



NORGE

(19) [NO]

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) Nr. 163778

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

(51) Int. Cl.⁵ C 07 K 3/20, 15/00

(21) Patentsøknad nr. **844318**

(22) Inngivelsesdag 30.10.84

(24) Lopedag 18.05.83

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver **THE OHIO STATE UNIVERSITY,**
190 North Oval Mall,
Columbus, OH 43210,
US.

(86) Internasjonal søknad nr. PCT/US83/00777

(86) Internasjonal inngivelsesdag 18.05.83

(85) Videreføringsdag 30.10.84

(41) Alment tilgjengelig fra 30.10.84

(44) Uttegningsdag 09.04.90

(72) Oppfinner **VERNON CECIL STEVENS,** Dublin,
OH, US.

(74) Fullmektig Siv.ing. Jan E. Helgerud,
Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 04.03.83, US, nr. 472190.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV ET
LINEÆRT, POLYMERT POLYPEPTID.**

(57) Sammendrag Modifiserte polypeptider istand til å frembringe dannelsen av antistoffer i et dyr fremstilles ved å danne en lineær polymer av polypeptidfragmenter som hver har en molekylstruktur tilsvarende et fragment av proteinet mot hvilket antistoffer skal dannes. Slike lineære polymerer kan lages mere immunogene enn proteinene med hvilke de er beslektet uten å innføre uønskede eksterne stoffer i dyret som behandles, men har reproducerbar immunogene egenskaper. Proteiner som ikke er endogene eller immunogene for et dyr kan modifiseres kjemisk for å gjøre dem mere immunogene. Videre kan modifiserte antigener som er brukbare ved fertilitetskontroll fremstilles ved kjemisk å modifisere zona pellucida- eller spermaantigener. Disse modifiserte polypeptider, antigener og modifiserte antigener inngis fortrinnsvis i form av en vaksine med en bærer omfattende en blanding av mannidmonocoleat. med squalan eller squalen.

(56) Anførte publikasjoner USA (US) patent nr. 4201770, 4302386, 4384995.



Patentskrift nr. 163 778

N (51) Int. Cl.⁸ C 07 K 3/20, 15/00

Rettelse - Correction

(73) THE OHIO STATE UNIVERSITY

I ovennevnte patentsskrift er klassen feil angitt.

R (51) Int. Cl.⁸ C 07 K 3/28, 15/00

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av et lineært, polymert polypeptid som i et dyrs legeme fremtvinger dannelsen av antistoffer mot human korionisk gonadotropin.

5

I GB-PS 1 567 764 og US-PS 4 302 386 er det beskrevet at hormoner eller andre proteiner som finnes naturlig i et dyr kjemisk kan modifiseres utenfor dyrets kropp (et uttrykk som her benyttes for å inkludere mennesker) slik at, ved injisering i dyr, fremtvinger de modifiserte hormoner eller andre proteiner dannelse av antistoffer som reagerer ikke bare med det kjemisk modifiserte hormon eller andre protein, men også med det ikke modifiserte hormon eller protein som finnes naturlig i dyret, for derved å redusere nivået av naturlig hormon eller annet protein i dyrets kropp. I stedet for å bruke hele hormonet eller et annet protein beskriver de ovenfor nevnte patenter også bruken av naturlige eller syntetiske fragmenter av slike proteiner i denne såkalte "isoimmuniserings"-teknikk.

20

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

30

1. Gastrin for behandling av Zollinger-Ellison-syndromet;
2. Angiotension II for behandling av hypertensjon;
3. Veksthormon og somatomedin for behandling av diabetes og dermed forbundne mikro- og makrovaskulære sykdommer;
4. Paratyroidhormon for behandling av nyresten;
5. Insulin og glukagon for behandling av hyperinsulinon;

35

163773

2

6. Tyroidstimulerende hormon for behandling av hyper-tyroidisme;

7. Sekretin for behandling av tarmirritasjonsyndrom.

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

10 Hovedteknikken ved den kjemiske modifisering som er beskrevet i de ovenfor angitte patenter er kobling av hormonet, et annet protein eller fragment derav, til et stort "bære"-molekyl som difteritoksid, tetanustoksid eller en syntetisk polymer; disse bæremolekyler er ikke endogene til dyret som skal behandles. De ovenfor nevnte patenter beskriver også
15 polymerisering av hormonet, annet protein eller fragment derav, ved reaksjon med en bifunksjonell organisk reagens (for eksempel en bifunksjonell imidester som dimetyladiimidat, dimetylsuperimidat eller dietylmalonimidat) eller
20 dimerisering ved oksydasjon av en tiolgruppe for å danne en disulfidbro. Alle disse typer kjemiske modifikasjoner har mangler. Dimerisering av hormon, annet protein eller fragment via en disulfidbro innfører ikke eksogent materiale i dyret som skal behandles men, fordi det kjemisk modifiserte
25 antigen som inngis til dyret kun er en dimer av et hormon, annet protein eller fragment derav, som i seg selv ikke er immunogent mot dyret, er slike dimere sjeldent vellykket med å frembringe brukbare nivåer av antistoffer. De modifiserte polypeptider som fremstilles ved bruk av bærere
30 inneholder en meget høy andel ikke-endogent materiale og vil vanligvis fremtvinge dannelsen av vesentlige mengder antistoffer mot bæreren så vel som mot hormonet, annet protein eller fragmenter derav. Selv om dannelsen av antistoffer mot bæreren noen ganger kan være brukbart, for eksempel en
35 vaksine basert på et HCG-fragment koblet til difteritoksid og ment for fertilitetskontroll har den den tilfeldige fordel at det også oppstår beskyttelse mot difteri, er det mange

anledninger der det ikke er ønskelig å fremtvinge dannelse av relativt store mengder antistoffer mot bæreren. Hvis man for eksempel ønsker å benytte en vaksine inneholdende et modifisert polypeptid for å behandle en pasient med et karcinom eller en alvorlig viral infeksjon, kan det være 5 ønskelig å unngå overbelastning av pasientens immunsystem ved å utfordre det ikke bare med hormonet, annet protein eller fragment derav mot hvilke antistoffene er ønsket, men også med bæreren.

I teorien er den kanskje mest lovende av de modifiserings-teknikker som er beskrevet i de ovenfor nevnte patenter, polymerisering av hormonet, annet protein eller fragment derav, ved omsetning med en bifunksjonell reagens. Denne 10 teknikk har i teorien fordelene av å innføre en relativt liten andel ikke-endogent materiale i det dyr som skal behandles (og sogar denne relativt lille andel ikke-endogent materiale kan velges slik at det ikke er sterkt immunogent) mens man allikevel tilvelebringer et modifisert polypeptid stort nok til å være sterkt immunogent. Uheldigvis har 15 forsøk vist at direkte anvendelse av den bifunksjonelle organiske reagenspolymeriseringsteknikk på de fleste hormoner, andre proteiner eller fragmenter derav av praktisk interesse, gir meget kompliserte blandinger av modifiserte polypeptider tilsvarende kompliserte immunogene egenskaper. Videre er de immunogene egenskaper for de polymeriserte polypeptider som således fremstilles ikke lett reprodu- 20 serbare, men en slik reproduserbarhet er vesentlig i ethvert materiale som er ment for farmasøytisk bruk, fordi de nødvendige sikkerhetsprøver og effektivitetsprøver ikke kan gjennomføres på et ikke-reproduserbart materiale. 25 30

Det er nu funnet (selv om denne kunnskap ikke er nedfelt i den publiserte litteratur) at grunnen til de meget kompliserte immunogene egenskaper og mangelen på reproduserbarhet 35 som er til stede i polymerer fremstilt ved bifunksjonell organisk reagens polymeriseringsteknikk er at, uansett bruken

163773

4

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

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

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

I henhold til dette oppnår man i et aspekt et modifisert
35 polypeptid for å fremtvinge dannelse i legemet til et dyr av
antistoffer mot et protein, hvorved det modifiserte poly-
peptid karakteriseres ved at det omfatter en lineær polymer

av polypeptidfragmenter der hvert av fragmentene i sin monomere form er i det vesentlige ikke immunogent mot dyret og har en molekylstruktur tilsvarende et fragment av proteinet mot hvilket antistoffene skal fremtvinges, hvorved den lineære polymer etter inngivelse i dyrets legeme har en større kapasitet til å fremtvinge dannelse av antistoffer enn proteinet, hvorved den lineære polymer er i det vesentlige fri for ikke-lineære polymerer av fragmentene.

I henhold til dette angår oppfinnelsen som nevnt ovenfor en fremgangsmåte for fremstilling av et lineært, polymert polypeptid som i et dyrs legeme å fremtvinger dannelsen av antistoffer mot human korionisk gonadotropin, og denne fremgangsmåte karakteriseres ved at den omfatter

- a. å behandle en første mengde av et utgangspeptid med en molekylstruktur tilsvarende et fragment av human korionisk gonadotropin og med en fri aminogruppe og minst en fri tiolgruppe, med minst ett tiolblokkerende middel, for derved å blokkere tiolgruppen på det første peptid og etterlate kun en enkelt fri aminogruppe;
- b. å omsette det blokkerte første peptid med et ikke-aminosyrebifunksjonelt koblingsmiddel, fortrinnsvis 6-maleimido-kapronacyl-N-hydroksysuccinimidester, med en funksjonell gruppe i stand til reaksjon med en fri aminogruppe og en andre funksjonell gruppe i stand til reaksjon med en fri tiolgruppe for derved å forårsake at en av de funksjonelle grupper i koblingsmidlet reagerer med den frie aminogruppe på peptidet mens den andre funksjonelle gruppe på koblingsmidlet forblir uomsatt;
- c. behandling av en andre mengde utgangspeptid med minst ett blokkerende middel for derved å gi et peptid i en form som kun har en enkelt fri tiolgruppe, idet dette ene sete befinner seg på eller ved siden av en av utgangspeptidets termini;
- d. omsetning av produktet fra trinn (b) med det blokkerte peptid fra trinn (c) for derved å gi et dimert peptid der

163773

6

de to utgangspeptider er interforbundet via en rest av koblingsmidlet;

- 5 e. hvis nødvendig, omsetning av det resulterende dimerpeptid med minst ett blokkerende middel, for derved å blokkere tiolgruppene på det dimere peptid og kun etterlate en enkelt fri aminogruppe, idet denne aminogruppe befinner seg ved eller ved siden av en av det dimere peptids termini, og omsetning av det blokkerte dimere peptid med det bifunksjonelle koblingsmiddel med en funksjonell gruppe i stand til å reagere med en fri aminogruppe og en andre funksjonelle gruppe i stand til å reagere med en fri tiolgruppe, for derved å bringe en av de funksjonelle grupper i koblingsmidlet til omsetning med den frie aminogruppe på det dimere peptid, mens den andre funksjonelle gruppen i koblingsmidlet forblir uomsatt;
- 10 f. behandling av en ytterligere mengde av utgangspeptidet med minst ett blokkeringsmiddel for derved å gi peptidet i en form med kun en enkelt fri tiolgruppe i det reaksjonssete er på eller ved siden av en av utgangspeptidets termini;
- 15 g. omsetning av produkter fra trinn (e) med det blokkerte peptid fra trinn (f) for derved å bringe den andre funksjonelle gruppe i koblingsmidlet til å reagere med den frie tiolgruppe og å danne et polymerpeptid der de tre peptider er interforbundet via rester av koblingsmidlet;
- 20 h. å gjenta trinnene (e) til (g) inntil den ønskede lengde er oppnådd.
- 25

Som allerede nevnt omfatter de lineære polymerisk modifiserte polypeptider som fremstilles ifølge oppfinnelsen inerte polymerer av polypeptidfragmenter i det vesentlige frie for ikke-lineære polymerer. Ved å si at polypeptidfragmentene som benyttes i det lineære polymeriske polypeptid har en molekylstruktur tilsvarende et fragment av proteinet mot hvilke antistoffer skal frembringes, menes ikke nødvendigvis at hele aminosyresekvensen for hvert fragment må tilsvare nøyaktig til en del av proteinet mot hvilke antistoffer skal fremtvinges, for eksempel kan i visse tilfeller

30

35

visse erstatninger av aminosyrer være mulige uten å påvirke den immunogene karakter av fragmentet.

5 For eksempel beskriver det ovenfor nevnte US-PS 4 302 386 et polypeptid kalt struktur IV som antas avledet fra β -under-
enheten av HCG men hvori cysteinresten i 110 posisjon er
erstattet med α -aminosmørsyre. Spesielt må det, når det er
ønskelig å fremtvinge dannelse av antistoffer mot et endogent
protein, polypeptidfragmentene som benyttes for å danne det
10 riktige modifiserte polypeptid ha en molekylstruktur til-
svarende et fragment av det endogenprotein hvis antistoffer
skal dannes, dette utelukker ikke muligheten for at slike
fragmenter virkelig kan avledes fra et protein av en annen
type fordi mange proteiner enten er identiske mellom arter
15 eller skiller seg fra hverandre så lite når det gjelder
aminosyresekvensen at en betydelig tverreaktivitet fore-
ligger mellom antistoffer til de tilsvarende proteiner i de
to arter. Som nevnt nedenfor vil for eksempel zona pellucid-
enzymet fra svin når de injiseres i mennesker produsere
20 antistoffer som viser betydelig aktivitet mot human zona-
antigener. Hvis man for eksempel i henhold til dette ønsker å
danne et modifisert polypeptid for å fremtvinge dannelse av
antistoffer i mennesker mot zona pellucidaantigener kan egnet
polypeptidfragmenter fremstilles fra zona pellucidaantigener
25 fra svin. Videre kan fragmentene som benyttes i de lineære
polymere polypeptider inkorporere frekvenser av aminosyre
uten motpart i sekvensen av protein hvorfra fragmentet
avledes. Videre beskriver for eksempel det tidligere nevnte
US-PS 4 302 386 visse polypeptidfragmenter angitt struktur
30 (IV), (VIII), (IX), (X) og (XIV) som alle avledes fra
 β -underenheten av HCG men som innarbeider avstandssekvenser
omfattende flere prolinrester.

35 Det kan først synes overraskende at en lineær polymer av et
polypeptid hvis monomere form effektivt er ikke-immunogen for
et dyr, kan immunogeniseres overfor det samme dyr. Uten å
ønske å være bundet av noen spesiell teori antas det at

163778

8

økningen i immunogeniteten ved polymerisering skyldes økning av den fysikalske størrelse av molekylene, noe som muliggjør at disse gjenkjennes lettere av dyrets immunsystem. Det kan vises at minst noen monomere polypeptider er meget svakt immunogene og forårsaker at dyrets immunsystem produserer påvisbare mengder antistoffer, hvilke mengder imidlertid er altfor små til å være effektive. Immunsystemet er ikke veltilpasset til å gjenkjenne molekyler så som de små polypeptider når polypeptidene er til stede i ikke-polymerform.

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

De lineære polymere polypeptider kan benyttes for å fremtvinge dannelse av antistoffer til både endogene og ikke-endogene proteiner ved å benytte egnede polypeptidfragmenter for å danne polymerene. (Uttrykket "endogen" benyttes her for å angi et protein som er naturlig til arten som behandles, uansett hvorvidt antigenet er endogent til det spesielle individuelle dyr som behandles. Således er for eksempel for foreliggende formål et svinespermaantigen ansett å være endogent til en purke selv om åpenbart et slikt spermaantigen vanligvis ikke vil være til stede i en purkes legeme. Ytterligere detaljer for bruken av ikke-endogene proteinfragmenter som kan benyttes i lineære polymere polypeptider er gitt nedenfor i forbindelse med diskusjonen av oppfinnelsens antigener. Hva angår endogene proteiner, fragmenter av hvilke kan benyttes for å danne de lineære polymere polypeptider, kan det generelt angis at slike endogene

proteiner kan inkludere hvilke som helst av de proteiner som er nevnt i det tidligere angitte US-PS 4 302 386. Videre skal det påpekes at bruken av de lineære polymere peptider basert på veksthormon og/eller somatomedien ikke er bekreftet på

5 diabetespasienter. Således kan de lineære polymere polypeptider basert på disse to hormoner benyttes for å behandle ikke-diabetiske pasienter slik som personer som lider under akromegali, som har utstrakt nivåer av veksthormon- og/eller somatomedien.

10 Spesielt foretrukne lineære polymere polypeptider fremstilt ifølge oppfinnelsen er de som dannes fra fragmenter med en molekylstruktur tilsvarende et fragment av human korionisk gonadotropin og spesielt tilsvarende et fragment av β -under-

15 enheten derav. To spesielt foretrukne fragmenter for bruk i de lineære polymere polypeptider er:

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

20 Fragment A; og

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

25 Fragment B

Andre HCG-avlede fragmenter som kan benyttes i de lineære polymerpolypeptider er de med strukturen II-VIII, VIIIA og IX-XIV som angitt nedenfor, idet ytterligere detaljer hva angår den immunologiske art av disse fragmenter er gitt i

30 det ovenfor angitte US-PS 4 302 386:

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

35

Struktur II

163778

10

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

Struktur III

5

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

Struktur IV

10

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

Struktur V

15

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

Struktur VI

20

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

Struktur VII

25

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

Struktur VIII

30

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

Struktur VIIIa

35

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

Struktur IX

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

Struktur X

5

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

Struktur XI

10

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

Struktur XII

15

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

Struktur XIII

20

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

Struktur XIV

25

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

35

De lineære polymere polypeptider basert på HCG-avledede
 fragmenter er brukbare på nøyaktig samme måte som de

163773

tilsvarende modifiserte polypeptider der de samme fragmenter er koblet til bærere slik som beskrevet i det nevnte US-PS 4 320 386. Etter dette patents tid har ytterligere oppdagelser kommet til angående forbindelsene mellom HCG og immunologisk tilsvarende stoffer og visse karcinomer. Det synes at visse karcinomer skiller ut korioniske gonadotropin eller et immunologisk tilsvarende materiale på overflaten og presenterer derfor en overflate til immunsystemet hos vertsdyret som overfladisk synes å være dannet av et materiale som er endogent til vertsdyret og som således er relativt ikke-immunologent. På grunn av denne kjente forbindelse mellom visse karcinomer og korionisk gonadotropin eller korionisk gonadotropin-lignende stoffer, er de HCG-avlede lineære polymere polypeptider brukbare for behandling av HCG og korionisk gonadotropin-forbundne karcinomer. De samme lineære polymere polypeptider er også selvfølgelig brukbare for ferilitetskontroll som beskrevet i det tidligere nevnte US-patent.

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

Som allerede nevnt fremstilles de lineære polymere peptider ved polymerisering av fragmenter av proteinet til hvilket antistoffer skal fremtvinges heller enn hele proteinet selv. Denne bruk av fragmenter i stedet for et helt protein har viktige fordeler (og tilsvarende fordeler sikres ved bruk av fragmenter i antigenene og modifiserte antigener som diskutert i detalj nedenfor). Det er velkjent for fagmannen på det immunologiske område (se for eksempel W.R. Jones, "Immunological Fertility Regulation", s. 11 og følgende) at en av de største potensielle risiki ved en vaksine, spesielt en kontraseptiv vaksine, er tverrreaktivitet med ikke-målte antigener, noe som gir det som i det vesentlige er en kunstig induisert autoimmun sykdom i stand til å forårsake immuno-

patologiske skader i, og/eller tap av funksjon av vevet som bærer de tverrreaktive stoffer. To mulige mekanismer for slik tverr-reaktivitet er:

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

Åpenbart kan de endringer som gis av begge disse tverr-reaktivitetsmodeller reduseres ved i de lineære polymere polypeptider å benytte antigener og modifiserte antigener, et fragment av et komplekst protein i stedet for hele proteinet. Fordi fragmentet har et enklere sekvens enn proteinet hvorfra det er avledet, er det mindre sjanse for delte antigeniske determinanter eller sterisk overlapping med ikke-mål proteiner. Spesielt kan tverr-reaksjoner ofte unngås ved å benytte fragmenter avledet fra endel av målprotein

20 (det vil si proteinet mot hvilke antistoffer skal fremtvinges) som ikke er tilsvarende i sekvens til ikke-mål men tverr-reaktivt protein. Som beskrevet i det ovenfor nevnte US-PS 4 320 386 er spesielt et av hovedproblemene ved å tvinge frem antistoffer til HCG-tverr-reaktivitet av HCG-antistoffer med LH idet denne tverreaktivitet i det minste i vesentlig grad skyldes identiteten av aminosyresekvensen mellom LH og 1-110 aminosyresekvensen i β -underenheten av HCG. I henhold til dette er, når det er ønskelig å danne et

30 HCG-avledet lineært polymert polypeptid, fragmentet som benyttes fortrinnsvis et med en molekylstruktur tilsvarende en del av eller hele 111-145 sekvensen av β -underenheten HCG fordi det er kun denne 111-145 sekvens av β -HCG som skiller seg fra den tilsvarende LH-sekvens. Imidlertid antyder forskning at fragmentene som benyttes i de lineære polymere polypeptider kan inneholde sekvenser som tilsvarer 101-110

35

163773

sekvensen i β -HCG som er vanlig for β -HCG og LH uten å indukere dannelse av antistoffer som er reaktive LH. Således kan man i de lineære polymere polypeptider benytte fragmenter som inneholder en del av eller hele denne felles 101-110
5 sekvens uten å forårsake tverreaktivitet med LH. For eksempel representerer struktur II ovenfor 111-145 aminosyresekvensen i β -HCG. Hvis ønskelig kan et fragment med 101-145 aminosyresekvensen i β -HCG benyttes isteden for fragmentet med struktur II i de lineære polymere polypeptider uten i
10 vesentlig grad å påvirke aktiviteten for de lineære polymerer og uten å forårsake tverr-reaktivitet med LH.

Polymerisering av fragmentene for å danne de lineære polymere polypeptider kan gjennomføres på en hvilken som helst måte
15 for å koble peptidfragmenter for å danne lineære polymerer derav. De lineære polymere polypeptider kan inndeles i to adskilte typer. I den første type er individuelle peptidfragmenter bundet hode-hale ved peptidbindinger slik at hele polymeren oppfatter kun fragmentene selv uten å inneholde
20 eksternt materiale. Selv om slike rene polymerer har fordelene av ikke å innføre eksternt materiale i legemet til dyret som behandles, er de vanligvis for kostbare til å være praktiske fordi de nødvendige fragmenter (uansett om de er fremstilt ved totalsyntese eller spalting av et naturlig protein) i
25 seg selv er meget kostbare og vesentlige tap inntreffer under polymeriseringen. Videre kan hode-halekobling av fragmentene uten mellomliggende rester gi immunologiske determinanter som ikke har noen motpart i det ikke-polymeriserte fragment. Hvis for eksempel det ovenfor beskrevne fragment, omfattende
30 105-145 sekvensen av HCG, polymeriseres ved hjelp av peptidbindinger, vil en sekvens:

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

fremstilles ved hver sammenskjøting mellom ved siden av hverandre liggende fragmenter, og denne sekvens kan gi
35 dannelse av antistoffer som ikke ville fremstilles av fragmentet selv, og som kan være uønsket. Fordi det ikke er noen "tegnsetting" som kan fortelle immunsystemet i mottager-

dyret hvor et fragment begynner og et annet slutter, kan med andre ord dyrets immunsystem utilsiktet starte å lese av den gale rest og gi uønskede antistoffer ved å kjøre sekvensene av ved siden av hverandre liggende fragmenter sammen. Av denne grunn er det generelt ikke å anbefale å benytte lineære polymerer der fragmentene er bundet sammen med peptid-polymerer selv om slike lineære polymerer kan være brukbare i visse tilfeller.

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

I den andre type lineære polymerpolypeptider er polypeptidfragmentene forbundet med hverandre ved hjelp av rester avledet fra en bifunksjonell reagens som benyttes for å bevirke polymerisering av fragmentene slik at den endelige lineære polymer er en alternerende lineær polymer av polypeptidfragmenter og koblingsreagensrester. Selv om denne type polymerer nødvendigvis innfører visse eksterne stoffer til dyret som behandles kan andelen av eksterne stoffer gjøres betraktelig lavere enn den ville være hvis fragmentene var koblet til en stor bærer slik som et difteritoksid. Koblingsmidlet som nødvendigvis er et bifunksjonelt koblingsmiddel for å gi en virkelig lineær polymer, kan velges slik at resten den etterlater i polymeren ikke er sterkt immunogen (slik at det ikke legger en stor belastning på immunsystemet i mottagerdyret i slik som for eksempel et stort bæremolekyl

163778

16

som difteritoksid ville ha gjort), og nærværet av disse rester i polymeren har fordelene av i det vesentlige å eliminere falske immunologiske determinanter som dannes ved sammenkobling av hodet av et fragment med halen av det ved siden av stående fragment slik som diskutert ovenfor.

For å sikre at en sann lineær polymer fremstilles under polymeriseringsprosessen omsettes en terminal av et første polypeptidfragment med det bifunksjonelle koblingsreagens slik at koblingsreagensen reagerer med en gruppe som er til stede ved eller nær terminalen av fragmentet; for eksempel kan koblingsreagensen reagere med en N-terminal aminogruppe, en C-terminal karboksylgruppe eller en fri tiolgruppe som er til stede på et C-terminal cystein. Åpenbart bestemmer arten av koblingsmiddel som benyttes hvilken gruppe i peptidet som reagerer. For å unngå enhver tverrbinding og for å sikre et reproduserbart resultat er det viktig at kun et sete på det første fragment er tilgjengelig for reaksjon med koblingsmidlet slik at koblingsmidlet kan binde seg kun til det første fragment på dettes ene sete. Som fagmannen vil vite kan, hvis det er ønskelig å benytte et fragment som inneholder mere enn en gruppe som kan reagere med koblingsmidlet, de overskytende seter blokkeres ved binding til egnede beskyttende grupper. Produktet som dannes ved omsetning av det første fragment med koblingsmidlet omsettes så med et andre fragment (som kan være det samme eller forskjellig fra det første fragment) med et enkelt sete tilgjengelig til å reagere med den andre reaktive gruppe i det bifunksjonelle bikoblingsmiddel, for derved å koble det første og andre fragment med en rest avledet fra koblingsmidlet. Etter enhver nødvendig rensing av dette dimere produkt omsettes dette så til en ytterligere andel av et koblingsmiddel som kan være det samme eller et annet i forhold til det som ble benyttet for å bevirke den første kobling, for derved å omsette den frie terminal av enten det første eller det andre fragment med koblingsmidlet. Naturligvis er det viktig å sikre at kun et sete på dimerene er tilgjengelige for kobling med koblingsmidlet og

slik det vil fremgå for fagmannen kan blokkering eller avblokkering av potensielt reaktive grupper på det dimere polypeptid være nødvendig. Reaksjonsproduktet av dimert polypeptid med koblingsmidlet omsettes så med et tredje fragment med kun et enkelt sete tilgjengelig for reaksjon med den gjenværende reaktive gruppe av koblingsmidlet for derved å gi en lineær polymer som inneholder tre polypeptid-fragmenter. Åpenbart kan denne prosess gjentas inntil den ønskede størrelse for den lineære polymer er oppnådd.

Det vil være åpenbart for fagmannen at de bifunksjonelle koblingsreagenser som benyttes for å fremstille de lineære polymere polypeptider bør være asymmetriske, det vil si at de bør ha to funksjonelle grupper som reagerer med forskjellige grupper på fragmentene som polymeriseres fordi for eksempel hvis man gjorde forsøk på å omsette en bifunksjonell bikoblingsreagens med to funksjonelle grupper som begge reagerte med aminogrupper med et første fragment med en enkelt aminogruppe ville i det min-ste noe av det første fragment dimeriseres via en rest avledet fra det bifunksjonelle bikoblingsreagens. Slik dimerisering kan i teorien unngås ved å benytte et meget stort overskuddreagens, men i praksis er det uønsket å løpe risikoen for å fremstille sogar en liten andel dimer. På tilsvarende måte vil det på senere trinn i polymeriseringsprosessen være ennu mindre ønskelig å benytte symmetriske koblingsreagenser og derved å løpe risikoen for dimerisering av de partielt dannede polymerer som allerede er fremstilt. I den foretrukne prosess for fremstilling av de lineære polymerpolypeptider slik den allerede er beskrevet, påbegynnes polymerkjeden med et første peptid uten ikke-blokkert tiolgruppe og med en ikke-blokkert aminogruppe kun på N-terminalen (peptider inneholdende tiolgrupper og/eller aminogrupper andre enn N-terminalen kan selvfølgelig benyttes hvis alle disse tiol- og aminogrupper er blokkert med et hvilket som helst konvensjonelt blokkeringsmiddel). Dette første peptid omsettes så med et aminogruppeaktiverende middel, et foretrukket aktiverings-

163778

18

middel for dette formål er 6-maleimidokapronsyre-N-hydrokso-
succinimidester (MCS); omsetning av peptidet med en reagens
gjennomføres optimalt ved pH 6,6). Aktiveringsmidlet reagerer
med aminogruppen på N-terminalen av det første peptid og
5 danner en aktivert form av det første peptid; når det gjelder
MCS er det esterdelen av reagensen som reagerer med
N-terminalgruppen i peptidet. Det er vanligvis så nødvendig å
fjerne overskytende aktiveringsmiddel før man fortsetter
fremstillingsprosessen. Når overskudd av aktiveringsmiddel er
10 fjernet blir det aktiverte første peptid omsatt i et andre
peptid med et C-terminalcystein i redusert tilstand (det vil
si med en ublokkert 3-tiolgruppe), for derved å forårsake
kobling av N-terminalen av det aktiverte første peptid til
C-terminalen av det andre peptid via en aktiveringsmiddel-
15 rest. Fortrinnsvis blir så den resulterende dimer renses som
beskrevet i større detalj nedenfor. Derefter blir dimeren
igjen omsatt med et aminogruppeaktiverende middel og så med
den andre del av det andre peptid eller med et tredje peptid
for derved å danne en trimer. Denne prosedyre gjentas inntil
20 den ønskede kjedelengde er oppnådd.

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

35 Ved denne metode for fremstilling av lineær polymerer kan de
første og andre peptider være identiske i kjemiske konfigu-

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

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

De modifiserte antigener som fremstilles ved kjemisk modifisering av ikke-endogene proteiner skal nu beskrives i større detalj. Som fagmannen vil være klar over er det
20 tallrike patogener og tilsvarende stoffer som er kjent og som ikke er endogene hos dyr, som er i stand til å gi skadelige virkninger i dyrets legeme, men som ikke er immunogene mot dyret i den betydning at innføring av patogenet eller det annet stoff i dyrets legeme ikke får dyrets immunsystem til å fremstille de mengder riktige antistoffer som er nødvendig
25 for at dyrets immunsystem skal kunne ødelegge patogenet eller det tilsvarende materiale. For eksempel er herpes simplex type II virus i stand til å fremkalle et antall skadelige virkninger hos mennesker inkludert dannelse av smertefulle lesjoner i genitalområdene. Selv om denne virus på samme måte
30 som de fleste vira har protein inkludert i strukturen er viral-proteinet ikke sterkt immunogent i de fleste mennesker slik at kun ca. 50% av smittede mennesker produserer antistoffer mot denne virus. Mangelen på immunrespons på
35 denne virus hos mange mennesker betyr at virusen kan forbli i de infiserte mennesker i det minste flere år og denne tilbakebliven av viruset i de smittede individer forårsaker

163778

20

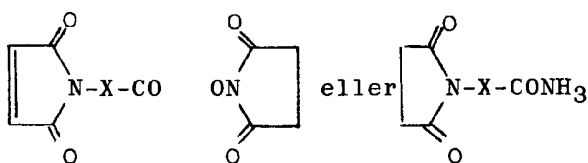
ikke bare at disse lider under tilbakevendende angrep av smertefulle symptomer som forårsakes av denne virus men også gjør dem til langtidsbærere av virusen. Virusens standhaftighet i infiserte dyr er en av de faktorer som i sterk grad er ansvarlig for de epidemiske tilstander herpes simplexinfeksjoner har ført til i flere land. Ved å fremstille et antigen avledet fra et protein med en sekvens lik den til i det minste en del av sekvensen av et herpes simplex viralprotein, er det mulig å stimulere human immunsystemet for å gjøre det i stand til å fremstille større mengder antistoffer mot herpes simplex-virus. Ikke bare ville denne stimulering av immunsystemet redusere opptredenen av symptomer forbundet med herpes simplexinfeksjon, men vil også understøtte kontroll av virusens utbredning. På samme måte kan immunresponsen hos mennesker og andre dyr mot vira slik som forkjølelse, influensa eller andre, økes ved å fremstille modifiserte antigener basert på peptider med frekvenser tilsvarende viralproteinene i egnede vira. Hvis, slik det ser ut til, en virus er ansvarlig for ervervet immundefekt-syndrom, AIDS, kan et modifisert antigen også benyttes for å gi immunitet mot denne sykdom.

Generelt er metodene som benyttes for fremstilling av antigener basert på ikke-endogene stoffer slik som viralproteiner eller peptider tilsvarende deler derav, de samme som de som benyttes for å modifisere endogene proteiner eller fragmenter derav, slik som nevnt i det tidligere nevnte US-PS 4 302 386. Imidlertid skal det være klart at de foretrukne metoder som benyttes for å modifisere ikke-endogene stoffer kan variere i visse henseende fra de som benyttes for å modifisere endogene peptider. Fordi det ikke-endogene peptid generelt vil fremtvinge i det minste en begrenset immunrespons fra dyret hvor til antigenet gis, vil kravene for modifisering av de ikke-endogene protein eller peptid for å fremstille et antigen ha en tendens til å være mindre stringent enn de for modifisering av et endogent og helt ikke-immunogent protein eller peptid. Fordi imidlertid det

ikke-endogene protein eller peptid modifiseres for å øke den immunogene virkning i dyret hvor til det gis, vil det generelt være ønskelig at bæreren som benyttes for å modifisere det ikke-endogene protein eller peptid (hvis kjemiske modifisering skal gjennomføres ved kobling av det ikke-endogene protein eller peptid til en bærer i stedet for å danne et lineært polymert polypeptid) for å gi antigenet et stoff som i seg selv fremtvinger en sterk respons fra dyrets immunsystem. For eksempel kan bæreren være et bakterielt toksid slik som difteritoksid eller tetanus-toksid.

Antigenene som fremstilles ifølge oppfinnelsen fremstilles ved kjemisk å modifisere et protein som ikke er endogent eller immunogent mot dyret som behandles, eller et peptid med en sekvens tilsvarende i det minste delvis sekvensen til proteinet idet denne kjemiske modifisering gjennomføres utenfor dyrets legeme. Den kjemiske modifisering kan gjennomføres ved å koble protein eller peptidet til en bærer, ved polymerisering av peptidet for å danne et lineært polymert polypeptid eller ved en hvilken som helst annen modifiseringsteknikk som gjør proteinet eller peptidet tilstrekkelig immunogent. Foretrukne teknikker for kjemisk modifisering av protein eller peptid ved kobling til en bærer inkluderer de følgende (ytterligere detaljer for optimering av teknikker for hver av de følgende koblingsreaksjoner er beskrevet i det ovenfor nevnte US-PS 4 302 386):

a. Behandling av et protein eller peptid med en sulfhydryl-gruppe derpå med en aktivator med strukturen:



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

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

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

d. Behandling av et protein eller peptid som ikke har sulfhydrylgruppe men som har en aminogruppe, med en aktivator til stede som en aktiv ester av klor-, diklor-,

brom- eller jodeddiksyre, og behandling av den resulterende halogenmetyl-alkyleringsgruppeholdige del med en sulfhydrylgruppeholdig bærer som biologisk er fremmed for dyret som skal behandles for derved å omsette sulfhydrylgruppen i bæreren med halogenmetylalkyleringsgruppen.

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

Det er velkjent for fagmannen at i mange naturlige proteiner inneholdende cysteinrester, er disse rester ikke til stede i deres tioform inneholdende en fri SH-gruppe; i stedet er par av cysteinrester innrettet ved hjelp av disulfidbroer for å danne cystein. Slike disulfidbroer er meget viktige med henblikk på å bestemme proteinets konformasjon. I de fleste tilfeller blir disulfidbroene som er til stede i naturlig form av proteinet lett redusert til par av SH-grupper ved hjelp av milde reduksjonsmidler under tilstander som etterlater de resterende deler av proteinmolekylet uendret. Når det er ønskelig å fremstille frie SH-grupper i proteinene for å gjennomføre koblingsreaksjonen som er beskrevet ovenfor, er i henhold til dette en hensiktsmessig måte å oppnå slike frie SH-grupper på, å spalte disulfidbroer som naturlig er til stede i proteinet eller et annet polypeptid som det er ønskelig å koble.

Dannelse av fri SH ved reduksjon av disulfidbroer i naturlig opptredende former av proteiner kan også bevirke tverraktivitet for antistoffene som dannes når et modifisert polypeptid, fremstilt fra proteinet, injiseres i et dyr. Hyppig erkjenner et antistoff sitt tilsvarende antigen ikke kun ved aminosyresekvensen i antigenet men også ved konformasjonen (formen) på antigenet. I henhold til dette kan et antistoff som binder meget sterkt til dette protein eller annet polypeptid i sin naturlige konformasjon, binde meget mindre sterkt, hvis overhodet, til det samme protein eller poly-

163778

24

peptid hvis konformasjon plastisk er endret ved oppbryting av disulfidbroene. I henhold til dette kan oppbryting av disulfidbroer i proteiner eller andre polypeptider være en basis for å redusere tverraktiviteten mellom antistoffer til antigener med den samme aminosyresekvens langs endel av molekylet.

Kjemisk modifiserte antigener kan avledes fra zona pellucida eller spermaantigen, eller peptider med en sekvens tilsvarende i det minste endel av sekvensen for en slik zona pellucida eller sperma antigen. Disse modifiserte antigener er brukbare for fertilitetskontroll. Det er kjent at antigener fra zona pellucida (det ytre hylster av egget) når det injiseres i hunnprimater gir antistoffer med antifertiliserings effekter inkludert forhindring av spermafesting til en gjennomtrengning av zona pellucida av det ikke-befruktede egg, og forhindre dispergering av zona pellucida i det befruktede egg før innplantering (slik dispergering av zona er åpenbart et vesentlig krav for innplantering). Se til dette W.R. Jones, "Immunological Fertility Regulation" sidene 160 og følgende. Slike antifertiliserings virkninger antas å skyldes dannelse av et antistoff antigenpresipitat på zona idet dette gjør zona ute av stand til å undergå den vanlige spermabindende reaksjon og gjør også zona ufølsom for virkning av de proteaser som vanligvis er ansvarlige for dispergering av zona.

En antifertiliseringsvaksine basert på zona antigen er spesielt attraktiv fordi zonaantigenet synes å være relativt fritt for bivirkninger på andre vev og fordi det er utviklet metoder for å fremstille svinezonaantigen i store mengder; svine- og human zonaantigen viser meget god tverraktivitet. Som, når det gjelder antifertiliseringsvaksiner basert på β -HCG-antigenet diskutert ovenfor og i det tidligere nevnte US-PS 4 302 386, vil bedre resultater oppnås ved å modifisere et zonaantigen eller et fragment derav for å gi et modifisert antigen.

Flere antigener, spesielt spermaenzymer, kjent å foreligge i sperma, kan benyttes i de modifiserte antigener, se W.R. Jones, op.cit., side 133 og følgende. Det mest lovende slike antigen er den laktathydrogenase som er kjent som LDH-C4 eller LDH-X. Selv om selvfølgelig laktatdehydrogenaser er til stede i andre vev er LDH-C4 distinkt fra andre laktatdehydrogenase isoenzymer og synes å være spermaspesifikk. Videre er enzymet ikke av sterk spesifikk art, og metoder for dets isolering og rensing er kjent. Også her vil de beste resultater oppnås ved modifisering LDH-C4 eller et fragment derav for å fremstille et modifisert polypeptid. Flere naturlige peptidfragmenter av LDH-C4 er fremstilt, sekvensert og påvist å binde til antistoffer mot opphavet. (Se E. Goldberg, "LDH-X as a sperm-specific antigen" i T. Wegmann og T.J. Gill (eds.), "Reproductive Immunology", Oxford University Press, 1981).

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

Teknikkene som benyttes for kjemisk modifisering av zona pellucida eller spermaantigener, eller peptidet avledet derfra, for å danne de modifiserte antigener, inkluderer alle de teknikker som er skrevet i det tidligere nevnte US-PS 4 302 386 og også de ovenfor beskrevne teknikker. Således kan antigenet eller peptidet kobles til en bærer som et tetanustoksid eller difteritoksid, eller kan polymeriseres for å

163778

26

danne et lineært polymert polypeptid ifølge oppfinnelsen. De foretrukne teknikker for å danne slike lineære polymere polypeptider er allerede diskutert ovenfor mens de foretrukne teknikker for kobling av antistoffer eller peptidene til bærere er de samme som de for kobling av ikke-endogene proteiner eller peptider, som allerede beskrevet ovenfor.

En vaksine vil inneholdende et modifisert polypeptid, antigen eller modifisert antigen og en bærer omfattende en blanding av mannidmonooleat med squalan i og/eller squalen. Det er funnet at denne bærer har virkningen av å øke mengden antistoffer som fremtvinges av det lineære polymere peptid, antigen eller modifiserte antigen når vaksinen administreres til et dyr. For ytterligere å øke mengden av antistoffer som dannes ved administrering av vaksinen, er det fordelaktig i denne og innarbeide et immunologisk hjelpestoff. Uttrykket "hjelpestoff" benyttes i sin normale betydning for fagmannen på det immunologiske område, nemlig som et stoff som forhøyer den totale immunrespons i dyret, hvor til vaksinen administreres, det vil si at hjelpestoffet er en ikke spesifikk immunostimulator. Foretrukne hjelpestoffer er muramyl-dipeptider, spesielt:

N_{Ae}-nor Mur-L.Ala-D.isoGln;

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

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

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

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

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

Eksempel

Fragment A beskrevet ovenfor (et fragment med en aminosyreskvens tilsvarende 105-145 sekvensen i β -HCG, med en cysteinrest festet til C-terminalen) ble polymerisert for å oppnå en heksamer. En første andel av fragment A hadde både sine tiolgrupper (på det ikketerminale cystein i posisjonen tilsvarende 110 posisjonen i β -HCG, og på sitt C-terminal cystein) og sin ikke-terminale aminogruppe (på lysinresten i posisjonen tilsvarende posisjon 122 i β -HCG) blokkert. Denne blokkerte form av fragment A ble omsatt med den bifunksjonelle organiske koblingsreagens (eller aminogruppeaktiverende middel) MCS i en bufret vandig oppløsning ved pH 6,6 for derved å omsette esterdelen MCVS med N-terminalaminogruppen i den første porsjon av fragment A. Det resulterende produktet ble så omsatt med en andre andel fragment A som ble benyttet i samme form som den første andel av fragment A bortsett fra at C-terminalcysteinet var en ublokkert tiolgruppe, for derved å omsette den gjenværende funksjonelle gruppe av MCS med den frie tiolgruppe på den andre andel av fragment A og således produsere en dimer der N-terminalen av den første andel av fragment A ble koblet til C-terminalen av den andre del av fragment A via en MCS-rest. Denne dimer ble

163778

28

så rensset ved gelfiltrering. Polymeriseringen ble så gjentatt på samme måte inntil det var fremstilt en heksamere av fragment A. På grunn av at rensingen som fulgte hvert polymeriseringstrinn ble gjennomført ved gelfiltrering i stedet for ved omvendt-fase høytrykksvæskrokromatografi var heksameren utvilsomt noe uren og forurenset av spor av pentamer, tetramer og så videre, slik at resultatene i dyreprøvene som beskrevet nedenfor ikke kunne forventes så gode som ved fremstilling av en ren heksamere.

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

TABELL

<u>Uker etter første injeksjon</u>	<u>Antistoffkonsentrasjon mol/liter x 10⁻¹⁰</u>
3	5 (2-7)
4	18 (13-22)
5	30 (21-39)
6	45 (30-60)
7	58 (32-83)
8	61 (34-86)
9	77 (50-108)
10	110 (53-125)
11	100 (50-125)
12	79 (30-119)
13	53 (22-83)

163778

29

De ovenfor angitte resultater viser at selv den urene heksamer som ble benyttet i disse forsøk var meget mer sterkt immunogen enn de meget svake immunogene fragmenter hvorfra de ble oppnådd.

5

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for fremstilling av et lineært, polymert polypeptid, som i et dyrs legeme fremtvinger dannelsen av antistoffer mot human korionisk gonadotropin, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

10 a. å behandle en første mengde av et utgangspeptid med en molekylstruktur tilsvarende et fragment av human korionisk gonadotropin og med en fri aminogruppe og minst en fri tiolgruppe, med minst ett tiolblokkerende middel, for derved å blokkere tiolgruppen på det første peptid og etterlate kun en enkelt fri aminogruppe;

15 b. å omsette det blokkerte første peptid med et ikke-aminosyrebifunksjonelt koblingsmiddel, fortrinnsvis 6-maleimido-kapronacyl-N-hydroksysuccinimidester, med en funksjonell gruppe i stand til reaksjon med en fri aminogruppe og en andre funksjonell gruppe i stand til reaksjon med en fri tiolgruppe for derved å forårsake at 20 en av de funksjonelle grupper i koblingsmidlet reagerer med den frie aminogruppe på peptidet mens den andre funksjonelle gruppe på koblingsmidlet forblir uomsatt;

25 c. behandling av en andre mengde utgangspeptid med minst ett blokkerende middel for derved å gi et peptid i en form som kun har en enkelt fri tiolgruppe, idet dette ene sete befinner seg på eller ved siden av en av utgangspeptidets termini;

30 d. omsetning av produktet fra trinn (b) med det blokkerte peptid fra trinn (c) for derved å gi et dimert peptid der de to utgangspeptider er interforbundet via en rest av koblingsmidlet;

35 e. hvis nødvendig, omsetning av det resulterende dimerpeptid med minst ett blokkerende middel, for derved å blokkere tiolgruppene på det dimere peptid og kun etterlate en enkelt fri aminogruppe, idet denne aminogruppe befinner seg ved eller ved siden av en av det dimere peptids termini, og omsetning av det blokkerte dimere peptid med

- det bifunksjonelle koblingsmiddel med en funksjonell gruppe i stand til å reagere med en fri aminogruppe og en andre funksjonelle gruppe i stand til å reagere med en fri tiolgruppe, for derved å bringe en av de funksjonelle grupper i koblingsmidlet til omsetning med den frie aminogruppe på det dimere peptid, mens den andre funksjonelle gruppen i koblingsmidlet forblir uomsatt;
- 5
- f. behandling av en ytterligere mengde av utgangspeptidet med minst ett blokkeringsmiddel for derved å gi peptidet i en form med kun en enkelt fri tiolgruppe i det reaksjonssete er på eller ved siden av en av utgangspeptidets termini;
- 10
- g. omsetning av produkter fra trinn (e) med det blokkerte peptid fra trinn (f) for derved å bringe den andre funksjonelle gruppe i koblingsmidlet til å reagere med den frie tiolgruppe og å danne et polymerpeptid der de tre peptider er interforbundet via rester av koblingsmidlet;
- 15
- h. å gjenta trinnene (e) til (g) inntil den ønskede lengde er oppnådd.

20

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at det anvendes fragmenter der minst ett har en aminosyresekvens tilsvarende av C-terminalsekvensen til β -subenheten av human korionisk gonadotropin idet det omfatter

25

fra 20 til 45 aminosyrerester.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, karakterisert ved at det anvendes forbindelser der minst ett av fragmentene har aminosyresekvensen til

30

Fragment (A):

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

163778

32

Fragment (B):

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

5

Struktur (II):

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

10

Struktur (III):

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

15

Struktur (IV):

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

20

Struktur (V):

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

Struktur (VI):

25

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

Struktur (VII):

30

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

Struktur (VIII):

35

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

Struktur (VIIIa):

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

5

Struktur (IX):

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

10

Struktur (X):

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

15

Struktur (XI):

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

20

Struktur (XII):

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

25

Struktur (XIII):

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

30

Struktur (XIV):

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

35