. det spesifikke området på antigenet hvortil antistoffene bindes er kjent som epitopen;
3. det kan være flere enn en epitop på et antigenmolekyl;
4. kroppens totale humorale respons overfor et antigen er dannelse av antistoffer mot de ulike epitoper på antigenet, idet hvert av de individuelle antistoffer er et monoklonalt antistoff og pr. definisjon fremstilt fra en cellegruppe som stammer fra formering og differensiering av en eneste B-stamcelle;
5. paratopen av et antistoffmolekyl er definert som molekyl-overflaten av antistoffets bindingssted som er kontaktflaten mellom epitopen og antistoffet;
6. mer enn et antistoff kan dannes mot en gitt epitop på antigenet som varierer i deres paratoper, idet hver paratop kan karakteriseres ved hjelp av sin spesifisitet overfor den komplementære epitop; og

7. antistoffer dannet overfor antigener kan videre karakteriseres ved at noen kan nøytralisere direkte ved binding med antigenet, andre kan danne aggregater som makrofagsystemet kan ta hånd om og ytterligere andre utvikler ingen målbare biologiske effekter.

Formålet med den foreliggende oppfinnelse er en fremgangsmåte for å påvise eller bestemme en eller flere korte sekvenser av monomerer som er en konformasjonsmessig ekvivalent av en epitop på en antigen slik at disse sekvenser kan kombineres med det samme antistoff som epitopen. Disse katamerer vil være mimotopene av epitopen.

Denne informasjon er uvurderlig ved utforming av syntetiske katamervaksiner mot sykdommer og ved utforming av svært spesifikke diagnostiske og terapeutiske midler.

Den mest anvendte gruppen av små molekyler som kan knyttes sammen til å danne en katamer er gruppen av alfa-aminosyrer. Andre molekyler som er i overensstemmelse med den valgte kjemi kan imidlertid også anvendes. For eksempel, kan beta-aminosyrer med fordel anvendes for å tilføye en ekstra C-bindingsavstand på nøyaktig kontrollerte steder i katameren.

I overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelse har man tilveiebragt en fremgangsmåte for påvisning eller bestemmelse av sekvensen av monomerer som er en konformasjonsmessig ekvivalent av en epitop som er komplementær til en spesiell paratop av et antistoff av interesse, idet fremgangsmåten omfatter følgende trinn:

1. Syntetisering av et flertall katamerpreparater, hvor hvert av de ovennevnte katamerpreparater består av et flertall katamerer som utgjøres av en definert gruppe monomerer hvori (i) sammensetningen av to eller flere designerte stillinger i hver katamer er kjent og er konstant for hver katamer i katamerpreparatet, og (ii) sammensetningen av hver av de resterende stillinger er tilfeldig sammensatt av elementer av nevnte

166465

4

definerte gruppe av monomerer, og nevnte flertall katamerpreparater omfatter preparater hvori sammensetningen i de designerte stillinger varieres systematisk til å inneholde elementer fra nevnte definerte gruppe monomerer;

2. hvert av ovennevnte flertall katamerpreparater bringes i kontakt med antistoffet av interesse, og
3. nærvær eller fravær av binding mellom hvert av nevnte flertall katamerpreparater og nevnte gitte antistoff på vises, og
4. en partiell sekvens av monomerer for den konformasjonsmessige ekvivalent av en epitop som er komplementær til den spesielle paratop av nevnte antistoff fra den kjente sammensetning i to eller flere designerte stillinger i hver av nevnte flertall katamerpreparater som binder til nevnte antistoff bestemmes, og
5. et ytterligere flertall katamerpreparater syntetiseres og omfatter sammensetningen av den partielle sekvens som bestemt i nevnte trinn 4 som initiale designerte stillinger, idet hvert av ovennevnte ytterligere flertall av katamerpreparater har minst en ytterligere stilling i hver katamer som en designert stilling, og
6. trinnene 2, 3 og 4 gjentas med hensyn til ovennevnte ytterligere flertall katamerpreparater.

Fremgangsmåten som angitt i trinnene 5 og 6 kan gjentas inntil alle stillinger i hvert katamerpreparat er designert og alle de utledede mimotoper kan deretter syntetiseres for å bestemme hvilke som er de bedre mimotoper for epitopen tilsvarende til dette gitte antistoff, ut fra deres relative evne til å reagere med det aktuelle antistoff.

Fremgangsmåten i overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelse baserer seg på det faktum at et gitt antistoff vil omsettes spesifikt med en katamer som er mimotopen av den epitop som antistoffet er rettet mot. Videre beror den på kjennskapen om at moderne immunologiske teknikker tillater påvisning av reaksjoner mellom et antistoff og dets epitop

når begge er tilstede i svært små mengder og det er påvist binding når et antistoff og dets epitop er tilstede i mengder på omkring 1 pmol. Dersom et antistoff bringes i kontakt med en blanding av katamerer som inneholder en mimotop til dets epitop vil antistoffet reagere med blandingen idet det bindes spesifikt til mimotopen. Identiteten til mimotopene er utledet fra den kjente monomersammensetningen i de designerte stillinger av reagerende katamerpreparater. En fullstendig mimotop vil kunne forventes å være en eller annen kombinasjon av de elementer som reagerer og som er utledet på denne måte.

Det fremkommer klart at ifølge fremgangsmåten for den foreliggende oppfinnelse kreves det ingen forutgående informasjon om antigenets natur og i særdeleshet kreves det ingen forkunnskap angående sekvensen av monomerene som utgjør antigenet. Det er faktisk ikke nødvendig å kjenne til opphavet eller identiteten av antigenet som antistoffet er rettet mot. Videre gjøres det ingen antagelser angående epitopen som stimulerer dannelse av det spesielle antistoff. Fremgangsmåte i henhold til den foreliggende oppfinnelse vil identifisere mimotoper av ikke-kontinuerlige så vel som kontinuerlige epitoper. På grunn av fremgangsmåtens beskaffenhet vil den gjelde for ethvert antigen som helt eller delvis ikke er et protein og hvis epitoper kan etterlignes ved en passende katamer. Mimotoper kan eventuelt dannes fra elementer fra den samme gruppen av monomerer som utgjør antigenet.

Fremgangsmåten i henhold til den foreliggende oppfinnelse utføres ved screening av et flertall syntetiserte katamerpreparater mot et aktuelt antistoff. Ideelt sett vil antistoffet være et monoklonalt antistoff som kan fremstilles ved hvilken som helst av de vanlige anvendte metoder. Polyklonalt antiserum fra mennesker eller dyr kan anvendes dersom monoklonalt antistoff ikke er tilgjengelig, men analyse av de endelige data kan imidlertid være vanskelig fordi de reaksjoner som observeres kan være fra mer enn ett monoklonalt antistoff. Når det anvendes polyklonalt antiserum kan det være nødvendig å redusere antistoff-uensartetheten ved anvendelse av

166465

6

teknikker som er vel kjent for den fagkyndige på området, for eksempel isoelektrisk fokusering, HPLC-basert kromatografi eller affinitetskromatografi.

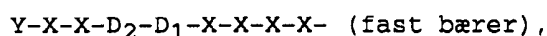
Gjeldende indikasjoner foreslår at en epitop kan etterlignes ved en katamer med en lengde på foretrukket omtrent åtte monomerer når monomerene kommer fra gruppen av alfa-aminosyrer. 8-katamerens evne til å være mimotopen av epitopen er ikke kritisk avhengig av at hver stilling eller sted har en spesiell monomer.

Det flertall katamerpreparater som skal syntetiseres kan fremstilles ved hjelp av hvilken som helst av de kjente metoder for katamersyntese. Den foretrukne metode, hvor monomerene er aminosyrer, omfatter anvendelse av en teknikk med fast fase som beskrevet i australsk patentansøkning nr. 25429/84, hvor hver blanding av katamerer er syntetisert på en polyetylenbærer.

I det etterfølgende skal en utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse beskrives mere detaljert.

A. Syntese av et flertall katamerpreparater.

Som nevnt i det foregående, syntetiseres katamerene foretrukket på en fast bærer og har den generelle formel:



hvor X som kan være like eller forskjellige er et element av en gruppe av monomerer. Hvert katamerpreparat inkluderer foretrukket katamerer hvor hver av X-stillingene er et element av gruppen av monomerer slik at hvert element er tilstede i katamerpreparatet i omtrent ekvivalente molare mengder. I den generelle formel er Y en endegruppe av en katamer og kan, men er ikke begrenset til, for eksempel være et hydrogenatom eller en acetylgruppe. D_1 og D_2 er designerte stillinger av monomerer som er kjente og konstante i hvert syntetisert

katamerpreparat, men som endres systematisk fra det ene katamerpreparat til det andre. Det skal bemerkes at den samme gruppen av monomerer ikke nødvendigvis må anvendes i hver designerte stilling. Når katamerene syntetiseres fra aminosyrer kan katamerene festes til den faste bærer gjennom deres -COOH-endeogrupper, eller gjennom deres aminoendeogrupper.

Dersom i er antall enheter i gruppen av monomerer som skal kobles sammen i D_1 -stillingen og j er antall enheter i gruppen av monomerer som skal kobles sammen i D_2 -stillingen, kan det totalt syntetiseres et antall $i \cdot j$ forskjellige katamerpreparater.

I den foreliggende utførelsesform fremstilles bærer kjedene slik at monomerene kan kobles til dem. Kjedene utsettes deretter for reaksjonsblandingen inneholdende hvert element av gruppen av monomerer under behandling. Dette fører til at monomerer kobles i den første X-stilling. Denne prosedyre gjentas tre ganger for å gi katameren Z-X-X-X-X (fast bærer) hvor Z er den beskyttende gruppen som passer til den gruppen av monomerer som er under behandling. Eksempler på Z hvor monomerene er aminosyrer inkluderer BOC- og Fmoc-grupper. Opp til dette punkt er alle kjedene behandlet på samme måte.

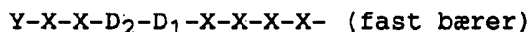
Ved sammenkobling i D_1 -stillingen, vil hver kjede bli behandlet med en reaksjonsblanding som inneholder bare en eneste monomer slik som en beskyttet aminosyre e.l. I D_1 -stillingen vil hver av i -monomerene koples til j -kjeder. For kopling i D_2 -stillingen behandles hver kjede igjen med en reaksjonsblanding som bare inneholder en eneste monomer, slik som en beskyttet aminosyre e.l. Hver av j -kjedene som har en spesiell monomer i D_1 -stillingen vil ha en forskjellig monomer festet i D_2 -stillingen. På denne måte vil enhver kombinasjon av elementene i gruppen(e) av monomerer bli funnet i $i \cdot j$ -kjedene. Kopling av monomerene i de gjenværende X-stillingene er identisk med koplingen i X-stillingene som er nærmere den faste bærer.

166465

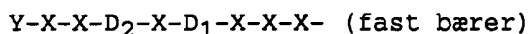
8

Etter syntetisering av et flertall katamerpreparater fjernes enhver sidekjedebeskyttende gruppe fra katamerpreparatene ved anvendelse av vanlige teknikker og katamerene vaskes.

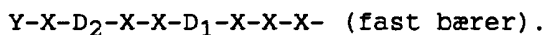
I en foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten i henhold til den foreliggende oppfinnelse syntetiseres mere enn en gruppe av et flertall katamerpreparater, noe som understøttes ved analyse av data. Såvel som syntetisering av katamerer med den generelle formel:



som beskrevet over, kan ytterligere flertall av katamerer fremstilles med generell formel:



og



Det skal bemerkes at andre generelle formler kan velges for syntetisering av andre grupper av katamerpreparater.

B. Utprøving av katamerpreparatene.

Det flertall katamerpreparater som er fremstilt i A som beskrevet over, bringes deretter i kontakt med det spesielle antistoff av interesse. Reaksjonen mellom antistoff og elementene i katamerpreparatene kan således påvises ved hjelp av hvilken som helst av de vanlig anvendte metodene, for eksempel Radioimmunoassay (RIA). Den foretrukne metode for påvisning av nærvær av en antistoff-mimotop-binding er imidlertid den velkjente enzytbundne immunoabsorberende test (ELISA).

På slutten av hver test kan antistoffer fjernes fra katamerpreparatene ved for eksempel vasking med en løsning av 8M

urea, 0,1 % 2-merkaptoetanol og 0,1 % natrium-dodecylsulfat etterfulgt av flere vaskinger med en fosfatbufret saltopp-løsning. På denne måte kan flertallet katamerpreparater anvendes for utprøving med en rekke andre antistoffer.

C. Analyse av data.

Ved utprøving av katamerpreparatene med et antistoff vil man finne at visse kjeder vil vise binding med antistoffet. Katamerpreparatet koplet til en slik reagerende kjede inneholder en definert kombinasjon av enheter av den eller de grupper av monomerer i stillingene D_1 og D_2 . Denne kombinasjon av monomerer vil sannsynligvis utgjøre en del av katameren som utgjør en mimotop for epitopen som er komplementær til antistoffet. Videre analyse kan utføres på en rekke måter som omfatter at:

1. Man kombinerer og permuterer disse reagerende monomerer for å danne en fortegnelse over katamerer som kan omfatte en eller flere mimotoper for epitopen, hvor hver katamer i denne fortegnelse kan anses å være en mulig mimotop;
2. man tar ut de mest passende kandidater fra denne fortegnelse av reagerende kombinasjoner av monomerer (men ikke nødvendigvis dem som gir den høyeste antistoffbindingsaktivitet), og videre syntetiserer grupper av katamerpreparater hvori den kjente reagerende kombinasjon av monomerer holdes konstant og monomerene i andre stillinger i katamerene varieres systematisk. I det ovennevnte eksempel vil en passende gruppe av slike katamerpreparater omfatte katamerer med formelen:

Y-X- D_3 - D_2 - D_1 -X-X-X-X- (fast bærer)

og

Y-X-X- D_2 - D_1 - D_4 -X-X-X- (fast bærer),

hvor D_1 og D_2 betegner den reagerende kombinasjon av monomerer og D_3 og D_4 er andre designerte stillinger hvor

166465

10

hvert av elementene av gruppen av monomerer varieres systematisk; og

3. man kombinerer resultatene fra mere enn en av gruppene av flertallet katamerpreparater og oversetter for å danne en eneste sekvens av monomerer eller muligens et svært lite antall slike sekvenser som kan etterligne epitopen av interesse fordi, ved anvendelse av den ovennevnte utførelsesform, er de reagerende kombinasjoner av monomerer når de er i nabostilling til hverandre, de reagerende kombinasjoner av monomerer når de er adskilt fra hverandre ved en stilling, og de reagerende kombinasjoner av monomerer når de er adskilt fra hverandre ved to stillinger, alle kjent. Disse data kan alle oversettes på en enkel måte til å gi sekvensen av mimotopen. Dette vil være meget fordelaktig når antistoffet som anvendes for å teste flertallet av katamerpreparater er et monoklonalt antistoff.

D. Syntese av utvalgte mimotoper.

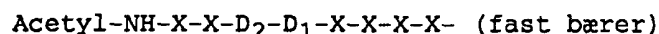
De utvalgte mimotoper kan deretter syntetiseres ved anvendelse av lignende metoder som dem som er beskrevet i australsk patentansøkning nr. 25429/84. Etter at de utvalgte katamerene er syntetisert, reageres de med det aktuelle antistoff. Det er da enkelt å velge ut den katameren som bindes sterkest til antistoffet. Som en siste undersøkelse på at denne katamer er den beste mimotop av epitopen kan katamersekvensen anvendes som modersekvensen i en utskiftning som beskrevet i australsk patentansøkning nr. 25428/84.

I eksemplene 1, 2 og 3 som er angitt under, er den definerte gruppen av monomerer gruppen av vanlige L-alfa-aminosyrer. Denne gruppen av monomerer er anvendt både for de designerte stillinger og de tilfeldige stillinger (stillingene D₁, D₂ og X som anvendt i den ovennevnte generelle formel).

I disse eksemplene er endegruppen i katamerene (Y-gruppen) acetyldelen.

Eksempel 1.

Et flertall 8-katamerpreparater ble syntetisert med den generelle formel:



hvor X er et element fra gruppen av de 20 vanlige L-alfaamino-syrer, slik at hvert element av gruppen er tilstede i X-stillingen i katamerpreparatene i omtrent ekvimolare mengder, hvor begge de designerte stillingene D₁ og D₂ er elementer av den samme gruppen av monomerer og hvor -NH- angir den terminale amingruppen av katameren. 8-katamerpreparatene ble syntetisert på en fast polymerkjede som beskrevet i australsk patentansøkning nr. 25429/84, ved anvendelse av BOC-gruppen som en beskyttende gruppe for L-alfa-aminosyrene under syntesen.

Elementer av gruppen av vanlige L-aminosyrer ble koplet i X-stillingene på følgende måte:

1. En blanding av aminosyrer ble oppløst i 102 ml dimetylformamid (DMF). Blandingen besto av:

BOC-L-alanin	32 mg
BOC-metoksybenzyl-L-cystein	100 mg
BOC-benzyl-L-asparaginsyre	90 mg
BOC-benzyl-L-glutaminsyre	96 mg
BOC-L-fenylalanin	61 mg
BOC-L-glysin	27 mg
BOC-tosyl-L-histidin	142 mg
BOC-L-isoleucin.1/2 H ₂ O	51 mg
BOC-karbobenzoksy-L-lysin	124 mg
BOC-L-leucin.H ₂ O	55 mg
BOC-L-metionin	54 mg
BOC-L-asparagin	47 mg
BOC-L-prolin	42 mg
BOC-L-glutamin	53 mg
BOC-tosyl-L-arginin.H ₂ O	167 mg

166465

12

BOC-benzyl-L-serin	76 mg
BOC-benzyl-L-treonin	83 mg
BOC-L-valin	42 mg
BOC-L-tryptofan	78 mg
BOC-benzyl-L-tyrosin	116 mg

2. En løsning av 1310 mg 1-hydroksybenzotriazol (HOBt) ble fremstilt i 34 ml DMF.
3. En løsning av 1150 mg N,N'-dicykloheksylkarbodiimid (DCC) ble fremstilt i 34 ml DMF.
4. Før bruk ble løsningen av HOBt tilsatt til løsningen av aminosyrer og blandet. Deretter ble løsningen av DCC tilsatt og blandet. Katamer- eller bindingsmolekylet som allerede var festet til den faste bærer ble deretter reagert med den endelige blanding.

Individuelle L-aminosyrer ble koplet i D₁- og D₂-stillingene ved metoden som beskrevet i australsk patentansøkning nr. 25429/84. Dette resulterte i syntesen av 400 katamerpreparater omfattende alle mulige kombinasjoner av de 20 vanlige aminosyrene i D₁- og D₂-stillingene.

Flertallet 8-katamerpreparater ble testet mot et monoklonalt antistoff ved hjelp av ELISA. Dette monoklonale antistoff ble fremstilt mot munn-og-klovsykevirus (FMDV), undertype A₁₀, ved anvendelse av teknikker som er vel kjent for den fagkyndige på området. Ved utførelse av ELISA ble peptider som var festet til en bærer inkubert i en forbehandlet løsning av 1 % ovalbumin/1 % bovint serumalbumin/0,1 % Tween 20 i fosfat-bufret saltoppløsning (PBS) i en time ved 25°C for å forhindre ikke-spesifikk absorpsjon av antistoff. Inkubering over natten ved 4°C i en passende løsning av monoklonalt antistoff i en forbehandlet løsning ble etterfulgt av tre vaskinger i 0,05 % Tween 20/PBS. Reaksjon i en time ved 25°C med anti-mus IgG fra geit konjugert til pepperrot-peroksidase fortynnet i den forhandlede løsning, ble igjen etterfulgt av en omfattende vasking med PBS/Tween for å fjerne overskudd av konjugat. Tilstedeværelsen av antistoff ble påvist ved

reaksjon med en nylaget enzym-substratløsning i 45 min. (40 mg o-fenylendiamin og 18 μ l "120 vol" hydrogenperoksyd i 100 ml fosfat/citratbuffer, pH 5,0), og fargen som fremkom ble bestemt ved 450 nm.

Fig. 1 viser resultatet av utprøvingen av 8-katamerpreparatene med dette antistoff. I fig. 1 representerer hver gruppe på 20 linjer responsen i en ELISA-test i absorpsjonsenheter med hensyn på fargeutviklingen målt ved 450 nm. Hvert element i gruppen på 20 linjer har en vanlig aminosyre i D₁-stillingen som er angitt i en en-bokstavkode like under hver gruppe. Hvert element i en gruppe på 20 linjer representerer en forskjellig aminosyre i D₂-stillingen idet disse er gitt i alfabetisk rekkefølge av deres en-bokstavkode. Resultatene er oppsummert i tabell 1. (I tabell 1, og de etterfølgende eksempler, vil en-bokstavkoden for aminosyrer anvendes.)

TABELL 1. Antistoffbindings-aktiviteter av 8-katamerpreparatblandingene Ac-X-X-D₂-D₁-X-X-X-X-S_S

Peptidblanding	Ekstinksjon E ₄₁₅
Ac-X-X-M-H-X-X-X-X-S _S	0,624
Ac-X-X-M-K-X-X-X-X-S _S	0,582
Ac-X-X-K-K-X-X-X-X-S _S	0,537
Ac-X-X-K-H-X-X-X-X-S _S	0,510
Ac-X-X-Q-H-X-X-X-X-S _S	0,488
Ac-X-X-H-H-X-X-X-X-S _S	0,486
Ac-X-X-Q-N-X-X-X-X-S _S	0,460
Ac-X-X-W-M-X-X-X-X-S _S	0,448
Ac-X-X-K-N-X-X-X-X-S _S	0,431
Ac-X-X-H-K-X-X-X-X-S _S	0,417

Gjennomsnittlig ekstinksjon for de laveste 200 verdier var 0,202 (standard avvik 0,021).

Ac betegner acetylrest.

S_S betegner (fast bærer).

166465

14

Ut fra dette ser man at antistoffet reagerer kraftig med en rekke 8-katamerpreparater. Ordnet etter styrken på reaksjonen, inkluderer disse 8-katamerpreparater hvor de designerte stillingene (-D₂-D₁-) er: -M-H-, -M-K-, -K-K-, -K-H-, -Q-H- og -H-H-.

To ytterligere flertall 8-katamerpreparater ble syntetisert med formlene:

Acetyl-NH-X-D₃-M-K-X-X-X-X- (fast bærer)
og
Acetyl-NH-X-X-M-K-D₄-X-X-X- (fast bærer)

hvor M er en metioninrest, K er en lysinrest og D₃ og D₄ er den nye designerte stilling for disse synteseseriene. Andre betegnelser i formlene er som anvendt tidligere.

Disse 8-katamerpreparatene ble utprøvet mot det monoklonale antistoff overfor FMDV A₁₀. Fig. 2A og 2B viser resultatene fra ELISA ved utprøving med det monoklonale antistoff som anvendes for å oppnå resultatene som er vist i fig. 1. Fig. 2A representerer 8-katamerpreparater med generell formel:

Acetyl-NH-X-D₃-M-K-X-X-X-X- (fast bærer).

Fig. 2B representerer 8-katamerpreparater med generell formel:

Acetyl-NH-X-X-M-K-D₄-X-X-X- (fast bærer).

I begge av figurer er aminosyren i D₃- eller D₄-stillingen gitt under hver linje som representerer absorpsjonen av den utviklede farge målt ved 450 nm. Resultatene er oppsummert i tabell 2. Antistoffbindings-aktiviteter vedrørende 8-katamerpreparatene som inneholder det definerte aminosyrepar M-K er vist for alle de 8-katamerpreparater som ga en verdi større enn 1,1. Verdien som ble funnet for det omvendte par K-M er også vist.

TABELL 2. Relative antistoffbindings-aktiviteter av
8-katamerpreparater inneholdende tre definerte
aminosyrer.

Amino-terminal ekstinksjon		Karboksyl-terminal ekstinksjon	
Sekvens	Aktivitet	Sekvens	Aktivitet
Ac-X-H-M-K-X-X-X-X-S _S	2,54	Ac-X-X-M-K-H-X-X-X-S _S	2,85
Ac-X-W-M-K-X-X-X-X-S _S	2,50	Ac-X-X-M-K-Q-X-X-X-S _S	2,20
Ac-X-Q-M-K-X-X-X-X-S _S	1,69	Ac-X-X-M-K-W-X-X-X-S _S	1,97
Ac-X-N-M-K-X-X-X-X-S _S	1,27	Ac-X-X-M-K-G-X-X-X-S _S	1,41
Ac-X-G-M-K-X-X-X-X-S _S	1,14	Ac-X-X-M-K-N-X-X-X-S _S	1,26
Ac-X-C-M-K-X-X-X-X-S _S	1,11		

Kontrollsekvens M-K 1,00 ($E_{450} = 0,14$)

K-M 0,97

Blindprøve $E_{450} = 0,08$.

Man ser at de 8-katamerpreparater som ga de sterkeste reaksjoner med det monoklonale antistoff hadde følgende sekvenser i de designerte stillinger: -H-M-K-, -W-M-K- og -Q-M-K- i fig. 2A; og -M-K-H-, -M-K-Q- og -M-K-W- i fig. 2B.

Innlemmelse av histidin på den ene eller begge sider av det definerte M-K-paret resulterte i den største antistoffbindingsaktivitet. Histidin innlemmet på den amino-terminale siden var imidlertid ikke noe særlig bedre enn tryptofan, og den definerte sekvens W-M-K-H ble valgt for videre vurdering.

Holdbarheten med hensyn til å fortsette med den definerte sekvens W-M-K-H, som var forutsagt å være optimal ved kombinerings av de individuelle foretrukne forlengelser til paret M-K, ble undersøkt. Katamerpreparater basert på den opprinnelige sekvens av Acetyl-NH-X-W-M-K-H-X-X-X-S_S (fast bærer) ble syntetisert, hvori alle de 19 alternative aminosyrer var substituert i hver av de fire designerte stillinger, en av gangen. Utprøving av denne gruppen av katamerpreparater

166465

16

med hensyn på bindingsaktivitet overfor det monoklonale antistoff (MAB) som undersøkes, viste at Q-M-R-H var den foretrukne sekvens for forlengelse (oppnådd E_{450} var: Ac-X-W-M-K-H-X-X-X-S_S = 0,69, Ac-X-Q-M-K-H-X-X-X-S_S = 1,47, og Ac-X-W-M-R-H-X-X-X-S_S = 1,11, blindprøven var 0,2). Preferanse for glutamin på den amino-terminale enden av den definerte sekvens M-K-H istedet for tryptofan, som var blitt bestemt for paret M-K, viser det innbyrdes avhengighetsforholdet med hensyn på individuelt bestemt optima.

8-katamerpreparater med generell formel:

Acetyl-NH-D₅-Q-M-R-H-X-X-X- (fast bærer) og
Acetyl-NH-X-Q-M-R-H-D₆-X-X- (fast bærer)

ble syntetisert. Preparatene med den høyeste antistoffbindingsaktivitet var dem med D₅ = tryptofan og D₆ = serin, noe som tyder på at W-Q-M-R-H-S er den optimale sekvens. Ingen forbedring av betydning med hensyn til antistoffbindingsaktiviteten ble oppnådd ved at ytterligere aminosyrer ble definert på den ene eller begge ender av denne sekvens. Vurdering av gruppen av peptider omfattende alle de enkeltstående aminosyresubstitusjoner av denne sekvens, syntetisert som heksapeptider, bekreftet at W-Q-M-R-H-S var nær opp til det optimale heksapeptid. Noe økning i antistoffbindingsaktivitet ble påvist når glycin erstattet arginin i peptidet til å gi sekvensen W-Q-M-G-H-S.

For å kunne bekrefte spesifisiteten av antistoffbindingsreaksjonen for den bestemte gruppe av beslektede peptider for testen MAB, ble titeret for testen MAB for en rekke av peptidene sammenlignet med titrene for spermhvalmyoglobin eller hepatitt A (tabell 3). Spesifisiteten av antistoffbindingsreaksjonen er tydelig for testen MAB, antistoffet som anvendes for å bestemme sekvensen av disse peptider.

TABELL 3. Spesifisiteten av test MAb for W-Q-M-G-H-S beslektede peptider.

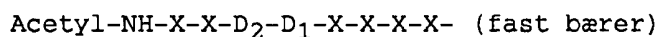
Peptid	Test MAb	Titer	
		Anti-hepatitt A	Anti-myoglobin
Ac-X-X-M-K-X-X-S _S	2.000	< 200	< 200
Ac-X-W-M-K-X-X-S _S	14.000	< 200	1.600
Ac-X-X-M-K-H-X-S _S	17.000	< 200	< 200
Ac-X-W-M-K-H-X-S _S	36.000	< 200	800
Ac-W-Q-M-R-H-S-S _S	100.000	< 200	< 200
Ac-W-Q-M-G-H-S-S _S	120.000	< 200	< 200

Antistofftitrene for hver MAb ble bestemt ved hjelp av ELISA og er i overensstemmelse med den resiproke fortynning av ascitesvæsken som ga en ekstinksjon som var tre ganger større enn blindprøven. Verdiene ble korrigert for ikke-spesifikk absorpsjon som ble bestemt ved at hver fortynning av ascitesvæsken ble omsatt med ikke-beslektede peptidkontroller (Ac-G-D-L-G-S-I-S_S og Ac-G-D-L-Q-V-L-S_S). De monoklonale antistoffene som ble undersøkt var: Test MAb, anti-FMDV, type A₁₀ som beskrevet i teksten (titer overfor hele viruset $1,3 \times 10^6$); anti-hepatitt A, reaksjonssted ukjent (titer overfor hepatitt A virus 10^6); og anti-myoglobin (spermhval), reaksjonssted også ukjent (titer overfor spermhvalmyoglobin 10^6).

Eksempel 2.

Eksempel 2 viser anvendelsen av den foreliggende oppfinnelse ovenfor et polyklonalt antistoff.

Et ytterligere flertall 8-katamerer ble syntetisert med generell formel:



166465

18

som beskrevet i eksempel 1. Denne ble testet mot et antistoff som var blitt fremstilt mot det syntetiske peptid C-G-D-L-G-S-I-A-K. Dette peptid var fremstilt ved anvendelse av vanlig anvendte teknikker for fast-fase peptidsyntese (Merrifield). Peptidet ble koplet til albuskjell-hemocyanin gjennom sulfhydrylgruppen på cysteindelen. Det koplete peptid ble behandlet med Freunds ufullstendige hjelpestoff og injisert intramuskulært i en kanin. Atiserum ble oppnådd ved at man tappet kaninen for blod 40 døgn etter injeksjonen.

Resultatene fra ELISA hvor man utprøvde flertallet av 8-katamerpreparater med antistoffet er gitt i fig. 3 på samme måte som i fig. 1. Man vil se at alle 8-katamerpreparatene som hadde E (glutaminsyre) i D₁-stillingen reagerte betydelig med antistoffet. Andre kombinasjoner med en betydelig reaksjon med antistoffet inkluderer i avtagende rekkefølge: -D-I-, -G-D-, -I-G- og -D-V-.

Som beskrevet i det ovennevnte eksempel 1 ble de ytterligere flertall 8-katamerpreparater syntetisert med formel:

Acetyl-NH-X-D₃-D-I-X-X-X-X- (fast bærer)
og
Acetyl-NH-X-X-D-I-D₄-X-X-X- (fast bærer)

hvor D er asparaginsyre og I er isoleucin. Resultatene av utprøvingen med antistoffet er vist i fig. 4 på samme måte som i fig. 2. Fig. 4A viser 8-katamerpreparater med generell formel:

Acetyl-NH-X-D₃-D-I-X-X-X-X- (fast bærer).

Fig. 4B viser 8-katamerpreparater med generell formel:

Acetyl-NH-X-X-D-I-D₄-X-X-X- (fast bærer).

Fig. 4 viser at 8-katamerpreparater som reagerer med anti-stoffet omfatter følgende sekvenser i de designerte stillinger: -G-D-I-, -A-D-I-, -P-D-I-, -D-I-D-, -D-I-M- og -D-I-T-. Man ser lett, ved å sammenligne fig. 4A med fig. 4B, at stillingen umiddelbart før -D-I-paret gir mye mindre spillerom med hensyn til tillatte aminosyrer enn stillingen umiddelbart etter -D-I-paret.

8-katamerpreparater basert på grunnsekvensen:

Acetyl-NH-X-X-G-D-I-D-X-X- (fast bærer)

ble syntetisert, hvori alle de 19 alternative aminosyrer var substituert i hver av de fire definerte stillinger i katamerpreparatet, en ad gangen. Utprøving av denne gruppe preparater for bindingsaktivitet med test-antistoffet viste at for å bibeholde muligheten til omsetning med dette antistoff, kunne glycinresten bare erstattes med alanin; den amino-terminale asparaginsyre kunne ikke erstattes av noen annen aminosyre; isoleucinet kunne erstattes av valin, leucin eller treonin eller med omkring ti andre aminosyrer som førte til en reduksjon i bindingsaktivitet; og den karboksyl-terminale asparaginsyren kunne i realiteten erstattes av hvilken som helst aminosyre, men serin i denne stillingen ga den sterkeste binding. Utprøvingen viste at den definerte sekvens G-D-I-S var å foretrekke for forlengelse.

Ved å forlenge sekvensen som er definert over, ble det vist at innlemmelse av tryptofan på den amino-terminale ende og histidin på den karboksyl-terminale ende var foretrukket. Imidlertid viste ingen av forlengelsene en særlig markert økning i antistoffbindings-aktiviteten.

Ytterligere forlengelse på den foretrukne definerte sekvens W-G-D-I-S-H viste at det ikke var noen fordel med å forlenge sekvensen ytterligere.

166465

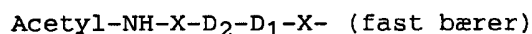
20

Man vil se at mimotopen bestemt for dette spesielle anti-stoff, nemlig W-G-D-I-S-H bare har en forbigående likhet med peptidet som ble anvendt for å indusere antistoffet, nemlig C-G-D-L-G-S-I-A-K. Utprøving av antistoffet i et "utbyttingsnett" basert på den immunogene sekvens G-D-L-G-S-I viste imidlertid at sekvensen G-D-L-G-D-I var markert foretrukket i forhold til sekvens G-D-L-G-S-I (E_{450} -verdier på henholdsvis: 0,45 og 0,16). Der er en likhet mellom mimotopen som bestemt og et foretrukket bindingspeptid for antistoffet. Dette er et tungtveiende bevis for den brede anvendelighet av metoden.

Eksempel 3.

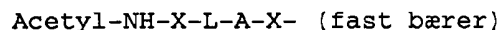
Eksempel 3 viser at lengden av flertallet av katamerpreparater kan være kortere enn 8-katamerer.

Et flertall 4-katamerpreparater ble syntetisert med generell formel:



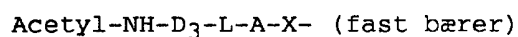
hvor de anvendte forkortelser er som i eksempel 1. Fremgangsmåten for syntetisering var identisk med den som ble anvendt i eksempel 1. Denne ble utprøvet mot et monoklonalt antistoff som er utviklet mot spermhval-myoglobin ved anvendelse av kjente teknikker.

Resultatene fra ELISA for testing av flertallet av 4-katamerpreparater med antistoffet er gitt i fig. 5 på samme måte som i fig. 1. Det fremgår at bare katamerpreparater med formel:



var i stand til å reagere med det monoklonale antistoff.

Som beskrevet i det ovennevnte eksempel 1, ble ytterligere flertall av 4-katamerpreparater syntetisert med formelen:



og

Acetyl-NH-X-L-A-D₄- (fast bærer).

Tabell 4 oppsummerer de mest reaktive katamerpreparatene når de utprøves i et ELISA-system med det monoklonale antistoff.

TABELL 4. Relative antistoffbindings-aktiviteter av 4-katamerpreparater inneholdende tre definerte aminosyrer.

Amino-terminal forlengelse		Karboksyl-terminal forlengelse	
Sekvens	Aktivitet	Sekvens	Aktivitet
Ac-P-L-A-X-S _S	1,80	Ac-X-L-A-Q-S _S	1,73
Ac-A-L-A-X-S _S	1,36	Ac-X-L-A-R-S _S	1,58
Ac-F-L-A-X-S _S	1,33	Ac-X-L-A-S-S _S	1,39

Kontrollsekvenser: Ac-X-L-A-X-S_S 1,00 ($E_{450} = 0,17$)
 Ac-X-A-L-X-S_S 0,94

Katamerpreparater basert på grunnsekvensen

Acetyl-NH-P-L-A-Q- (fast bærer)

ble syntetisert til å danne et "utbyttingsnett" som beskrevet i eksempel 2. Fig. 6 viser resultatet av utprøvingen av disse peptider med ELISA med det monoklonale antistoff. Hver gruppe på 20 linjer i fig. 6 representerer responsen i prosent sammenlignet med gjennomsnittet av responsen for peptidet basert på grunnsekvensen ($E_{450} = 2,62$, med en blindprøve på 0,25). Hvert element av en gruppe på 20 linjer hadde fått aminosyren som er angitt under substituert med en annen aminosyre. Rækkefølgen av linjene er den alfabetiske rækkefølge for den enkelte bokstavkode av aminosyren. Den brede linje i hver gruppe på 20 viser grunnsekvensen P-L-A-Q. Det fremgår klart at for at katamerpreparatet skal være istand til å binde til dette monoklonale antistoff med minst halve aktiviteten av grunnsekvensen, kan prolinet erstattes med valin, isoleucin, leucin, alanin eller serin, leucinet kan bare erstattes av fenylalanin, alaninet kan erstattes med hvilken som helst

166465

22

annen aminosyre, og glutaminresten kan bare erstattes av asparagin.

En gruppe av alle overlappende 4-katamerer fra spermhval-myoglobinsekvensen ble syntetisert ved anvendelse av de fremgangsmåter som er beskrevet for de designerte stillinger i eksempel 1. Disse katamerer ble reagert i ELISA med det monoklonale antistoff. Resultatene er vist i fig. 7. Hver linje representerer den farge som ble utviklet i ELISA og avlest ved 450 nm. Hver linje er nummerert slik at resten på den amino-terminale ende av den spesielle katamer har det samme nummer som i spermhval-myoglobinsekvensen.

Det fremgår tydelig at den eneste 4-katamer som reagerer med det monoklonale antistoff er den som omfatter restene 88 til 91 av spermhvalsekvensen. Denne sekvens er P-L-A-Q. Tydeligvis gjenkjenner det monoklonale antistoff denne spesielle determinant på spermhval-myoglobinet.

En gruppe av 5-katamerer med generell formel:

Acetyl-NH-D₅-P-L-A-Q- (fast bærer)

og

Acetyl-NH-P-L-A-Q-D₆- (fast bærer)

ble syntetisert for å bestemme de best egnede forlengelser for den definerte sekvens. De beste bindingspreparater var:

Acetyl-NH-K-P-L-A-Q- (fast bærer)

og

Acetyl-NH-P-L-A-Q-Y- (fast bærer).

Det skal bemerkes at sekvensen K-P-L-A-Q er homolog med sekvensen av spermhval-myoglobin i restene 87 til 91. Dette eksempel viser igjen anvendeligheten av denne teknikk.

PATENTKRAV:

1. Fremgangsmåte for å bestemme sekvensen av monomerer som er en konformasjonsmessig ekvivalent av en epitop som er komplementær til en spesiell paratop av et antistoff av interesse,

k a r a k t e r i s e r t v e d trinnene:

- 1) et flertall katamerpreparater syntetiseres hvori hvert av de nevnte katamerpreparater består av et flertall katamerer som utgjøres av en definert gruppe monomerer og hvori:
 - (i) sammensetningen av to eller flere designerte stillinger i hver katamer er kjent og er konstant for hver katamer i katamerpreparatet, og
 - (ii) sammensetningen av hver av de resterende stillinger er tilfeldig sammensatt av elementer av nevnte definerte gruppe av monomerer, og nevnte flertall katamerpreparater omfatter preparater hvori sammensetningen i de designerte stillinger varierer systematisk til å inneholde elementer fra nevnte definerte gruppe av monomerer,
- 2) hvert av nevnte flertall katamerpreparater bringes i kontakt med antistoffet av interesse,
- 3) nærvær eller fravær av binding mellom hvert av nevnte flertall katamerpreparater og nevnte gitte antistoff påvises, og
- 4) en partiell sekvens av monomerer for den konformasjonsmessige ekvivalent av en epitop som er komplementær til den spesielle paratop av nevnte antistoff fra den kjente sammensetning i to eller flere designerte stillinger i hver av nevnte flertall katamerpreparater som binder til nevnte antistoff bestemmes, og
- 5) et ytterligere flertall katamerpreparater syntetiseres og omfatter sammensetningen av den partielle sekvens som bestemt i ovennevnte trinn 4 som initiale designerte stillinger, idet hvert av ovennevnte ytterligere flertall av katamerpreparater har minst en ytterligere stilling i hver katamer som en designert stilling, og

166465

24

6) trinnene 2, 3 og 4 gjentas med hensyn til ovennevnte ytterligere flertall katamerpreparater.

2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, karakterisert ved at hvert av det ovennevnte flertall katamerpreparater som syntetiseres utgjøres av gruppen av α -aminosyrer.

3. Fremgangsmåte som angitt i krav 2, karakterisert ved at hvert av det ovennevnte flertall katamerpreparater som syntetiseres består av et flertall av 4- til 8-katamerer.

4. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, karakterisert ved at hvert av det ovennevnte flertall katamerer syntetiseres på en fast bærer og har den generelle formel:

$Y-X-X-D_2-D_1-X-X-X-X-$ (fast bærer),

$Y-X-X-D_2-X-D_1-X-X-X-$ (fast bærer), eller

$Y-X-D_2-X-X-D_1-X-X-X-$ (fast bærer),

hvor Y er en endegruppe av en katamer, X som kan være like eller forskjellige, er et element av en gruppe av monomerer slik at hvert element er tilstede i katamerpreparatet, og D_1 og D_2 er kjente monomerer som er konstant i hvert katamerpreparat.

5. Fremgangsmåte som angitt i krav 4, karakterisert ved at hvert av det ovennevnte flertall katamerer syntetiseres på en fast bærer og har den generelle formel:

$\text{Acetyl-NH-X-X-D}_2\text{-D}_1\text{-X-X-X-X}$ (fast bærer)

hvor X er et element fra gruppen av L- α -aminosyrer, og et slikt flertall katamerer er slik at hvert element av gruppen er tilstede i X-stillingen i omtrent ekvivalente molare mengder og D_1 og D_2 er valgt fra gruppen av L- α -aminosyrer.

166465

1/6

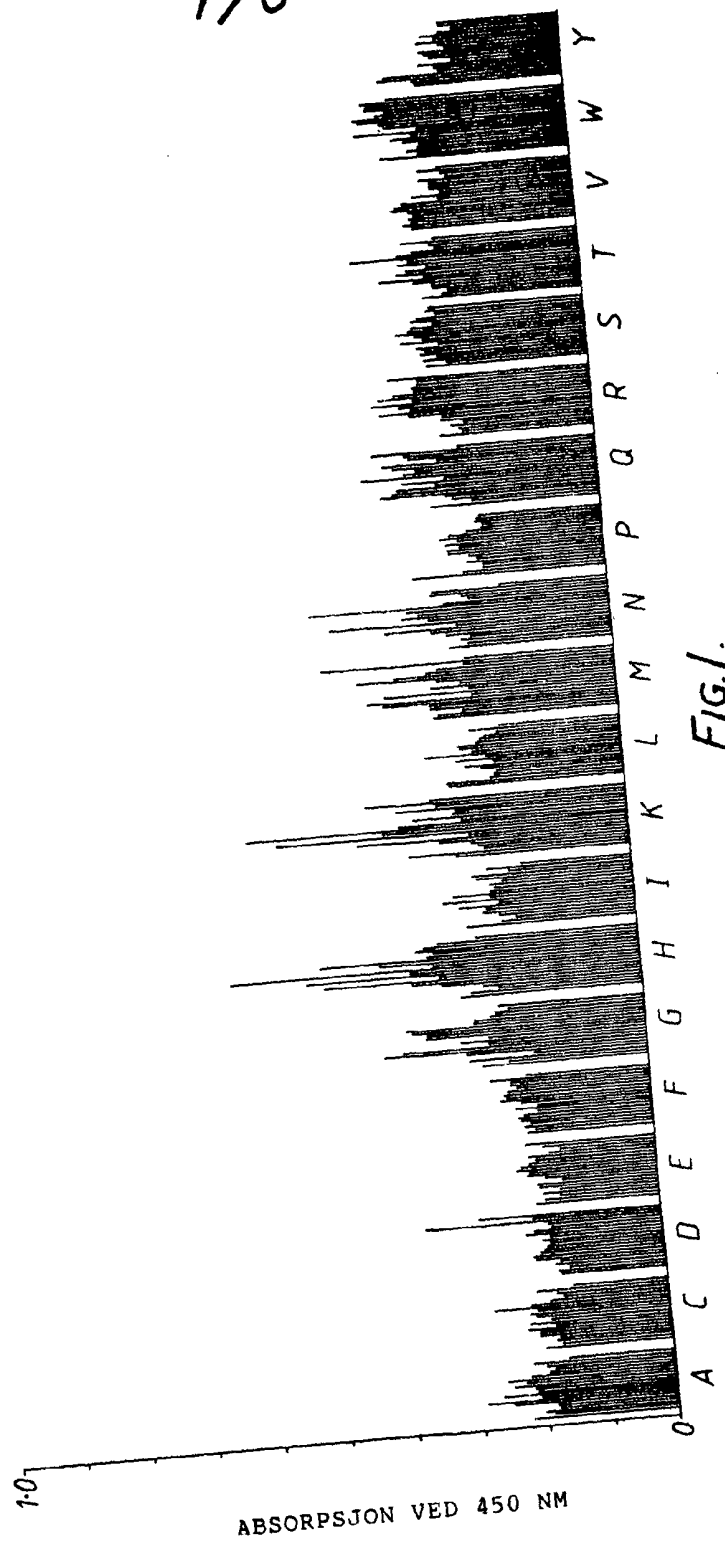


Fig.1.

166465

2/6

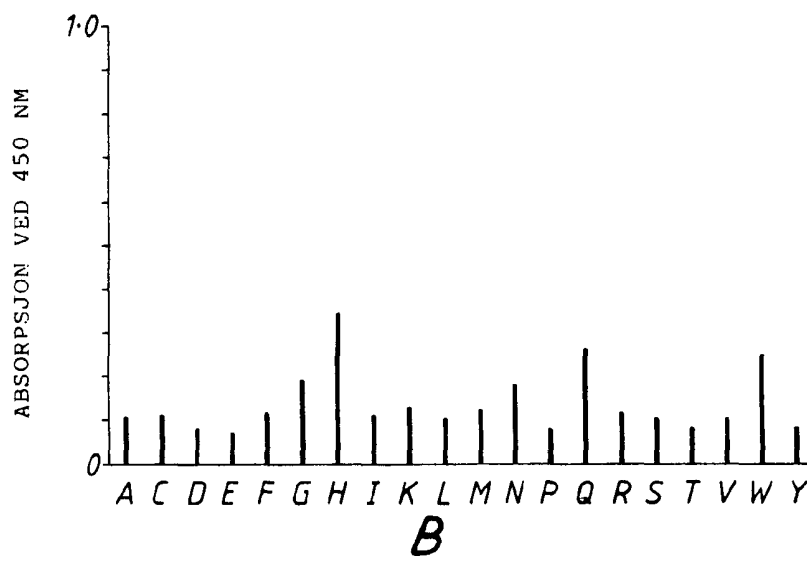
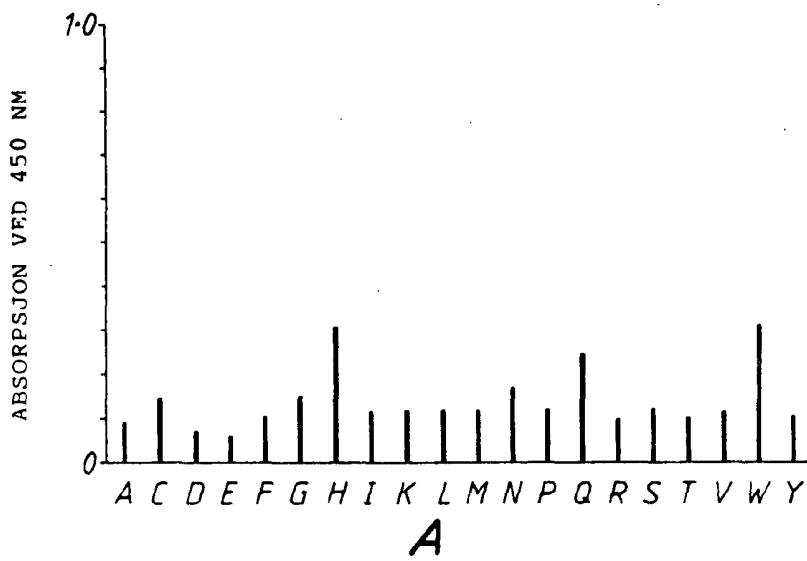


FIG. 2.

166465

3/6

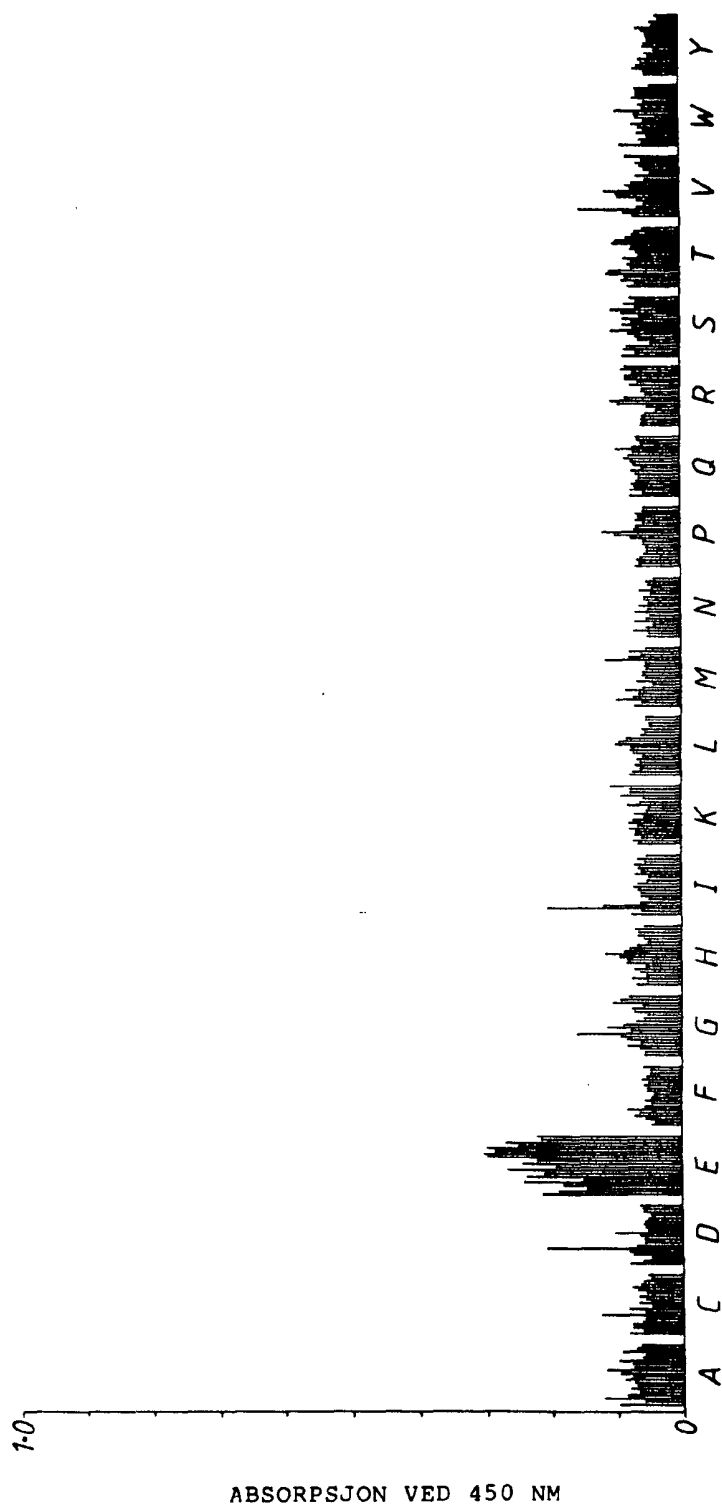


FIG. 3.

4/6

166465

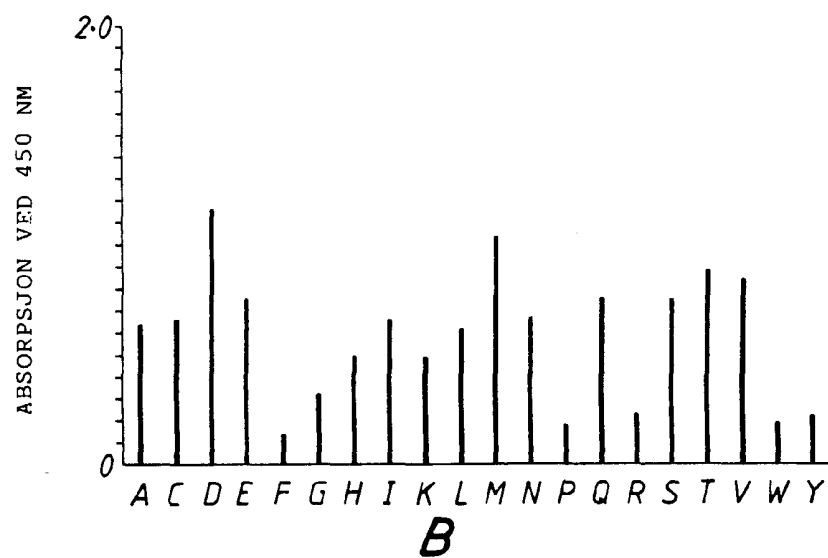
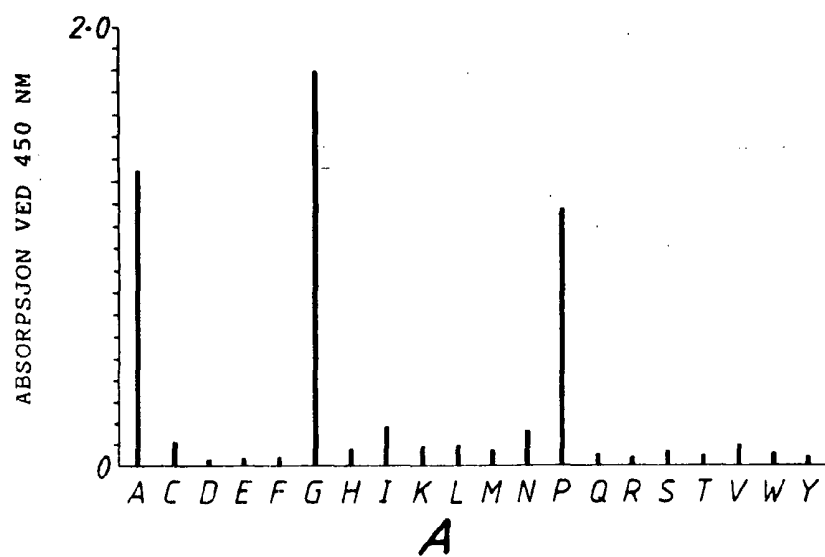


FIG. 4.

166465

5/6

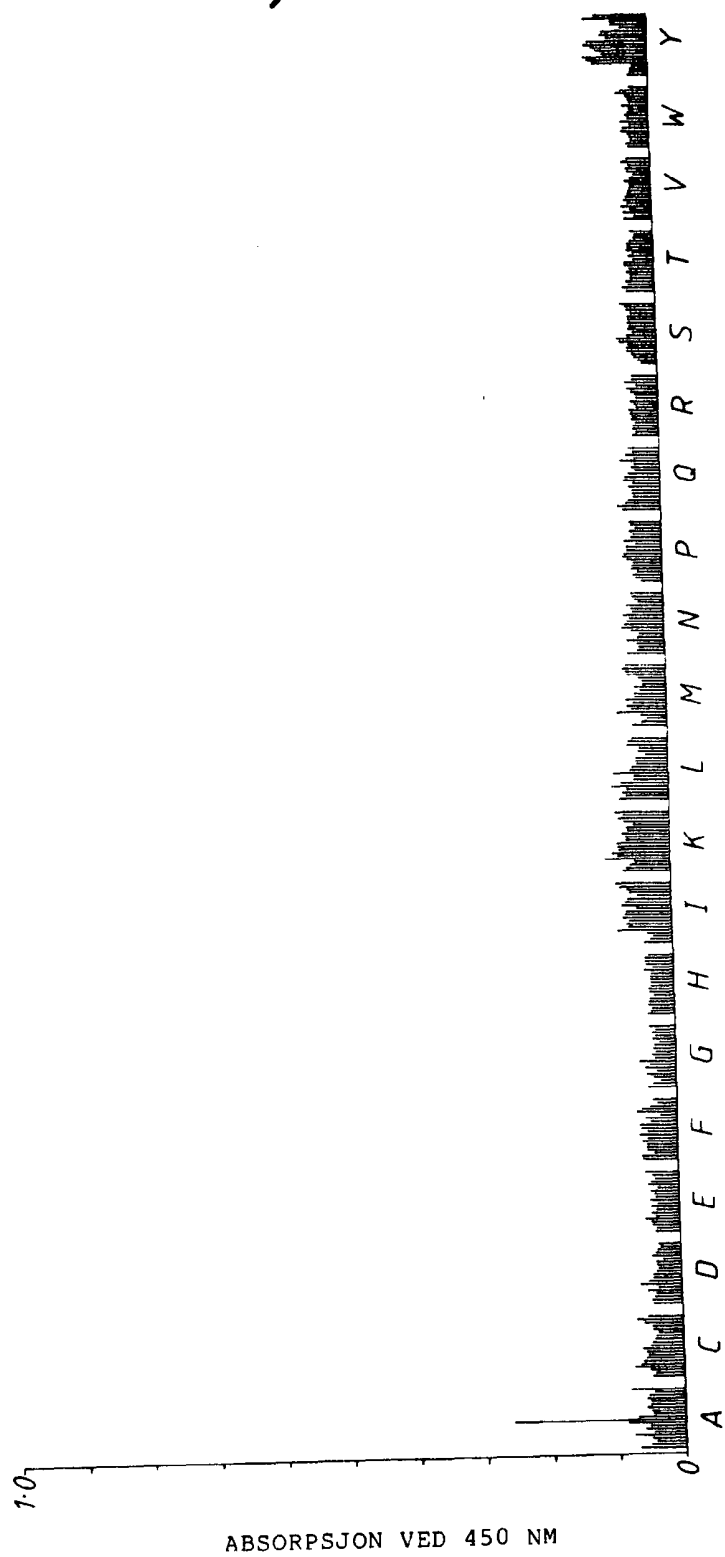


FIG. 5.

6/6

166465

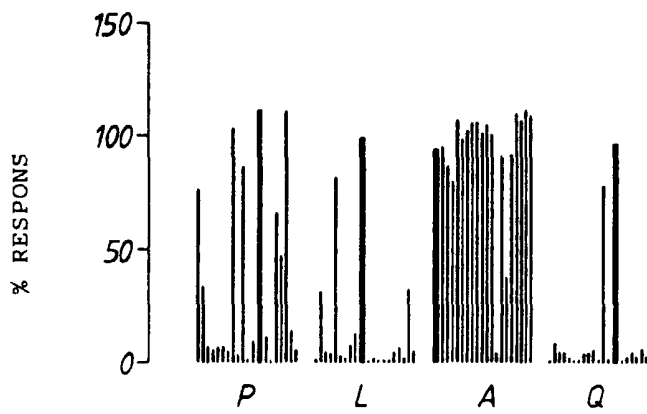


FIG. 6.

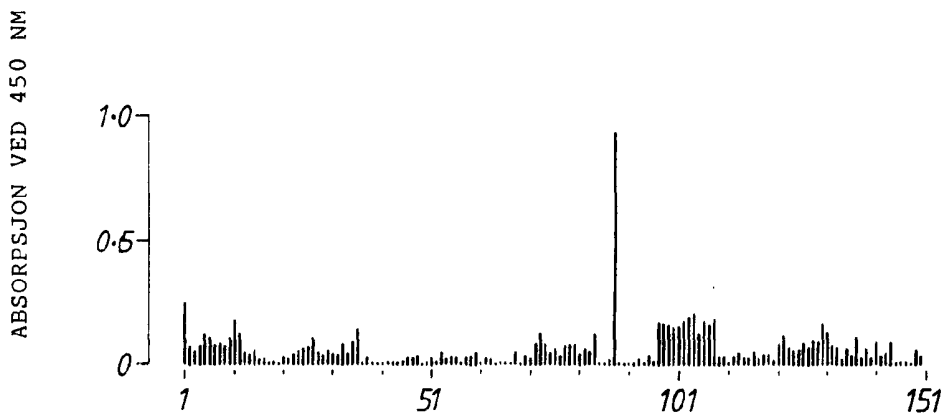


FIG. 7.