
Octrooiraad



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **7906183**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Graspollen antigeen en werkwijze voor het wijzigen van de antigene eigenschappen van een graspollen antigeen.**
- ⑤1 Int.Cl.³: A61K39/36.
- ⑦1 Aanvrager: Research Corporation te New York.
- ⑦4 Gem.: Ir. C.M.R. Davidson c.s.
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuiperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 7906183.
- ②2 Ingediend 14 augustus 1979.
- ③2 Voorrang vanaf 15 augustus 1978.
- ③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 933907 .
- ②3 --
- ⑥1 --
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 19 februari 1980.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

RESEARCH CORPORATION, New York, New York, Ver.St.v.Amerika.

Graspollen antigeen en werkwijze voor het wijzigen van de antigene eigenschappen van een graspollen antigeen.

Onderzoekingen hebben kortgeleden geleid tot het karakteriseren van de antigene determinant van antigeen B van Timotheegraspollen. Het antigeen is opgebouwd uit een flavanoïde pigment quercitine, een disaccharide cellobiose en een polypeptide "staart". Antigeen B is de soortnaam voor mengsels, die twee of meer antigeen fragmenten bevatten, die gewoonlijk met antigeen D, D₁, D₂, D₃, enz. worden aangeduid. Zij verschillen onderling in de lengte van de polypeptide "staart". In antigeen D₃ bestaat de "staart" uit een enkel aminozuur, namelijk threonine. Zie Malley cs. in Dev.Biol. Stand. (1975), 29 (Int.WHO-IABS, Symp.Stand. Control Allergens Adm.Man, (1974)), 29-40; Kramer-Kleinert cs. in Dev. Biol.,Stand. (1975), 29 (Int. WHO-IABS, Symp.Stand.Control Allergens Adm. Man, (1974)), 188-96; Malley cs. Immunochemistry (1975) 12, 551-554; Malley cs. Journal of Allergy 43 (nr. 2) Februari 1969, 59-64; Gerard cs. Immunochemistry 12 (1975) 545-9; Malley cs. Journal of Immunology 99 (nr. 4) (1967) 825-830; Sanders son cs. Immunology 20 (1971), 1061-1065 en Axen cs. Nature 214 (1967), 1302-1304.

In de Amerikaanse Octrooiaanvraag 731.414 van 12 oktober 1976 is beschreven dat de verschillende antigeen D fragmenten, die door de vrije carboxylgroep van threonine aan verschillende proteïnen of peptiden gekoppeld zijn, in belangrijke mate het vrijkomen van histamine uit gesensibiliseerd weefsel inleiden. Voorts wordt echter vermeld, dat deze zelfde antigeen D fragmenten indien ze via het suikergedeelte aan verschillende proteïnen en peptiden zijn gekoppeld, aanleiding geven tot een van de dosis afhankelijke afremming van het vrijkomen van histamine uit gesensibiliseerd weefsel.

Deze onderzoekingen doen in sterke mate veronderstellen dat quercitine het grootste deel van de antigene determinant van antigeen B vertegenwoordigt.

Antigeen B en de verschillende fragmenten ervan kunnen

7906183

worden voorgesteld met de structuurformule van het formuleblad, waarin G glucose en T threonine of een peptide, dat via het threoninemolekuul aan genoemde structuur gebonden is, voorstelt.

Antigeen D₁ heeft genoemde structuur, waarin de peptide-
staart zodanig is, dat het molekulairgewicht circa 5000 bedraagt. Anti-
geen D₂ heeft een molekulairgewicht van ongeveer 2500. In antigeen D₃ is
T alleen threonine.

Het quercitinegedeelte van de antigeenstructuur is via een
etherbinding door middel van OH-groepen aan de betreffende molekulen aan
de glucosegedeelten gebonden. De threoninebinding aan het glucosegedeelte
is eveneens een etherbinding via een OH-groep aan het cellobiosegedeelte
en de OH-groep van threonine.

De aard van de allergische reactie of response bij mensen
en dieren is niet geheel duidelijk. Volgens een theorie is er bij de al-
lergische response ten opzichte van een vreemd antigeen, zoals het anti-
geen van graspollen, sprake van de wisselwerking van tenminste twee ver-
schillende celtypen. Een hiervan wordt gewoonlijk met T-cel of Thymus
afgeleid lymphocyte genoemd en de tweede een B-cel, dat wil zeggen een
van beenmerg afkomstig lymphocyte. Elk van deze twee cellen, de T en de
B lymphocyten, vertegenwoordigen verschillende delen van het proteïne,
dat de allergische response veroorzaakt. Het B-lymphocyte vertegenwoor-
digt de antigene determinant, terwijl de T-lymphocyte een ander deel van
het proteïne vertegenwoordigt, dat drager determinant wordt genoemd. Om
te bereiken dat de immune response, waarvan bij allergische ziekten sprake
is, wordt onderdrukt, kan het probleem worden aangepakt voor het ont-
staan van antilichaam te onderdrukken door differentiatie van B-cel te
blokkeren of door de T-cel populatie te beïnvloeden. Het B-lymphocyte
vormt in feite het antilichaam. T-cellen vormen niet het circulerende an-
tilichaam, waarvan bij allergische ziekten sprake is, maar regelt de pro-
duktie ervan. Een subpopulatie van T-cellen, die het maken van antilicha-
men ondersteunt, zijn de zogenoemde hulp T-cellen. Zij werken effectief
met het B-lymphocyte samen of hebben een wisselwerking ermee, zodat an-
tilichamen ontstaan. Een andere subpopulatie van T-cellen, de "suppressor"
T-cel of T₂-cel, onderdrukt op effectieve wijze de werking van hulp T-
cellen, waardoor zij niet met B-lymphocyten kunnen deelnemen en anti-

7906183

lichamen vormen.

De uitvinding heeft ten doel om een werkwijze te verschaffen voor het wijzigen van de antigene eigenschappen van Timothee-grasantigeen B en/of de verschillende fragmenten ervan, zodat een produkt wordt verkregen, dat geen antigene eigenschappen bezit maar in staat is om T-cellen te aktiveren.

De uitvinding berust op de ontdekking, dat het quercitinegedeelte van graspollen antigeen met de structuur formule van het formuleblad, waarin G glucose voorstelt en T threonine of een peptide, dat aan de structuur is gebonden via een threoninemolekuul, aan oxydatieve omstandigheden wordt blootgesteld, zodat de dihydroxy aromatische ringen van het quercitinegedeelte worden gehergroepeerd en ringsplitsing ondergaan, zodat een produkt ontstaat, dat nagenoeg geen antigene eigenschappen bezit, maar in staat is om T-cellen te aktiveren en T_2 -cellen te induceren.

Fig. 1 tot en met 4 zijn grafische voorstellingen van de antigene eigenschappen van het via oxydatie gemodificeerde antigeen van de uitvinding.

De werkwijze van de uitvinding kan worden toegepast op elk quercitinegedeelte, dat antigeen of antigeenfragment, zoals antigeen B, antigeen D, antigeen D_1 , D_2 , D_3 , enz. bevat.

Met de werkwijze ontstaat een gemodificeerd antigeen, dat tot een preparaat in de vorm van een eenheidsdosis kan worden verwerkt, zodat een immunotherapeutisch preparaat ontstaat voor het afremmen van allergische reacties bij mensen en dieren, die voor genoemde antigenen gevoelig zijn.

Het is bekend, dat hydroxy aromatische ringen onder invloed van oxydatie splitsen en vervolgens worden gehergroepeerd, al naar gelang van de reactieomstandigheden. Het is ook bekend, dat bepaalde oxydaties op verschillende manieren invloed op allerlei aminozuren hebben. Het is bekend dat tyrosine en methionine in de polypeptide "staart" van antigeen B of D aanwezig zijn. Voorts is bekend, dat oxydatieve omstandigheden, die voldoende sterk zijn om ringsplitsing in het quercitinegedeelte te bewerkstelligen ook invloed zullen hebben op het gehalte aan tyrosine en methionine van de polypeptide "staart". Het is echter gebleken, dat modificatie van deze twee resten en een minimum aan andere aminozuur-

7906183

resten, aanwezig in de staart, geen invloed zullen hebben op het vermogen van het gemodificeerde antigeen om actieve T-cellen te induceren.

Bij elke oxydatieve reactie, waarbij hergroepering en ringsplitsing van de hydroxy aromatische ringen van het quercitinegedeelte mogelijk zijn, terwijl de polypeptide "staart" geen belangrijke modificatie ondergaat, zal een produkt ontstaan, dat nagenoeg geen antigene eigenschappen heeft, maar zijn vermogen heeft behouden om T-cellen te activeren en T_s-cellen te induceren.

Splitsing van de hydroxy aromatische ringen door fotooxydatie is zeer effectief gebleken voor het bereiden van het gemodificeerde antigeen van de uitvinding. Het zal duidelijk zijn, dat de oxydatiesnelheid en de aangetaste resten afhankelijk zijn van veel variabelen, waaronder de pH, concentratie van het fotosensibiliseermiddel, de grootte van het vat en de intensiteit en duur van het aan licht blootstellen van het monster.

Het zal echter duidelijk zijn, dat elke oxydatiemethode, waarbij hergroepering en splitsing van de hydroxyd aromatische ringen van quercitine in het antigeen of fragmenten ervan het gevolg zijn, terwijl een aanzienlijke modificatie van de peptide staart wordt vermeden, volgens de uitvinding kan worden gebruikt.

Zo kunnen chloramine-T (natrium-p-tolueensulfonchlooramine), lactoperoxydase en kaliumpermanganaat ook doelmatig worden gebruikt als oxydatiemiddelen voor het modificeren van het quercitinegedeelte van het antigeen of de antigeenfragmenten.

Voorbeeld I

Timothy pollenextract (WST) en gezuiverd antigeen B, AgB werden volgens Malley cs. (J.Immunolog. 99 (1967), 825 bereid. De proteïneconcentratie van deze antigeenpreparaten werd door nesslerisatie (zie Campbell cs., Methods in Immunology, uitgegeven bij W A. Benjamin, N.Y. (1963), blz. 53) bepaald.

Het AgB werd met 8 molair ureum behandeld, zoals door Takatsu en Ishizaka in Cell Immunol. 20 (1975), 276 is beschreven; dat wil zeggen, dat 2 gram ureum werd toegevoegd aan 2,5 ml van een 1%-ige oplossing van AgB in 0,1 molaire Tris-HCl buffer (pH 8,0). Na een incubatietijd van 18 uur bij kamertemperatuur werd de proteïneoplossing tegen

7906183

fosfaat gebufferde zoutoplossing gedialyseerd, weer op zijn oorspronkelijke volume gebracht (2,5 ml) door negatieve druk en op zijn aktiviteit tot reagine binding onderzocht door de radioallergosorbens (RAST) inhibitiemethode.

5 Fotooxydatie van antigeen B

3 Mg AgB (0,4 ml) en 2 ml 0,2 molaire fosfaatbuffer (pH 9) werden in 10 ml serumflesjes overgebracht. De flesjes werden met aluminiumfoelie afgedekt, zodat geen licht kon binnenkomen. In elk flesje werd 0,5 ml methyleenblauw gefotosensibiliseerde 0,2 mg/ml in 0,2 molaire fosfaatbuffer (pH 9) overgebracht en het reaktiemengsel werd met $\emptyset$ verzadigd, doordat het gas 8-10 minuten zachtborrelend in de oplossing werd geleid. De serumflesjes werden onmiddellijk met een stop afgesloten en 30 minuten bij 37°C geïncubeerd. Het aluminiumfoelie werd van de flesjes verwijderd en de inhoud van de flesjes werd aan twee 150 Watt lampen, die op 3,8 cm van de flesjes waren opgesteld, gedurende wisselende perioden bij 37°C blootgesteld. De monsters werden uit de flesjes verwijderd en tegen gedestilleerd water in Spectropor membranen (poriegrootte 6000-8000 molekulairegewicht) (spectrum Medical Industries, Inc. Los Angeles, California) 48 uur gedialyseerd.

20 Aminozuur analyse

Monsters van 2 mg AgB en gefotooxydeerd antigeen B (/X-AgB) (0,5 uur, 1 uur en 2 uur fotooxydatie) werden in Pyrex digestiebuizen (13 x 100 mm) tot droog gelyophyliseerd. Elk monster werd in 5,7 Normaal HCl weer gesuspenderd en met stikstofgas behandeld; het gas werd 10 minuten in elke buis geleid; daarna werd elke buis door een zuurstoffakkel gesloten en 20 uur tot 110°C verhit. De aminozuuranalyse van elk monster werd volgens Spackman cs. (Anal.Chem. 30 (1958), 1190) met een aminozuuranalyseerapparaat volgens Beckman, model 120 C uitgevoerd. Het tryptophangehalte werd volgens Speis en Chambers (Anal.Chem. 21 (1949), 1249) bepaald. De resultaten staan in tabel A.

7906183

Tabel A

Effekt van fotooxydatie op de aminozuursamenstelling van antigeen B

<u>Aminozuurrest</u>	<u>Natief AgB^a</u>	<u>OX-AgB</u>		
		<u>0,5 uur</u>	<u>1 uur</u>	<u>2 uur</u>
Aspartinezuur	7	7	7	7
Glutaminezuur	8	8	8	8
Threonine	5	5	5	5
Serine	4	4	4	4
Proline	4	4	4	4
Glycine	3	3	3	3
Alanine	14	14	14	14
Valine	5	5	5	5
Methionine	1	0,5	spoor	spoor
Isoleucine	2	2	2	2
Leucine	4	4	4	4
fenylalanine	3	3	3	3
tyrosine	2	0	0	0
tryptofaan	6	3	3	3
lysine	6	6	6	6
histidine	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
totaal aantal				
resten	75	69,5	69	69

a: cijfers stellen $\frac{\text{umolen aminozuur}}{\text{mol proteïne}}$ voor en zijn tot het dichtsbijzijnde gehele getal afgerond.

7906183

Antisera

Konijnen anti-WST serum, bereid zoals al is beschreven (Malley cs. zie hierboven (1967)), bevatte 1,1 mg antilichaam proteïne/ml tegen AgB. Menselijk reagine serum, gericht tegen Timothy pollen antigenen, werd van 50 patiënten verkregen en bij elkaar gevoegd (van elk 5 ml). Dit mengsel had een Prausnitz-Kuestner (P-K) titer 1:2500.

Precipitatieanalyse

Konijnen anti-WST serum (0,5 ml) werd toegevoegd aan 0,5 ml of OX-AgB met wisselende concentraties (0,03-1mg proteïne). De mengsels werden bij 37°C 30 minuten en bij 4°C 48 uur geïncubeerd. De neerslagen werden drie maal met 0,01 molaire cacodyline zoutoplossing buffer (pH 7) uitgewassen en aan de lucht gedroogd; de gedroogde precipitaten werden volgens Campbell cs. (zie boven, blz. 136) gekwantificeerd. Het proteïnegehalte van elk neerslag werd door nesslerizatie (zie Campbell cs. hierboven, blz. 53) bepaald. De resultaten zijn in fig. 1 weergegeven. De opgegeven waarden zijn het gemiddelde van duplobepalingen.

Passieve overdrachtsproeven

Verdund bijeengevoegd serum (0,1 ml) werd op verschillende plaatsen van de huid van een niet-allergische vrijwilliger intradermaal gespoten en 48 uur later werd elke plaats blootgesteld aan 0,025 ml AgB (0,1 µg proteïne/ml). De reacties werden 30 minuten later afgelezen en als volgt ingedeeld; negatief -; 5-10 mm kring +; 10-15 mm kring 2+; 15-20 mm kring 3+ en meer dan 20 mm kring 4+. De resultaten staan in tabel B.

Tabel B

Passieve overdrachtsreactiviteit van natief en gefotoöxydeerd antigeen B met een mengsel van menselijk anti-timothy sera

Antigeen	Proteïne-concentratie (µg/ml)	P-K reacties ^a				
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1000
AgB	0,1	4+	4+	3+	3+	2+
OX-AgB ^b	10,0	-	-	-	-	-

a: Een serummengsel afkomstig van 50 voor Timothy graspollen gevoelige mensen werd in deze proeven gebruikt; de gemiddelde P-K titer van dit serum was 1:2500. Verdund serum (0,1 ml) werd op verschillende plaatsen in-

7906183

tradermaal in de huid van een niet-allergische vrijwilliger ingespoten. Elke plaats werd aan 0,025 ml antigeen 48 uur later blootgesteld.

b: de 1 uur en 2 uur monsters.

Radioallergosorbens inhibitie

5 2 Gram ronde stukken Whatman 3 MM papier (diameter 3 mm) werden met CNBr volgens March cs. (Anal.Biochem. 60 (1974), 149) geaktiveerd. De geaktiveerde ronde stukken werden op een gesinterd glas filter met 500 ml koude 0,1 molaire NaHCO_3 -zoutoplossing buffer (pH 9) uitgewassen en de vochtige stukken werden aan 30 ml van een WST-oplossing
10 (1 mg proteïne/ml) in 0,1 molaire NaHCO_3 -zoutoplossing buffer (pH 9) toegevoegd. Dit mengsel werd bij 4°C 36 uur geroerd en met telkens 500 ml van de volgende koude reagentia uitgewassen: 0,2 molaire Na_2CO_3 , 2 molaire ureum, 0,2 molaire NaAc en 0,1 molaire met fosfaat gebufferde zoutoplossing (pH 7,2). De met WST bedekte ronde stukken papier werden bij 4°C in
15 met fosfaat gebufferde zoutoplossing bewaard, totdat zij werden gebruikt.

0,1 Ml menselijk reagine serum (1:37,5 verdund, P-K titer 10.000) afkomstig van een voor Timothy gevoelige patiënt werd bij 37°C 45 minuten met 0,1 ml AgB of OX-AgB met wisselende concentraties (0,5-20 μg proteïne) geïncubeerd. De met WST bedekte papierschijven werden drooggedept en 1 schijf werd bij elk mengsel voorafgeïncubeerd reagine
20 gevoegd. Na een incubatietijd van 6 uur bij kamertemperatuur werd elke schijf drie maal (3 x 5 ml) uitgewassen en aan elke schijf werd 5000-8000 cpm ^{125}I -anti-IgE toegevoegd. De mengsels werden bij 4°C 16 uur geïncubeerd. De met WST bedekte schijven werden vier maal (4 x 5 ml) met
25 RAST-buffer uitgewassen en met een Packard scintillatiesteller (Packard Instrument Company, Inc., Downers Grove, Ill.) geteld 20-30 Procent van het toegevoegde ^{125}I -anti-IgE werd aan schijven gebonden, toen het reagentserum vooraf met normaal menselijk serum werd geïncubeerd. Het percentage inhibitie, dat met AgB en OX-AgB werd bereikt, werd met onderstaande vergelijking verkregen:
30

$$\% \text{ Inhibitie} = \left(1 - \frac{\text{RAST tellingen met toegevoegde fraktie}}{\text{RAST tellingen zonder fraktie}} \right) \times 100$$

De resultaten staan in fig. 2 weergegeven. De vermelde waarden zijn het gemiddelde van duplobepalingen.

7906183

Immunisaties

LAF₁ muizen (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) werden met WST geïmmuniseerd, zoals al is beschreven (Fairchild cs. J. Immunol. 115 (1875) 446). De immunogeniciteit van OX-AgB werd onderzocht door im-munisatie van LAF₁ muizen met OX-AgB (10-100 µg), dat aan aluminiumhydroxyde was geadsorbeerd (Levine cs. Int.Arch.Allergy 39 (1970) 156). Met wekelijkse tussenpozen werden gedurende 2 weken dieren met OX-AgB geïmmuniseerd waarna zij 3 weken later opnieuw met OX-AgB werden behandeld. Bloedmonsters werden 7 dagen na de eerste injectie 7, 10 en 14 dagen na de tweede injecties en 7, 10 en 14 dagen na de laatste injecties met OX-AgB verzameld. De serum IgG₁ en IgE titers van geïmmuniseerde muizen werden door passieve huidanaphylaxis bepaald, zoals al is beschreven (Fairchild cs., zie hierboven). De resultaten zijn in fig. 3 weergegeven. De opgegeven titers zijn het gemiddelde bij tenminste 2 dieren bij een serummengsel afkomstig van tenminste 5 muizen. De pijlen geven aan, toen de muizen met AgB of OX-AgB werden geïmmuniseerd.

Fotoöxydatie zette het geel gepigmenteerde AgB in een kleurloos materiaal om, waarbij de optische dichtheid bij 280 nm dienovereenkomstig afnam. Bij vergelijking van de aminozuursamenstelling van AgB en verscheidene OX-AgB monsters (tabel A) blijkt een volledige vermindering in het tyrosinegehalte van OX-AgB en een afname in het gehalte aan methionine en tryptophan; de andere aminozuren bleven echter naar verhouding onveranderd, een feit, dat dees veronderstellen, dat de polypeptidestructuur van AgB door fotoöxydatie niet sterk werd veranderd.

Het effect van fotoöxydatie op de antigene determinanten van AgB werd onderzocht door AgB en OX-AgB te vergelijken ten aanzien van hun vermogen om (1) konijnen antilichaam tegen AgB neer te slaan, (2) om P-K reakties op te wekken in de huid van een niet-allergisch individu, dat met IgE-houdend serum, afkomstig van voor Timothy gevoelige patiënten, passief was gesensibiliseerd en (3) om specifieke IgE aan met WST bedekte papieren schijven in de RAST-bepaling af te remmen.

Konijnen anti-Timothy serum, dat 1,1 mg antilichaam proteïne/ml tegen AgB bevatte, gaf geen precipiteerbaar antilichaam met OX-AgB (0,5 uur, 1 uur en 2 uur monsters) (zie fig. 1)

Uit tabel B blijkt, dat AgB (2,5 mg) zelfs bij een 1:1000

7906183

verduunning van het reaginmengsel sterke P-K reacties opwekte. Een concentratie van OX-AgB (1 uur en 2 uur monsters), die 100 maal zo groot (250 ng) als de AgB-concentratie was, deed daarentegen in de huid van de niet-allergische vrijwilliger geen allergische huidreacties ontstaan.

Het vermogen met OX-AgB om het binden van ^{125}I -anti-IgE met Timothy reagine af te remmen werd verder onderzocht door de AgB en OX-AgB bindingsafremming in een RAST-onderzoek naar Timothy reagine antilichamen te vergelijken (zie fig. 2). In deze onderzoeken gaf AgB een lineaire, van de dosis afhankelijke afremming van ^{125}I -anti-IgE binding aan IgE-gebonden, met WST bedekte papieren schijven, maar OX-AgB (1 uur en 2 uur monsters) remden zelfs bij een concentratie van 20 μg de ^{125}I -anti-IgE binding niet af. Met ureum behandeld AgB daarentegen gaf een van de dosis afhankelijk afremming van ^{125}I -anti-IgE gebonden, met WST bedekte schijven, identiek aan die van natief AgB.

Een andere manier om het effect van fotooxydatie op de antigene determinant van AgB te bepalen is om de immunogene eigenschappen van natief en OX-AgB te vergelijken. LAF₁ muizen werden in groepen van 5 dieren geïmmuniseerd met 10 μg AgB proteïne of 10-100 μg OX-AgB proteïne (1 uur monster). Muizen, die met AgB waren geïmmuniseerd, maakten aanzienlijke hoeveelheden IgG₁ en IgE antilichaam, nadat AgB voor een tweede en derde keer was ingespoten. Muizen daarentegen, die met hetzelfde immunisatieschema met 10 of 100 μg OX-AgB proteïne waren geïmmuniseerd, maakten geen IgG₁ of IgE antilichaam, dat met AgB of OX-AgB reageerde (zie fig. 3).

Door antigeen opgewekte lymphocytttransformatie werd gebruikt om de relatieve T-cel aktiverende eigenschappen van AgB en OX-AgB te vergelijken. Zie fig. 4, waarin de opgegeven waarden het gemiddelde van quadruplobepalingen (afzonderlijke bepalingen variëren minder dan 10% van de gemiddelden) zijn. In het concentratiebereik, dat werd onderzocht (0,1-10 μg proteïne) gaf AgB een van de dosis afhankelijke toename in door Ag opgewekte uitbreiding van immune LAF₁ muizen miltcellen OX-AgB (1 uur en 2 uur monsters) had echter bij 1 μg een piekresponse, die over de rest van de onderzochte concentraties aan OX-AgB klaarblijkelijk vlak verliep. Deze gegeven wijzen erop, dat OX-AgB in sterke mate het door Ag opgewekte uitbreidingsvermogen van natief AgB behoudt.

7906183

Fotooxydatie van AgB resulteert in een algeheel verlies aan vermogen van OX-AgB om met konijnen anti-AgB (zie fig. 1) of met menselijke IgB antilichamen (zie tabel B, fig. 2) gericht tegen de antigene determinanten op AgB te reageren. Volledige hydrolyse van OX-AgB met zuur wees erop, dat de enige duidelijke modificatie van natief AgB was bij de quercitine- en tyrosinegedeelten (tabel B). Pogingen om de antigene determinant van AgB door denatureren van 8 molaire ureum te modificeren hadden geen resultaat omdat natief en met ureum behandeld AgB identieke dosis-responsen krommen voor ^{125}I -anti-IgE binding aan IgE-gebonden, anti-geen geconjugeerde papieren schijven hadden (fig. 2). Deze gegevens, tezamen met gegevens van eerdere onderzoeken (Malley cs. 1975a, 1975b, 1978), doen veronderstellen, dat het grootste deel van de antigene determinant van AgB niet van zijn driedimensionele polypeptidestructuur afhankelijk is, maar van de aanwezigheid van het pigment quercitine in het antigeenmolekuul afhankelijk is.

Een aantal onderzoeken (Takatsu cs. Cell Immunol. 20 (1975), 276. Scibienski cs. J.Exp.Med. 136 (1972), 1308, Turkin cs. Proc. Natl.Acad.Sci. 74 ((1977) 3984) hebben doen veronderstellen, dat door T-en B-cellen bepaalde determinanten kunnen verschillen. De B-cel receptoren combineren met hapteen determinanten en T-cel receptoren worden door wisselwerking met drager determinanten op het antigeen geactiveerd. Uit bovenstaand voorbeeld blijkt duidelijk, dat OX-AgB niet met IgG₁ of IgE antilichamen combineert en ook niet de produktie van antilichaam tegen AgB opwekt, een feit, dat doet veronderstellen, dat OX-AgB geen voor het natieve antigeen specifieke cellen voorbereidt ("Prime"). Uit eerdere onderzoeken is gebleken (Fairchild cs. J.Immunol. 117 (1976), 2137) dat de door AgB opgewekte uitbreidingsrespons van met AgB geïnmuniseerde muizen zowel een T-als van B-cellen het gevolg was. De drager determinant aan OX-AgB behoudt een aanzienlijk deel (meer dan 40%) van de uitbreidingsrespons van immune miltcellen ten opzichte van AgB (fig. 3). Bovenstaand voorbeeld wijst erop, dat de drager determinant van OX-AgB T-cellen, die met natief AgB zijn voor bereid ("Primed") activeert.

Voorbeeld II

De volgende werkwijze kan worden gebruikt om een antigeen door oxydatie met chlooramine T te modificeren.

7906183

Proteïne (1-5 mg) werd in 4 ml 0,05 molaire fosfaatbuffer (pH 7) opgelost. De proteïneoplossing werd in een 30 ml bekerglas overgebracht en met een magneetroerder geroerd. Het bekerglas werd in een grote plastic schaal die met ijs was gevuld om de reactieve componenten koud te houden, gezet. Chlooramine T (100 μ g-5mg), opgelost in 0,05 molaire fosfaatbuffer (pH 7) werd druppelsgewijs toegevoegd en gedurende verschillende perioden werd gemengd. Om de reactie tot staan te brengen werd een gelijke gewichtshoeveelheid natriummetabisulfiet toegevoegd, zodat eventueel overgebleven oxydatiemiddel werd geneutraliseerd. Overmaat reactieve componenten werd verwijderd door de oplossing over een kolom "Sephadex G25", die in water in evenwicht was gebracht, te leiden. De doorbraakpiek, die het proteïne bevatte, werd verzameld en gelyophiliseerd.

Voorbeeld III

Onderstaande werkwijze kan worden gebruikt om een antigeen door oxydatie met lactoperoxydase te modificeren.

Proteïne (1-5 mg) werd in 4 ml 0,01 molaire met fosfaat gebufferde zoutoplossing (pH 7) opgelost. 200 μ g lactoperoxydase en 25 μ l 0,03-0,1%-ig H_2O_2 werden toegevoegd. Het reaktiemengsel werd 10-20 minuten bij 37°C geïncubeerd en in deze tijd werden nog twee porties van 25 μ l H_2O_2 toegevoegd. De reactie werd tot staan gebracht door 10 volumedelen koude 5 molaire l-cysteïne-HCl in met fosfaat gebufferde zoutoplossing toe te voegen. Het proteïne werd gewonnen door het mengsel over een kolom "Sephadex G75" te leiden. Het enzyme werd niet door het "Sephadex G75" vastgehouden, terwijl antigeen B door het moedermateriaal werd tegengehouden. Het materiaal werd geëluëerd door de kolom ononderbroken met de buffer uit te wassen. Het geëluëerde proteïne werd door lyophiliseren geconcentreerd.

7906183

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor het modificeren van de antigene eigenschappen van een quercitinegedeelte bevattend graspollen antigeen of fragment ervan, dat de structuurformule van het formuleblad, waarin G glucose en T threonine of een via een threoninemolekuul aan genoemde structuur gebonden peptide voortstelt heeft, met het kenmerk, dat het antigeen aan zodanige oxydatieomstandigheden wordt blootgesteld, dat de dihydroxy aromatische ringen hergroepering en ringsplitsing ondergaan, waardoor een produkt ontstaat, dat nagenoeg geen antigene eigenschappen bezit, maar in staat is om T-cellen te aktiveren en T_s-cellen te doen ontstaan.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het graspollen antigeen antigeen B, antigeen D, antigeen D₁, antigeen D₂ of antigeen D₃ is.

3. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de oxydatieomstandigheden ook de hergroepering en ringsplitsing van de hydroxy aromatische ring, die in het tyrosine gedeelte van het peptide T aanwezig is, ten gevolge hebben.

4. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de mate van de oxydatie voldoende is om een gemodificeerd antigeen te doen ontstaan, dat niet kan reageren met antilichamen, die gericht zijn tegen de antigene determinantstructuur van het uitgangsantigeen.

5. Werkwijze volgens conclusie 4, met het kenmerk, dat de oxydatieomstandigheden zodanig zijn, dat aanzienlijke modificatie van het aminozuurgehalte van het antigeen wordt vermeden.

6. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het graspollen wordt gefotoöxydeerd.

7. Werkwijze volgens conclusie 6, met het kenmerk, dat de fotoöxydatie wordt bewerkstelligd, doordat een waterige oplossing van het antigeen met zuurstof wordt verzadigd en deze oplossing vervolgens aan licht wordt blootgesteld.

8. Gemodificeerd graspollen antigeen, zoals kan worden bereid onder toepassing van de werkwijze volgens conclusie 1.

9. Gemodificeerd graspollen antigeen, zoals kan worden

7906183

bereid onder toepassing van de werkwijze volgens conclusie 2.

10. Gemodificeerd graspollen antigeen, zoals kan worden
bereid onder toepassing van de werkwijze volgens conclusie 5.

5 11. Gemodificeerd graspollen antigeen, zoals kan worden
bereid onder toepassing van de werkwijze volgens conclusie 6.

12. Gemodificeerd graspollen antigeen, zoals kan worden
bereid onder toepassing van de werkwijze volgens conclusie 7.

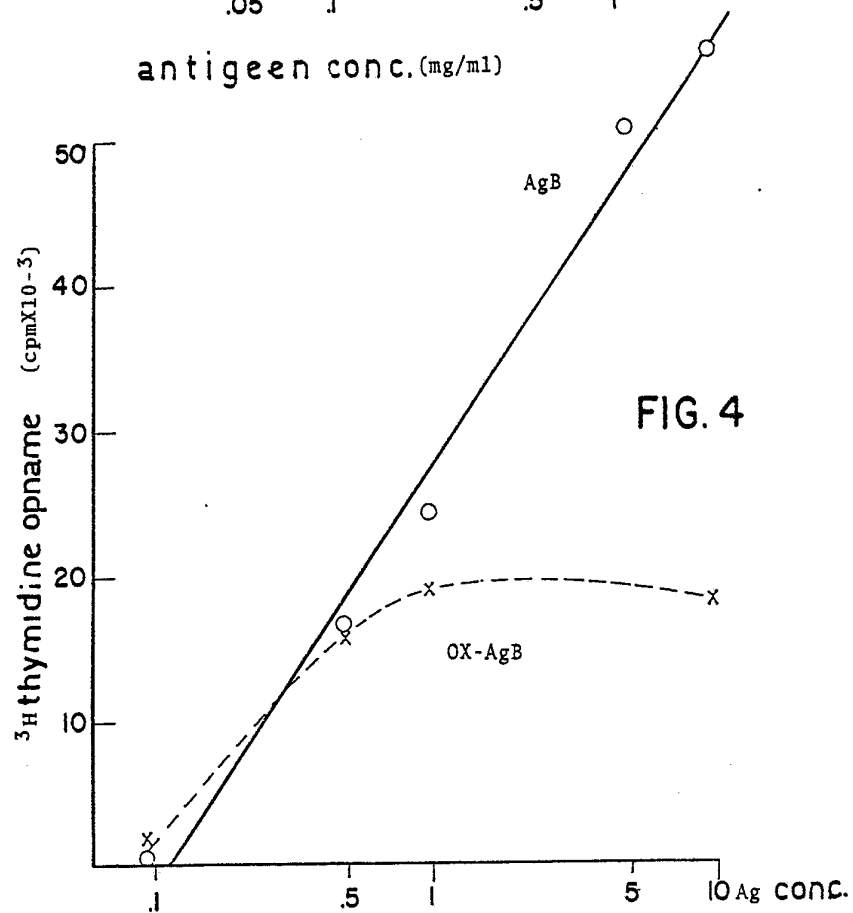
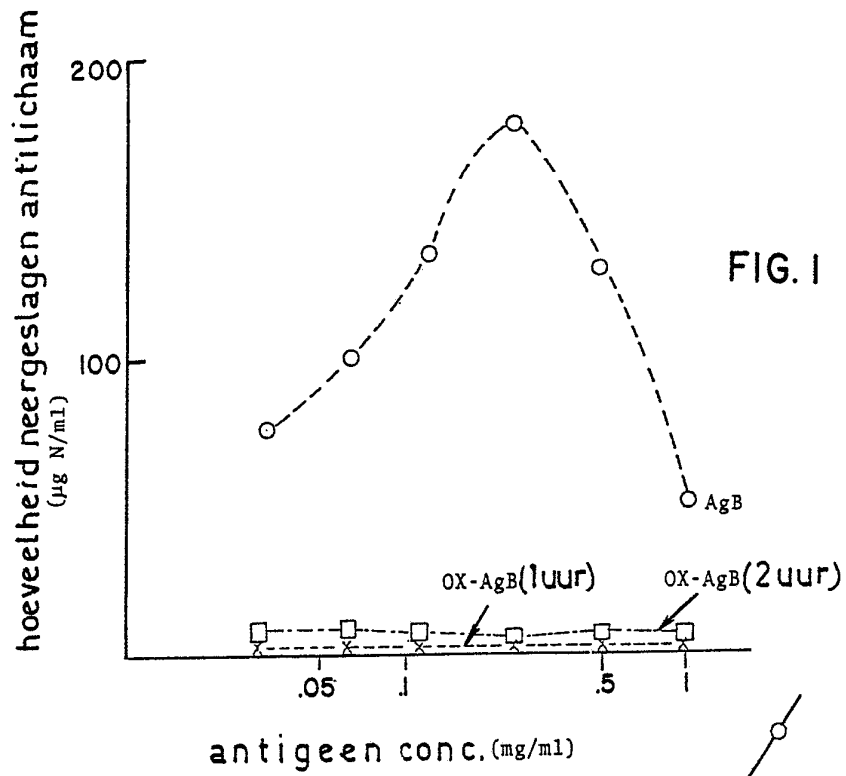
10 13. Immunotherapeutische werkwijze ter behandeling van
graspollen allergie, met het kenmerk, dat aan een individu een hoeveel-
heid van het gemodificeerde graspollen antigeen volgens conclusie 8 wordt
toegediend, die voldoende is om suppressor T-cellen te doen ontstaan,
die een onderdrukking van allergische antilichamen tegen graspollen anti-
geen ten gevolge hebben.

15 14. Immunotherapeutische werkwijze ter behandeling van
graspollen allergie met het kenmerk, dat aan een individu een hoeveelheid
van het gemodificeerde graspollen antigeen volgens conclusie 9 wordt
toegediend, die voldoende is om suppressor T-cellen te doen ontstaan,
die een onderdrukking van allergische antilichamen tegen graspollen anti-
geen ten gevolge hebben.

20 15. Immunotherapeutisch preparaat, dat geschikt is voor
het afremmen van allergische reacties bij mensen en lagere dieren, met het
kenmerk, dat het bestaat uit een gemodificeerde graspollen antigeen vol-
gens conclusie 8 en een inerte drager ervoor in de vorm van een eenheids-
dosis.

25 16. Immunotherapeutisch preparaat, dat geschikt is voor
het afremmen van allergische reacties bij mensen en lagere dieren, met het
kenmerk, dat het uit het gemodificeerde graspollen antigeen volgens con-
clusie 9 en een inerte drager ervoor in de vorm van een eenheidsdosis be-
staat.

7906183



7906183

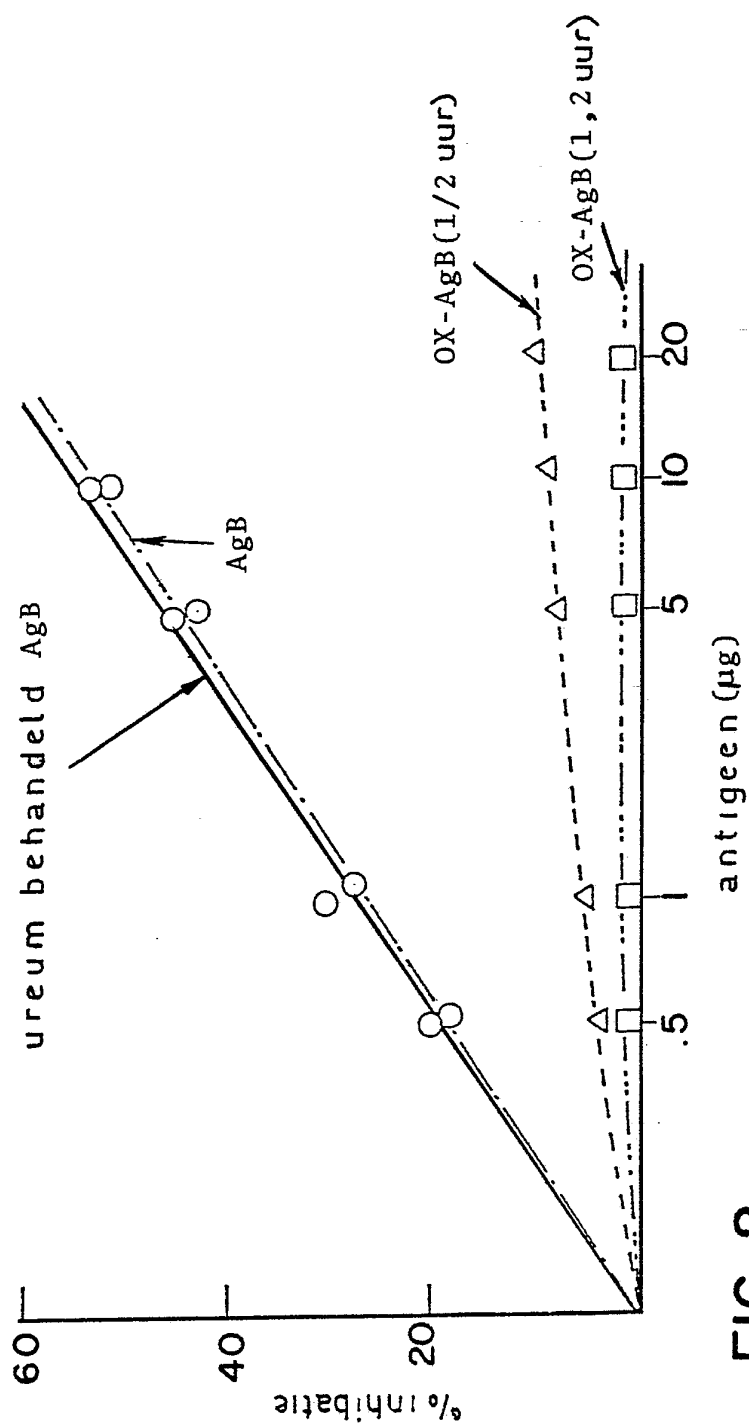


FIG. 2

7906183

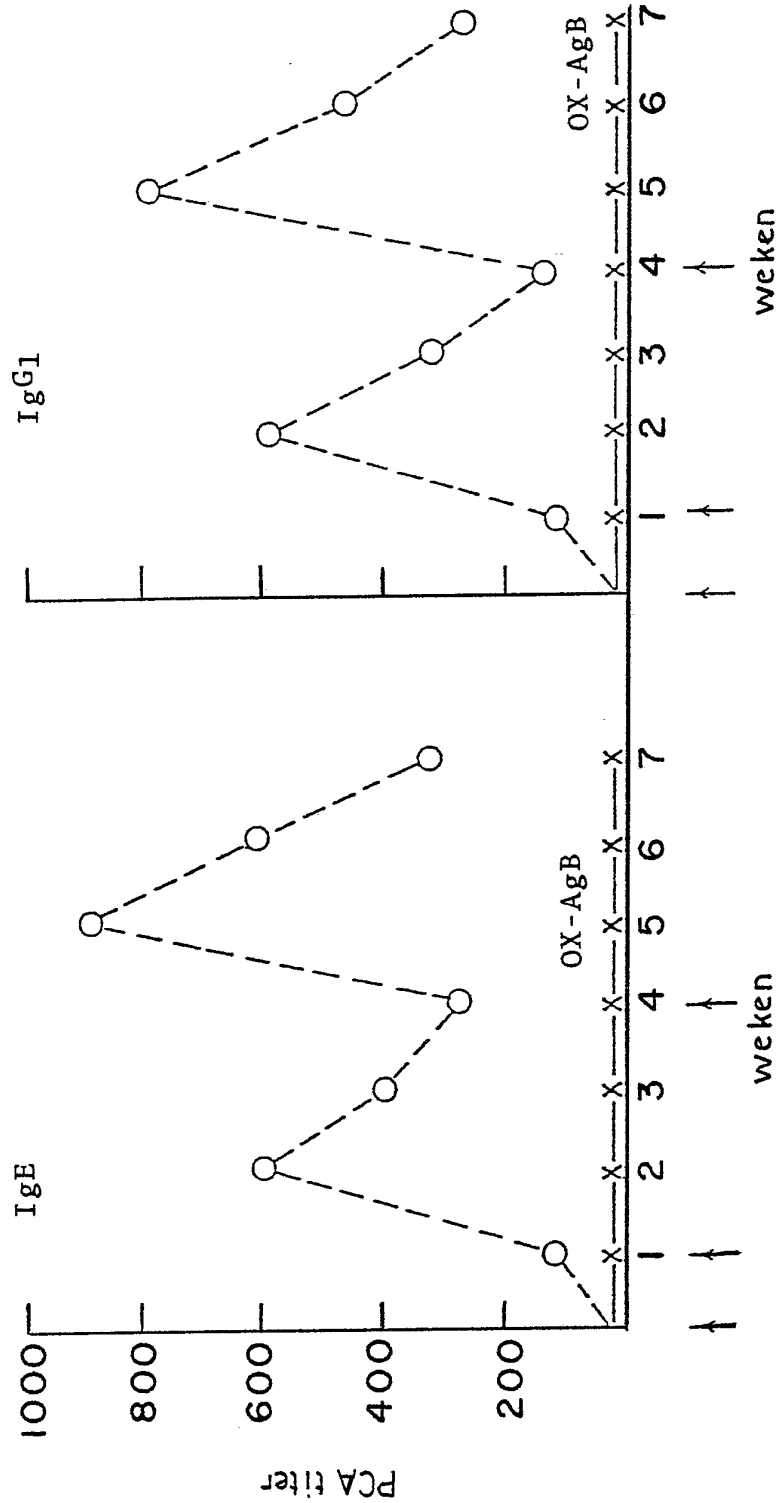
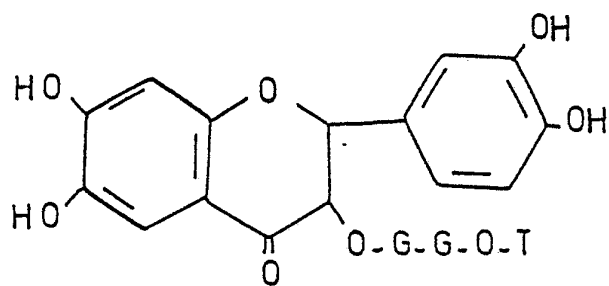


FIG. 3

7906183



7906183