(19) DANMARK (11) **DK 175152 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl[7].: **C 07 K 16/06** **C 07 K 16/18** **G 01 N 33/569** **G 01 N 33/68**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1989 05894**

(22) Indleveringsdag: **1989-11-23**

(24) Løbedag: **1989-03-24**

(41) Alm. tilgængelig: **1989-11-23**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2004-06-21**

(86) International ansøgning nr: **PCT/US89/01241**

(86) International indleveringsdag: **1989-03-24**

(85) Videreførelsesdag: **1989-11-23**

(83) Deponering af mikroorganismer.

(30) Prioritet: **1988-03-25 US 173705**

(73) Patenthaver: **Institute for Human Genetics and Biochemistry, 64, avenue de la Roseraie, CH-1211 Geneva 4, Schweiz**
Toby C. Rodman, 535 East 86th Street, New York, N.Y. 10028, USA

(72) Opfinder: **Toby C. Rodman, 535 East 86th Street, New York, N.Y. 10028, USA**

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

(54) Benævnelse: **IgM-antistof eller et fragment deraf, fremgangsmåde til prognose eller diagnose af AIDS og diagnosesæt dertil**

(57) Sammendrag:

Den foreliggende opfindelse angår protaminreaktive IgM-antistoffer, som kan være ikke-frembragte, naturlige antistoffer. Ved en specifik udførelsesform angår opfindelsen et undersæt af protaminreaktive serum-IgM-antistoffer med lav affinitetsbinding, som erkender en sekvens omfattende 4 arginylrester, herunder en triplet, i en sekvens på 6 aminosyrerester, fremgangsmåder og diagnosesæt deraf. Dette undersæt med lav affinitet kan påvises i sera fra normale individer og HIV-inficerede individer, som derefter udviser en signifikant latensperiode, men er fraværende eller nedsat i sera fra individer diagnosticeret med AIDS og sera fra HIV-inficerede individer, som, selvom de er symptomfrie på prøveudtagningstidspunktet, udvikler AIDS i løbet af et relativt kort tidsrum.

fortsættes

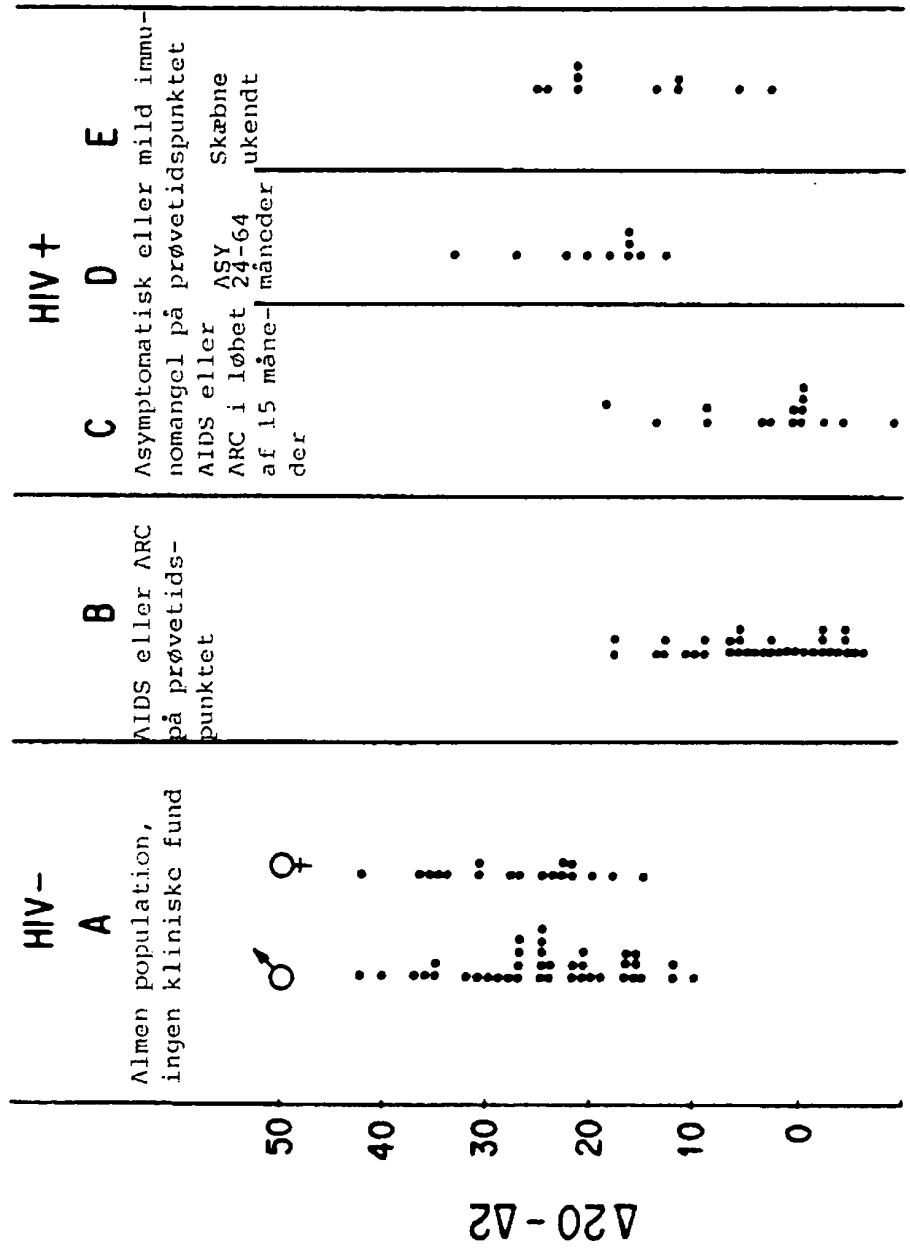

HIV-
A
Almen population, ingen kliniske fund
♂
♀
B
AIDS eller ARC på prøvetidspunktet
HIV+
C
Asymptomatisk eller mild immunomangel på prøvetidspunktet
AIDS eller ARC i løbet af 15 måneder
D
ASY 24-64 måneder
E
Skæbne ukendt
50
40
30
20
10
0
Δ20-Δ2

FIG. 12

Introduktion.

Den foreliggende opfindelse angår et IgM-antistof eller et fragment deraf, en fremgangsmåde til prognose eller diagnose af AIDS og et diagnosesæt dertil. Især angår opfindelsen protaminreaktive serum-IgM-antistoffer, som kan erkende en sekvens omfattende 4 arginylrester, herunder en triplet, i et stykke på 6 aminosyrerester, og som udviser lav bindingsaffinitet til antigen. Dette antistofundersæt af protaminreaktive serum-IgM-antistoffer med lav affinitet kan afprøves for diagnose eller diagnose af AIDS. Opfindelsen angår også diagnosesæt til påvisning og/eller måling af de protaminreaktive serum-IgM-antistoffer med lav affinitet.

2. Opfindelsens baggrund

2.1. Protaminer.

Protaminer er små, yderst basiske nucleoproteiner, som er associeret med DNA, og som ikke forekommer i andre celler end spermatider og spermatozoer. Disse proteiner syntetiseres de novo og inkorporeres i kernerne i spermatogene celler under spermiogenesis, hvor de erstatter histoner og er bundet til den spermatozoiske DNA, en fremadskriden, som finder sted i immunologisk sekvestrede hulrum i sædkanalerne i testis efter puberteten (N.B. Gilula et al., 1976, Dev. Biol. 50:142).

Protamin 1 (oprindeligt benævnt p15) er et humant protamin, som forekommer i 4 varianter. Det er blevet identificeret og karakteriseret ved hjælp af et monoclonalt antistof (benævnt HPmAb, beskrevet nedenfor) (T.C. Rodman et al., 1983, Gamete Res. 8:129-147).

Humant protamin 2 har længe været erkendt og vides at forekomme som to varianter (A.H. Kolk and T. Samuel, 1975, Biochem. Biphys. Acta 393:307-319), senere betegnet som protamin 2a og 2b (D.J. McKay et. al, 1986, Eur. J. Biochem. 156:5-8).

Polyvalente kaninantisera, som er specifikke for de to protaminer i musespermachromatin, er blevet isoleret og anvendt til karakterisering af protaminerne med hensyn til

fordeling og DNA-associering og til erkendelse af immunokemisk krydsreaktivitet mellem pattedyrprotaminer (T.C. Rodman et al., 1984, Exp. Cell Res. 150:269-281).

Polyclonale kaninantisera imod humane protaminer er blevet anvendt ved immunohistokemiske studier af overgangen histon til protamin under spermiogenesis (Ch. Roux et al., 1988, J. Reprod. Fert. 82:35-42). Påvisningstrinene i immunoafprøvningerne ved dette studium er blevet gennemført ved anvendelse af antistoffer imod kanin-IgG.

Monoclonale museantistoffer mod humane protaminer af IgG1- og IgG2b-isotyperne er blevet isoleret og delvist karakteriseret (L.H. Stanker et al., 1987, Hybridoma 6(3):-293-303). Ingen af de beskrevne antistoffer har reageret med polyarginin.

Autoantistoffer imod spermatozoiske antigener er blevet påvist i vasectomiserede hanner ved Western blottingmetoder, som afprøver for antistoffer, som er reaktive med spermatozoiske antigener adskilt ved SDS-polycarylamid-gelelektrophorese eller ved agglutineringsprøver (J. Hald et al., 1987, J. Reprod. Immunol. 10:15-26). Da protaminer er for basiske til at vandre i SDS-polyacrylamid-geler og har immunoreaktive steder, som der ikke er adgang til, med mindre chromatinet er afkondenseret (T.C. Rodman et al., 1970, J. Cell. Biol. 80:605-620), har de rapporterede afprøvninger ikke påvist anti-protaminantistoffer.

2.2. Naturlige antistoffer.

Det naturlige antistofrepertoire er et segment af immunsystemet, som kun forstås i ringe udstrækning, som tidligt er blevet postuleret at tilvejebringe det første forsvar imod specifikke inficerende stoffer (J. G. Michael, 1969, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 48:43-62), og som i den senere tid har været genstand for forøget interesse og gisninger om en mulig rolle ved kontrollen med autoimmunitet (I. Cohen et al. 1986, Immunol. Today 7:363-364) eller andre faser af immunoregulering (G. Dighiero et al., 1985, J.Immunol. 134:765). Naturlige antistoffer er hyppigt blevet beteg-

net som dem med lavere affinitet end deres frembragte modstykker (se f.eks. E.D. Day et al., 1986, J. Neuroimmunol. 13:143-158, S. Hoch et al., 1986, J. Immunol. 136:892-897, M.M. Tongio et al., 1985, Tissue Antigens 26:27-285).

2.3. Erhvervet immunomangelsyndrom.

Erhvervet immmunomangelsyndrom (AIDS) er en sygdom, som er karakteriseret ved en svær immunmangel, som primært er forårsaget af en nedsat cellemedieret immunreaktion (M. Gottlieb et al., 1981, N. Engl. J. Med. 305:1425, J. Masur et al., 1981, N. Engl. J. Med. 305:1431). Immunomangeltilstanden er karakteriseret ved en nedgang i T_H-lymphocyter (T-hjælper), at det normale celleforhold CD4 $(T4)^+$:$CD8(T8)^+$ er vendt om, lymphopenia, en forøget hyppighed af lejlighedsvise infektioner (f.eks. Pneumocystis carinii pneumoni) og/eller ondartede tilstande (f.eks. lymphoma eller Kaposi's sarcoma). Syndromet er sædvanligvis dødeligt.

Årsagen til AIDS er et retrovirus, nu betegnet det humane immunomangelvirus (HIV) (også isoleret som LAV/ARV/-HTLV III), som inficerer T_H-lymphocyter (R.C. Gallo et al., 1984, Science 224:500, F. Barre-Sinoussi et al., 1983, Science 220:868, P.M. Feorino et al., 1984, Science 225:69, J. A. Levy et al., 1984, Science 225:840).CD4-T-celleoverflademolekylet er blevet identificeret som en receptor for viruset, og virusets efterfølgende cytolytiske aktivitet udtømmer denne cellepopulation (D. Klatzman et al., 1985, Nature 312:-767, A.G. Dalgleish et al., 1984, Nature 312:763, J.S. McDougal et al., 1986, Science 231:382, P.J. Maddon et al., 1986, Cell 47:333).

En patient er diagnosticeret med AIDS, når han eller hun (1) har positiv prøve for tilstedeværelsen af HIV og frembyder en eller flere af de specifikke indikatorsygdomme (neoplasmer, lejlighedsvise infektioner), eller når (2), i fraværelse af laboratoriebevis for HIV-infektion, alle andre årsager til immunomangel er udelukket, og en af indikatorsygdommene er tilstede sammen med en lav (under $400/mm^3$) $CD4^+$-T-lymphocyttælling. AIDS-relateret kompleks (ARC) refererer

til de patienter, som har positiv prøve for HIV, og som udviser vedvarende, generaliseret lymphadenopati, langvarig feber, vægttab, vedvarende diarre eller ekstrem udmattethed, men som endnu ikke har udviklet en af de indikatorsygdomme, som er forbundet med fuldt udviklet AIDS.

En række studier har fastslået, at en signifikant risikofaktor for AIDS er receptivt analt samkvem (se f.eks. J.J. Goedert et al., 1984, Lancet ii:711-716, W.W. Darrow et al., 1987, Am. J. Pub. Health 77:479-483, L. A. Kingsley et al., 1987, Lancet ii:345-348). Den forøgede risiko tilskrives almindeligvis en effektiv overføring af virus ad denne vej. En vis opmærksomhed er imidlertid blevet viet den mulige medvirken af sædbestanddele ved de patologiske konsekvenser af HIV-infektion (G.M. Mavligit et al., 1984, J. Am. Med. Assoc. 251:237-241, A. Ranki et al., 1985, Cancer Res. 45:4616S-18S, K.V. Ratman et al., 1986, Aust. N.Z.J. Med. 15:757-760). Relevant hertil kan en nylig rapport være, om at den gennemsnitlige latensperiode af HIV-inficerede blødere er væsentlig længere end perioden for andre HIV-inficerede gupper (H. Ekert, 1987, Nature 329:494).

Adams et al. (1988, Clin. Immunol. Immmunopathol. 45:442-449) har rapporteret, at der er signifikant forekomst af antistoffer mod sperma- og sædplasmakomponenter i sera fra ARC- og AIDS-patienter. Der er blevet afprøvet for antistoffer ved hæmagglutinering, for antistoffer mod sædplasma og ved indirekte immunofluorescens på fikseret human sperma. Ingen af de anvendte afprøvningsmetoder har kunnet påvise protaminreaktive antistoffer, da protaminer er kerneproteiner og således ikke ville være tilgængelige i sædplasma for antistofbinding og hæmagglutinering og da for protamin immunoreaktive steder ikke er tilgængelige for antistofbinding ved immunofluorescensafprøvninger, med mindre spermachromatinet først afkondenseres (T.C. Rodman et al., 1970, J. Cell. Biol. 80:605-620, T.C. Rodman et al., 1984, Exp. Cell. Res. 150:269-281).

3. Resumé af opfindelsen.

Den foreliggende opfindelse angår et humant eller naturligt IgM-antistof eller et fragment deraf omfattende Fv-regionen, som er ejendommeligt ved, at det binder til et humant protamin.

Opfindelsen angår også et humant eller naturligt IgM-antistof eller et fragment deraf som defineret i krav 2-4.

Opfindelsen angår desuden en fremgangsmåde til prognose eller diagnose af AIDS hos et individ som defineret i krav 15.

Opfindelsen angår endvidere et diagnosesæt som defineret i krav 24-26 og 30-32.

Opfindelsen angår endelig også et antistof af IgM-isotypen som defineret i krav 34 og 35.

3.1. Definitioner.

Som her anvendt vil følgende forkortelser have de angivne betydninger:

AIDS = erhvervet immunomangelsyndrom.
ARC = AIDS-relateret kompleks.
BSA = okseserumalbumin.
ELISA = enzymbundet immunosorbentafprøvning.
Fv = den variable region eller antigenkombinerende sted i et antistofmolekyle. Dette kan være et vilkårligt fragment, som indeholder idiotypen af molekylet, herunder, men ikke begrænset til f.eks. Fab, $F(ab')_2$ og Fab'.
HIV = hummant immunomangelvirus.
HPmAb = monoclonalt antistof til humane spermaprotaminer.
mAb = monoclonalt antistof.
P1 = renset humant protamin 1.
P2 = renset humant protamin 2.
PAGE = polyacrylamid-gelelektrophorese
PBS = phosphatpufret saltopløsning.

4. Beskrivelse af tegningen.

Figur 1. Proportionalitet af protaminreaktivt IgM til totalt IgM i humane sera. En værdi (x) for totalt IgM for hvert enkelt serum er blevet afledt som en procentdel af et referenceserum (se afsnit 6.1.1), og en værdi (y) for protaminreaktivt IgM er blevet afledt som en procentdel af samme referenceserum. De afbildede værdier er x/y for hvert enkelt serum.

Figur 2. (A) Fraktioner af humane spermaproteiner (striberne 1-5) SDS-PAGE; (striberne 6-8) eddikesyre-urinstof-PAGE. (Stribe 1) molekylvægtmarkeringer: 14,4, 20, 30, 43, 67, 94 X 10^3 dalton; (stribe 2) haleproteiner; (stribe 3) i "Triton^A X-100" opløselige proteiner af hovedmembraner; (stribe 4) 8%'s GuCl-eluat af "BioRex^A-70"-chromatogram af kerneproteiner; (stribe 5) 16%'s eluat; (stribe 6) 23%'s eluat (P1); (stribe 7) 25%'s eluat (P1 og phosphoryleret P2); (stribe 8) 27%'s eluat (P2). (B) ELISA-værdier for HPmAb-reaktivitet med hver enkelt spermafraktion. (Striber 2-5) .....; (stribe 6)—.—.—.—.; (stribe 7)————; (stribe 8) --------. HPmAb er kun reaktivt med tre protaminfraktioner (striberne 6, 7 og 8).

Figur 3. Reaktivitet af HpmAb med (A) polyarginin og (B) polylysin ved stigende antigenkoncentrationer. 2µg/ml polyarginin —.—.—.—.; 5, 10 eller 20 µg/ml polyarginin .....; 2, 5, 10 eller 20 µg/ml polylysin ————. Hver afbildet værdi repræsenterer gennemsnittet af fire afprøvninger, gennemført som dobbeltforsøg.

Figur 4. Reaktivitet af HPmAb med (A) P1 ved 2 µg/ml —.—.—.—.; 5 µg/ml .....; 10 eller 20 µg/ml polylysin ————; ((B) P2 ved 2 µg/ml —.—.—.—.; 5 µg/ml .....; 10µg/ml eller 20 µg/ml -------. Hver afbildet værdi repræsenterer gennemsnittet af 5 afprøvninger, hver især gennemført i dobbeltforsøg. Med molere ækvivalenter (ækvivalentvægte) af P1 og P2 er reaktiviteten af HPmAb større med og mættet ved lavere antigenkoncentrationer af P1.

Figur 5. Reaktivitet af humant serum IgM med (A), P1, (B) P2, (C) polyarginin ved 2 µg/ml —.—.—.—.; 5

μg/ml .....; 10 μg/ml ————; 20 μg/ml -------- af hver enkelt antigen. Venstre kolonne er serum fra et barn (alder 6 måneder), midterste kolonne fra voksen mand og højre kolonne fra voksen kvinde.

Figur 6. Konkurrence af HPmAb med human serum-IgM-reaktivitet imod (A) P1 og (B) P2. Standard-ELISA-protokollen (se afsnit 6.1.1) gennemføres med følgende modifikation: Før tilsætningen af humant serum til de antigenbundne huller placeres 50 μl HPmAb ved fortyndingen 1:1.000————; 1:-10.000 ....., intet HPmAb -------- i hvert enkelt hul i en time, hvorefter det vaskes ud og efterfølges af humant serum i de angivne fortyndinger. Reaktivitet påvises ved anvendelse af peroxidasekonjugeret anti-human IgM. (A) HPmAb ved fortyndingen 1:1.000 blokerer ca. 45% af serumreaktiviteten med P1 ved fortyndinger af serum på 1:100 og 1:500. (B) HPmAb ved fortyndingen 1:1.000 blokerer ca. 25% af serumreaktiviteten med P2, når serumet er fortyndet 1:100, og ca. 45% af reaktiviteten, når serumet er fortyndet 1:500.

Figur 7. Reaktivitet af humant serum-IgM med P1————; P2 --------; og spermahovedmembranproteiner..... efter absorption af serum på protaminer i pulje. (A) Ikke-absorberet serum; (B) serum absorberet på 100 μg protaminer; (C) serum absorberet på 200 μg protaminer.

Figur 8. Reaktivitet af humant serum-IgM med P1 —.—.—.—., P2————, renset kalvethymushistoner (herunder ækvimolære vægte af H1, H2a, H2b, H3 og H4)....., efter absorption på histoner. (A) ikke-absorberet serum, (B) absorberet på 200 μg histoner, (C) absorberet på 500 μg histoner.

Figur 9. Reaktivitet af humant serum-IgM med P1————, P2 --------, polyarginin ....., polylysin —.—.—.—. . (A) Ikke-absorberet serum; (B) serum absorberet på 200 μg polylysin; (C) serum absorberet på 200 μg polyarginin.

Figur 10A. Der er vist resultaterne af en ELISA (O.T. 490 nm) i serum (T.C. Rodman et al., 1986, J. Immunol. Meth. 94:105-111, F.H. Pruslin et al., 1986, J. Immunol Meth.

94:99-103) fra hver af 3 normale (ingen kliniske fund, HIV-negative) voksne individer til påvisning af antistoffer, som er reaktive med følgende stigende koncentrationer af protamin-2 (P2): 2 µg/ml....., 5 µg/ml -- -- -- --, 10 µg/ml —.—.—.—.; 20 µg/ml ————, 50 µg/ml --------. Den skarpe stigning i kurven mellem serumfortyndinger 1:100 og 1:500 med de højere antigenkoncentrationer antyder, at der er to underpopulationer af protaminreaktive IgM-antistoffer i disse sera.

Figur 10B. Summariske kuver for afprøvningen af IgM fra 20 normale sera fra voksne gennemført med P2 som antigen ved følgende koncentrationer 2 µg/ml....., 5 µg/ml -- -- -- --, 10 µg/ml —.—.—.—.; 20 µg/ml ————, hvilket viser, at kurvens stigning ved høje antigenkoncentrationer, som antyder en sekundær underpopulation af protaminreaktive IgM-antistoffer, er en dominerende egenskab i sera fra normale voksne.

Figur 10C. Reaktivitet af de samme sera som i figur 10A med et syntetisk decapeptid (DP), som omfatter det definerede antigeniske sted i protamin, ved samme koncentrationer som i figur 10A.

P2b* G Q S H Y R R R H C S R R R L H R I H R R Q H R S C R R R K R R S C R H R R R H R R G C R T R K R T C R R H

DP C R R R K R R S C R *

D.J. McKay et al., 1986, Eur. J. Biochem. 156:5-8. Som for P2 (figur 10A) viser kurverne for de højere koncentrationer af DP en stigning mellem serumfortyndinger 1:100 og 1:500, hvilket antyder, at den sekundære population af protaminreaktive IgM-antistoffer, som afsløres ved høje antigenkoncentrationer, ikke er en population med en antigenerkendelsesspecificitet, som er forskellig fra specificiteten af den primære population, men er en population med lavere bindingsaffinitet.

Figur 10D. IgM-reaktivitet af de samme sera som i figur 10A og 10C med de samme koncentrationer af P2b som i

figur 10A, idet fortyndingsmidlet imidlertid har været 0,3 M NaCl (i modsætning til alle andre afprøvninger, hvor serumfortyndingsmidlet, PBS, har været 0,15 M NaCl). Ved forhøjet NaCl-molaritet er den skarpe stigning i kurverne for høje antigenkoncentrationer, som er vist i figur 10A, ophævet, hvilket antyder, at fasen med antigen-antistof-binding på grund af ionisk vekselvirkning er blevet inhiberet. Ionisk vekselvirkning ser således ud til at være en hovedbestanddel af bindingen af undersættet af protaminreaktive IgM-antistoffer med lav affinitet, og derfor er reaktiviteten af denne population fortrinsvis blevet undertrykt.

Figur 11A. Reaktivitet af IgM-antistoffer i serum fra hver af 3 patienter med AIDS med P2 i stigende koncentrationer (som beskrevet for figur 10A). Selvom den totale raktivitet for to af disse sera vedbliver med at stige med voksende antigenkoncentration, antyder kurvernes form, at stigningen stammer fra en antistofpopulation, som er unimodal med hensyn til affinitet snarere end fra overlejring af en sekundær underpopulation af protaminreaktive IgM-antistoffer som i figur 10A, B, C.

Figur 11B. Summariske kurver for afprøvninger af 15 sera fra AIDS-patienter for reaktivitet med P2 (som beskrevet ovenfor for figur 10B), som verificerer, at fraværelsen af den sekundære underpopulation af protaminreaktive IgM-antistoffer med lav affinitet er typisk for sera fra AIDS-patienter.

Figur 12. Fordeling af titere af undersæt af protaminreaktive IgM-antistoffer med lav affinitet, i forhold til totalt, protaminreaktivt IgM, i sera fra normale personer, personer med AIDS og personer med risiko for AIDS, beregnet som í20 - í2, en værdi, som opnås ved afprøvning af hvert enkelt serum for IgM-reaktivitet med P2 ved 2 µg/ml og 20 µg/ml og beregning af titeren som beskrevet nedenfor i afsnit 7.2. For gruppe D er de dokumenterede tidsintervaller fra blodprøveudtagning til den anden diagnose, oppe fra og ned, 32, 24, 44, 64, 48, 60, 55, 29, 32 og 24 måneder. Tidsinter-

vallerne genspejler tidspunktet for den sidste kliniske undersøgelse af personerne og er således en angivelse af den minimale latensperiode. Alle sera er blevet afprøvet for tilstedeværelse af HIV-antistoffer ved Western pletdannelse ved anvendelse af nitrocelluloseoverføringer af elektropherogrammer af HIV-proteiner: P18, P24, P31, GP41, P51, P55, P65, GP110/120, GP160 (Epitope, Inc. Beaverton, OR). Serum betegnes som positivt, når to eller flere bånd er farvet, og negativt, når ingen bånd er farvet.

Figur 13. Reaktivitet af IgM i serum fra hver af 3 børn (28 dage, 12 dage, 5 måneder gamle, ingen kliniske fund) med (A) P2 og (B) DP ved stigende koncentrationer (som beskrevet for figur 1A og 1C). Ligheden i kuverne for P2 og DP bekræfter identiteten af det antigeniske sted. Kurvernes former antyder, at serum-IgM-antistoffer fra børn, som er reaktive med dette sted, er homogene eller unimodale med hensyn til affinitet.

5. Detaljeret beskrivelse af opfindelsen.

5.1. Protaminreaktive IgM-antistoffer.

Som detaljeret omtalt i nedenstående afsnit 6 er det blevet fastslået, at sera fra alle klinisk normale mennesker, som er over 12 dage gamle, indeholder IgM-antistoffer, som er reaktive med protaminer, og at disse antistoffer er et definitivt sæt af det cirkulerende IgM med en høj grad af specificitet, og det antigeniske sted, med hvilket disse antistoffer er reaktive, er blevet afgrænset.

Som nedenfor beskrevet kan de protaminreaktive IgM-antistoffer ifølge opfindelsen påvises i signifikant titer i praktisk taget alle sera fra normale voksne mænd og kvinder og for normale børn (7 dage til 2 år). Fælles træk mellem de protaminreaktive IgM-antistoffer i sera fra børn og voksne er blevet fastslået ved påvisning af lighed i antigenerkendelse og reaktionsligevægte. De protaminreaktive IgM-antistoffer, som findes i sera fra børn, kan ikke tilskrives immunogenisk stimulering ved hjælp af protamin, da protaminer synthetiseres de novo i testis efter puberteten og heller

ikke er inkorporeret i andre cellekerner end dem fra den spermiogeniske række. Heller ikke kan de protaminreaktive IgM-antistoffer i sera fra nyfødte tilskrives oprindelse hos moderen, da IgM ikke krydser placenta. Der er derfor sund basis for at drage den slutning, at humane sera indeholder et undersæt af "naturlige" antistoffer, som er reaktive med, men ikke frembragt af protaminer.

Protaminer sekvestreres fra immunsystemet under deres syntese og cellulære inkorporering (M. Dym og D.W. Fawcett, 1970 Bio. Reprod. 3:308-326), og det er nu vist, at protaminer er ikke-immunoundertrykkende, dvs. de inhiberer ikke T-cellemitogenesis in vitro, således som andre fra sperma stammende proteiner gør (T.C. Rodman et al., 1985, Science 228:1211-1215). Derfor kan sera fra mænd efter puberteten og kvinder med seksuel erfaring indeholde nogle protaminreaktive antistoffer, som kan tilskrives immunogenisk frembringelse af protaminer. Derfor postuleres det, at de protaminreaktive IgM-antistoffer i humant sera fra voksne omfatter to undersæt, som har forskellig oprindelse: (1) naturlige antistoffer og (2) frembragte antistoffer.

Det princip, som er karakteristisk for det antigeniske sted, som erkendes af de protaminreaktive serum-IgM-antistoffer er en klynge af arginylrester med et tilsyneladende minimumskrav på 4 arginylrester, herunder en triplet, i et stykke på 6 aminosyrerester, og bindingsreaktionen er ikke afhængig af ladningstiltrækning. Som vist ved en række immunoabsorptionsmetoder (se afsnit 6 nedenfor) er de protaminreaktive serum-IgM-antistoffer et særskilt sæt med en høj grad af specificitet.

Antistofmolekylerne ifølge opfindelsen er protaminreaktive IgM-antistoffer, herunder fragmenter deraf, som indeholder den idiotypiske region i antistofmolekylerne, og disse omfatter de fragmenter, som omfatter Fv-regionen, f.eks. Fab-, $F(ab')_2$- og Fab'-fragmenter. Antistoffragmenter, som indeholder idiotypen i molekylet har kunnet skabes ved kendt teknik. Sådanne fragmenter omfatter, men er ikke begrænset

til, f.eks. det $F(ab')_2$-fragment, som kan fremstilles ved pepsindigerering af antistofmolekylet, de Fab'-fragmenter, som kan frembringes ved reduktion af disulfidbroerne i $F(ab')_2$-fragmentet, og de Fab-fragmenter, som kan frembringes ved behandling af antistofmolekylet med papain og et reduktionsmiddel.

5.2. Anvendelse ved prognostisk og diagnostisk forudsigelse af latens fra HIV-infektion til manifestation af AIDS.

Som detaljeret beskrevet i afsnit 7 nedenfor tilvejebringer målingen af serum-anti-protamin-IgM-antistoffer en pålidelig prognostisk indikator for latensperioden mellem HIV-infektion og tidspunktet, hvor manifestationer af AIDS sætter ind. Tilstedeværelsen eller fraværelsen i serum af et undersæt af de protaminreaktive IgM-antistoffer med lav affinitet i følge opfindelsen angiver et HIV-inficeret individs evne til at modstå den patogeniske fremadskriden til AIDS. Den karakteristiske egenskab ved det undersæt af anti-protamin-Igm-antistoffer, hvis fraværelse fra serum korrelerer med en relativt kort periode af HIV-latens, er den lave bindingsaffinitet til protamin i forhold til andre IgM-antiprotaminantistoffer, som er til stede i sera fra voksne. Disse anti-protamin-IgM-antistoffer med lav affinitet er reaktive med en epitop, som er karakteriseret ved en arginylklynge, især 4 arginylrester, herunder en triplet, i et stykke på 6 aminosyrerester. Sådanne anti-protamin-antistoffer med lav affinitet kan være naturlige antistoffer.

Undersættet af serumprotaminreaktive IgM-antistoffer med lav affinitet kan afprøves til prognose af AIDS. Sådanne antistoffer kan påvises i sera fra normale personer, og HIV-inficerede individer, som derefter udviser en signifikant latensperiode, men mangler eller er nedsat i sera fra individer, som er diagnosticeret med AIDS, og sera fra HIV-inficerede individer, som, selvom de er symptomfrie på prøveudtagningstidspunktet, skrider frem til AIDS i løbet af et relativt kort tidsrum. Man kan derfor stole på en kvantitativ

bestemmelse af fraværelsen eller manglen på sådanne antistoffer i HIV-seropositive individer, som en angivelse af en relativt nært forestående indtræden af AIDS.

Den kvantitative bestemmelse og/eller påvisning af anti-protamin-serum-IgM med lav affinitet kan også anvendes til overvågning af effektiviteten af terapeutiske behandlinger, som en hjælp ved udvælgelse af passende personer til kliniske afprøvninger og til tilvejebringelse af en yderligere modalitet til diagnose af AIDS eller ARC. Man forestiller sig også, at påvisningen og/eller målingen af disse anti-protamin-antistoffer kan anvendes på tilsvarende måde ved prognosen og diagnosen af andre immunabnormaliteter.

De forskellige afprøvninger og metoder til påvisning og kvantitativ bestemmelse, som kan anvendes, er beskrevet i det følgende.

5.3. Afprøvninger af serumprotamin-reaktive IgM-antistoffer.

Ved en speciel udførelsesform for opfindelsen, ved hvilken afprøvningen sker til prognose og diagnose af AIDS, kan tilstedeværelsen af et undersæt at protaminreaktive IgM-serumantistoffer med lav affinitet afprøves ved en vilkårlig af de nedenfor beskrevne metoder. Som et eksempel kan en underpopulation af anti-protamin-IgM-antistoffer med lav affinitet identificeres, ved at et fastlagt volumen af antistofblandingen (f.eks. serum) får lov til at reagere med stigende mængder antigen. Efterhånden som koncentrationen af antigen vokser, mættes antistoffer med høj affinitet, og antistoffer med lavere affinitet vil reagere med antigen. Ved en foretrukket udførelsesform kan der anvendes ELISA, som er beskrevet i nedenstående afsnit 5.3.3 og 7.

5.3.1. Afprøvningssystemer.

Ethvert afprøvningssystem, som er kendt i teknikken, kan anvendes til kvantitativ bestemmelse og/eller påvisning af anti-protamin-IgM-antistofferne (eller antigenbindingsregionen deri) ifølge opfindelsen. Sådanne afprøvninger omfatter, men er ikke begrænset til f.eks. immunoafprøvninger,

herunder konkurrerende og ikke-konkurrerende afprøvningssystemer: radioimmunoafprøvninger, ELISA (enzymbundet immunosorbentafprøvning), "sandwich"-immunoafprøvninger, precipitinreaktioner, geldiffusionpreceptinreaktioner, immunodiffusionsafprøvninger, agglutineringsafprøvninger, komplementfikserings-afprøvninger, immunoradiometriske afprøvninger, fluorescensimmunoafprøvninger, protein A-immunoafprøvninger og immunoelektrophoreseafprøvninger, for blot at nævne nogle få.

5.3.2. Antigener.

De antigener, som kan anvendes ved afprøvningssystemer til kvantificering af protaminreaktive IgM-antistoffer, omfatter ethvert antigen, som omfatter en arginylklynge, især en sekvens omfattende 4 arginylrester, herunder en triplet, i et stykke på 6 aminosyrerester, eller en epitop, som er immunologisk krydsreaktiv med ovennævnte. Ved en udførelsesform er en sådan epitop med arginylklynge en epitop med en lineær sekvens. Ved en anden udførelsesform kan epitopen være afhængig af formen, idet den er et resultat af en konfiguration, som frembringer en antigenisk determinant omfattende 4 arginylrester, herunder en tripletklynge. Ved en specifik udførelsesform kan et peptid omfattende 4 arginylrester, herunder en triplet, i et stykke på 6 aminosyrerester anvendes som antigenet.

Derfor omfatter peptider, som kan anvendes som antigen, uden at være begrænset dertil, dem, som omfatter følgende sekvenser:

R R R R R R
X R R R R X
R R R R R X eller omvendt
R R R R X R " "
R R R X R R " "
R R R R X X " "
R R R X R X " "
R R R X X R " "
X R R R X R " "

hvor R betyder arginin, og X betyder en vilkårlig anden aminosyre. Andre antigener, som kan anvendes, omfatter, men er ikke begrænset til, dem, som er angivet i nedenstående tabel VII (se afsnit 6.2.5), nemlig de proteiner, som indeholder en sekvens på 4 arginylrester, herunder en triplet, i et stykke på 6 aminosyrerester. Desuden kan et vilkårligt protamin anvendes som antigenet, f.eks. humant protamin 1 (P1) og humant protamin 2 (P2). Protaminerne er mest tilfredsstillende som antigener, når deres ekstraktions- og rensningsproces omfatter et trin til blokering af cysteinylresterne imod dannelse af disulfidtværbindinger. Denne blokering kan gennemføres ved en vilkårlig af de kendte metoder, f.eks. aminoethylering, s-methylering og iodacetylering. Desuden kan protaminerne anvendes som antigener ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, selvom de ikke er blevet behandlet til inhibering af disulfidtværbinding mellem cysteinylrester.

Andre antigener, som kan anvendes ved immunoafprøvningerne ifølge opfindelsen, kan identificeres ved hjælp af deres evne til at blive bundet af det monoclonale anti-protamin-antistof-HpmAb (ATCC accessions nr. HB 9668), som erkender en epitop, som svarer til eller er identisk med den i de protaminreaktive IgM-antistoffer ifølge opfindelsen.

5.3.3. Afprøvningsmetode til forudsigelse af HIV-latensperioden.

Den her beskrevne afprøvnings- og beregningsmetode tilvejebringer en modalitet til forudsigelse af den sandsynlige HIV-latensperiode, før AIDS sætter ind, for et inficeret individ. En sådan information kan være værdifuld ved lægens behandling af individuelle patienter, ved projekteringen af det offentlige behov for faciliteter til lægebehandling og ved udvælgelsen af hensigtsmæssige personer til afprøvning af foreslåede terapeutiske midler. Den tilvejebringer ligeledes yderligere kriterier til AIDS-diagnose.

Den her beskrevne afprøvning og metode er kun et eksempel på udledningen af et kvantitativt indeks til anvend-

else ved AIDS-prognose, og andre sådanne eksempler, og modifikationer af den her beskrevne metode er ligeledes forudset og falder inden for opfindelsens rammer.

En enzymbundet immunosorbentafprøvning (ELISA), som kan påvise protaminreaktive serum-IgM-antistoffer med lav affinitetsbinding, kan gennemføres. ELISA gennemføres som beskrevet i sektion 7 nedenfor (se også beskrivelsen af figur 10A, afsnit 4 ovenfor) med stigende koncentrationer af antigen (f.eks. protamin 2) ved 2, 5, 10, 20 og 50 µg/ml. Kort fortalt består forsøgsmetoden af følgende trin:

(i) Antigenovertrækning.

Prøvehuller på en mikrotiterplade overtrækkes med antigen (50 µl foretrækkes) ved tilsætning af antigenopløsning til hullerne efterfulgt af en 4 timers inkubering. Med protamin 2 som antigen er de fortrinsvis anvendte antigenkoncentrationer 2 µg/ml og 20 µg/ml.

(ii) Blokering.

Antigenopløsning vaskes ud med puffer, og alle hullerne fyldes til randen med blokeringsopløsning til overtrækning af regioner, som ikke er overtrukket med antigen, hvorved ikke-specifik binding til huloverfladen inhiberes i de efterfølgende trin.

(iii) Binding af serumantistoffer.

Blokeringsopløsning vaskes ud, og fortyndet serum (50 µl fortrækkes) sættes til hvert enkelt hul. Hver prøveserum afprøves tredobbelt ved hver af de to fortyndinger. Det har vist sig, at serumfortyndinger 1:100 og 1:500 er egnede, når protamin 2 anvendes som antigen, og at de, for de fleste humane sera, har serumbaggrundsværdier, som er lave nok til, at der kan foretages gyldige fortolkninger af forsøgsresultaterne. Med forskellige peptider, som bærer det antigeniske sted, har andre par af serumfortyndinger, som varierer fra ufortyndet serum til en fortynding på 1:-1000, imidlertid vist sig anvendelige.

(iv) Påvisning af bundne IgM-antistoffer.

Efter tre timers forløb udvaskes serumfortyndingerne,

og 50 µl peroxidasemærket, andet antistof (anti-humant IgM) sættes til hvert enkelt hul. Efter 1,5 timers forløb vaskes det andet antistof ud, og 50 µl peroxidasesubstrat tilsættes. Efter 30 minutters forløb sættes der 50 µl 2,5 N svovlsyre til hvert enkelt hul for at standse indvirkningen af enzym (peroxidase) på substrat, hvorved frembringelsen af chromatisk produkt standses.

(v) Måling.

Pladen anbringes i en automatisk pladeaflæser, som bevæger pladen til centrering af hvert enkelt hul over en stråle af filtreret lys, således at den optiske tæthed (OT) af det indfaldende lys (f.eks. 490 nm) aflæses for hvert enkelt hul og noteres.

(vi) Beregning.

Derefter afbildes den optiske tæthed ved 490 nm ($O.D._{490}$) (y-akse) imod den reciprokke serumfortynding (x-akse) (se f. eks. figur 10 og 11 nedenfor). En stigning i hældning for reaktivitetskurven ved høj antigenkoncentration (se figur 10A) angiver tilstedeværelsen af et sekundært undersæt af protaminreaktive IgM-antistoffer (lav affinitet). Denne stigning ses ikke ved afprøvninger af sera fra patienter, som er diagnosticeret med AIDS (se figur 11A). Derfor kan den iagttagne fraværelse af stigningen i hældningen på reaktivitetskurven ved høj antigenkoncentration, som er repræsentativ for et undersæt af anti-protamin-IgM-antistoffer med lav affinitet, tilvejebringe en yderligere modalitet til diagnose af AIDS eller ARC.

Et beregningssystem kan konstrueres til kvantificering af dette undersæt af protaminraktive IgM-antistoffer med lav affinitet, dvs. til fastsættelse af den forholdsmæssige titer af det sekundære undersæt af protaminreaktive IgM-antistoffer, repræsenteret ved stigningen i hældning af reaktivitetskurven med høj antigenkoncentration, som følger: 2µg/ml og 20 µg/ml udvælges empirisk som egnede forsøgsantigenkoncentrationer. Stigningen af kurven mellem to punkter på x-aksen, serumfortyndingerne 1:100 (x1) og 1:500 (x2),

kan udtrykkes som forskellen mellem O.T.-værdierne på y-aksen for disse to punkter. Forøgelsen i stigning fra kurven for 2 µg antigen (protamin) til stigningen for kurven for 20 µg er (O.T.x1 - O.T.x2) ved 20 µg/ml antigen - (O.T.x1 - O.T.x2) ved 2 µg/ml antigen og kan noteres som í 20 - í 2.

Derefter beregnes værdier for í 20 - í 2. En værdi på "15" kan betragtes som værende den nedre grænse for det "normale" interval (se afsnit 7.2 nedenfor). En værdi i det normale interval for et HIV-serapositivt serum forudsiger en latensperiode på mindst 2 år, før AIDS manifesterer sig, og sandsynligvis længere, medens en lav (í 20- í 2)-værdi forudsiger, at fremadskriden til sygdommen er nært forestående.

Man må lægge mærke til, at det, når metoden er blevet anvendt på andre peptider, som bærer det designerede, antigeniske sted (se afsnit 5.3.2.), har vist sig, at man, resultater, selvom optimale resultater altid opnås, når forholdet mellem de to koncentrationer af antigenet er 1:10, også kan opnå gode resultater med andre koncentrationspar ved anvendelse af de forskellige alternative peptider, som bærer det designerede antigeniske sted.

Man må også lægge mærke til, at forskellige legemsvæsker fra en patient kan anvendes som afprøvningprøve, f.eks. serum eller plasma, idet serum foretrækkes til anvendelsen.

5.4. Terapi.

De protaminreaktive IgM-antistoffer med lav affinitet ifølge opfindelsen har potentiel anvendelse ved terapi af AIDS og andre immun-abnormaliteter. Det er forudset, at anti-protamin-antistofferne med lav affinitet kan have en rolle ved beskyttelse af et HIV-inficeret individ imod udbrud af AIDS. Antistofferne kan have lignende beskyttelsesvirkninger i individer, som er angrebet af, eller som er foruddisponerede for, andre tilstande med immunabnormalitet. Det er således forudset, at antistofferne ifølge opfindelsen kan give kortvarig beskyttelse hos en vært ved passiv immunoterapi, dvs. ved indgivelsen af således i forvejen dannet

anti-protamin-IgM med lav affinitet. Humant immunoglobulin vil være foretrukket til en sådan anvendelse, fordi et heterologt immunoglobulin vil fremkalde en immunreaktion mod dets fremmede, immunogeniske komponenter. Undersættet af protaminreaktive IgM-antistoffer med lav affinitet ifølge opfindelsen vil kunne isoleres fra humane sera i pulje i tilstrækkelige mængder til anvendelse ved passiv immunoterapi til forsinkelse af fremadskriden til AIDS i HIV-positive individer.

En molekylær clon med relation til de protaminreaktive antistoffer med lav affinitet ifølge opfindelsen kan fremstilles ved kendt teknik. Rekombinant-DNA-metodologi (se f.eks. T. Maniatis, 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) kan anvendes til konstruktion af nucleinsyresekvenser, som koder et monoclonalt antistofmolekyle eller en antigenbindende region deri, med egenskaber mage til dem hos de protaminreaktive antistoffer med lav affinitet.

Et monoclonalt museantistofmolekyle kan også være værdifuldt til anvendelse ved passiv immunoterapi ved konstruktion af molekyler af såkaldt kimærisk antistof. Der kan fremstilles molekyler af kimærisk antistof indeholdende et museantigenbindende domæne med human-konstante regioner (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851; Takeda et al., 1985, Nature 314:452).

Antistoffer kan renses ved kendt teknik f.eks. immunoabsorption eller immunoaffinitetschromatografi, chromatografiske metoder, såsom HPLC (væskechromatografi med høj ydeevne), eller en kombination deraf.

5.5. Diagnosesæt.

Opfindelsen angår også diagnosesæt til gennemførelse af de ovenfor beskrevne metoder. Ved en udførelsesform omfatter diagnosesættet (a) et peptid eller protein omfattende en sekvens på 4 arginylrester, herunder en triplet, i et stykke på 6 aminosyrerester (en "arginylklynge") og (b) et konjugat af en specifik bindingspartner for IgM-antistoffer

og en markering, som kan frembringe et påviseligt signal. I andre udførelsesformer kan diagnosesættet omfatte (a) et peptid eller protein omfattende en formafhængig epitop, hvilken epitop omfatter 4 arginylrester, herunder en tripletklynge, og (b) et konjugat som ovenfor. Ved endnu en udførelsesform kan sættet omfatte (a) et peptid eller protein, som er karakteriseret ved evnen til at blive bundet af HPmAb, og (b) et konjugat som ovenfor. Reagenserne kan også omfatte hjælpestoffer, såsom puffermidler og proteinstabilseringsmidler, f.eks. polysaccharider. Diagnosesættet kan endvidere, hvor dette er nødvendigt, omfatte andre komponenter af det signalfrembringende system, herunder f.eks. midler til nedsættelse af baggrundsinterferens, kontrolreagenser og et apparat til genenmførelse af et forsøg.

I en anden udførelsesform omfatter diagnosesættet et konjugat af et antistof, som er reaktivt med et peptid eller protein omfattende en sekvens på 4 arginylrester, herunder en triplet, i et stykke på 6 aminosyrerester, og en markering, som kan frembringe et påviseligt signal. I andre udførelsesformer kan der anvendes et konjugat af en markering og et antistof, som er reaktivt med et peptid eller protein omfattende en formafhængig arginylklyngeepitop eller et peptid eller protein karakteriseret ved erkendelse af HPmAb. Hjælpestoffer som nævnt ovenfor kan også være til stede.

I en foretrukket udførelsesform anvendes der et ELISA-sæt omfattende en sekvens på 4 arginylrester, herunder en triplet, i et stykke på 6 aminosyrerester immobiliseret på et fast bærestof og et konjugat af en specifik bindingspartner for IgM-antistoffer og en markering, som kan frembringe et påviseligt signal, og som er et enzym, såsom peberrodperoxidase.

6. Eksempel: Protaminreaktive, naturlige IgM-antistoffer i humane sera.

I de detaljerede eksempler er der beskrevet identifikationen af et sæt af naturlige IgM-antistoffer i humant serum, som er reaktive med protaminer, en klasse af basiske

nucleoproteiner med lav molekylvægt, som syntetiseres de novo i testis efter puberteten, og som er særegne for sperma. Disse antistoffer er blevet påvist ved ELISA i signifikant titer i alle 100 sera fra normale voksne mænd og kvinder og i 26 ud af 28 sera fra normale børn med alder på fra 7 dage til 2 år. Fælles træk mellem de protaminreaktive IgM-antistoffer i sera fra børn og voksne er blevet fastslået ved påvisning af lighed i antigenerkendelse og reaktionskinetik. Derfor er protaminernes rolle som enten i immunogenisk stimulans eller antigenisk mål i dette sæt af naturlige antistoffer ikke sandsynlig.

Det antigeniske sted, som erkendes af de protaminreaktive serum-IgM-antistoffer, er blevet karakteriseret ved sammenligning med mønstret for antigenerkendelse af et monoclonalt antistof mod humane spermaprotaminer (HPmAb). Ved anvendelsen af syntetiske peptider, som simulerer aminosyresekvenserne i forskellige segmenter af humant protamin 2 og af polyarginin, polylysin og histoner, som forsøgsantigener, ser det princip, som er karakteristisk for det antigeniske sted, som erkendes af både HPmAb og serum-IgM-antistofferne, ud til at være arginylrester i klynge med et tilsyneladende minimumkrav på 4 arginylrester, herunder en triplet, i et stykke på 6 aminosyrerester, og for begge har det vist sig, at reaktionen ikke er afhængig af ladningstiltrækning. En række immunoabsorptionsmetoder har antydet, at de protaminreaktive serum-IgM-antistoffer er et særskilt sæt med en høj grad af specificitet.

En undersøgelse af proteindatabaser har afsløret, at den formodentlige minimumepitop er til stede i 4 eller 5 humane, autogene proteiner, alle dele af immunsystemet, og i en række virusproteiner (tabel VII).

6.1. Materialer og metoder.

6.1.1. Enzymbundet immunosorbentafprøvning for serumantistoffer.

Den enzymbundne immunosorbentafprøvningsmetode (ELISA), ved hvilken data i nedenstående tabel I er blevet

indsamlet, og som er blevet anvendt gennem hele dette studium, er tidligere beskrevet (F.H. Pruslin et al., 1986, J. Immunol. Methods 94:99; T.C. Rodman et al., 1986, J. Immunol. Methods 94:105. Kort fortalt anbringes 50 µl antigen (specificeret koncentration) i hvert enkelt hul på en fladbundet mikrotiterplade med 96 huller, tildækkes og holdes ved stuetemperatur i 4 timer. Hullerne vaskes 20 gange med 0,01%'s "Tween^{A}-20" i phosphatpufret saltopløsning (PBS), fyldes derefter til randen med 5%'s okseserumalbumin (BSA) i PBS tildækkes og holdes ved 5°C natten over. Pladerne bringes op på stuetemperatur og vaskes 20 gange, og 20 µl serum eller monoclonalt antistof (mAb) (fortyndet med 1% BSA) sættes til hvert enkelt hul. Efter to timer ved stuetemperatur vaskes hullerne 20 gange, og 50 µl peroxidasekonjugeret, andet antistof [gede-F(ab')$_2$-anti-humant IgM, µ-kæde-specifikt, eller gede-F(ab')$_2$-anti-muse-IgA-, -IgG og -IgM] tilsættes. Pladerne tildækkes, holdes ved stuetemperatur i 1,5 timer og vaskes 20 gange. 50 µl substrat (orthophenyldiamin) sættes til hvert enkelt hul, og efter 30 minutters forløb standses reaktionen ved tilsætning af 50 µl H_2SO_4 (2,5 N). Den optiske tæthed af den farvede opløsning i hvert enkelt hul aflæses ved 490 nm i en automatiseret pladeaflæser. Denne protokol er udviklet til maksimering af følsomhed og til minimering af tvetydighed stammende fra serumbaggrunds- og plade-til-pladeforskelle i bindingseffektivitet (T.C. Rodman et al., 1986, J. Immunol. Methods 94:105).

6.1.2. Antigener.

Renset protamin 1 (P1) og protamin 2 (P2) fremstilles som beskrevet (T.C. Rodman et al., 1982, J. Cell. Sci. 53:-227) med modifikationer. Kort fortalt isoleres spermatozoer fra ejaculater i pulje og sonikeres til adskillelse af hoveder fra haler. Hovederne opsamles og adskilles ved behandling med "Triton^{A} X-100" i en membranproteinfraktion og en DNA-nucleoproteinfraktion. Sidstnævnte opløseliggøres i 4 M guanidiniumchlorid (GuCl), 1% 2-mercaptoethanol, og behandles med ethylenimin til aminoethylering af cysteinylresterne i

protaminerne, hvorved dannelse af disulfidbindinger forhindres, og dialyseres derefter imod 50 mM HCl og chromatograferes på en "BioRex^{A} 70"-kolonne med trinvis eluering med stigende koncentrationer af GuCl. Ring P1 viser sig i 23%'s eluatet, rent P2 (a og b) viser sig i 27%'s eluat, medens en række phosphorylerede varianter af P2 sammen med en del af P1 viser sig i en mellemliggende pulje (25%'s eluat). P1 og P2 (23 og 27%'s eluaterne) dialyseres hver især natten over imod 50 mM HCl efterfulgt af en 2-3 timers dialyse imod PBS, pH 7,2, og koncentrationen af hver enkelt måles ved en farvestofbindende afprøvning (M.M. Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72:248). De syntetiske peptider er blevet fremstillet ved metoden ifølge Merrifield (M.R. Merrifield 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149) og renset ved HPLC (væskechromatografi med høj ydeevne) med omvendt fase.

Polyarginin (molekylvægt 10.000-20.000 dalton) er fremskaffet fra Chemical Dynamics Corp. (Plainfield, NJ), og polylysin (molekylvægt 15.000-30.000 dalton) er fra Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

6.1.3. Monoclonale antistoffer.

mAb mod humane spermaprotaminer (HPmAb) fås ved immunicering af en BALB/c-mus med kerneproteinfraktionen fra humant sperma og fusion af miltcellerne med et ikke-udskillende musemyeloma. Ved præparering for det her beskrevne studium er hybridomakulturen blevet genclonet ved begrænsning af fortyndingen til sikring af monoclonalitet. HPmAb isoleres fra ascitesfluidum ved ammoniumsulfatudfældning og renses ved dialyse imod PBS forfulgt af DEAE-kolonnechromatografi (diethylaminoethyl, ionbytning).

mAb imod kyllingemyosin, anvendt som kontrol, fremstilles ligeledes ud fra ascitesfluidum.

6.1.4. Humane sera.

De normale, humane sera er enten afgivet af laboratoriepersonel eller opnået som kliniske prøver, som kun er identificeret med hensyn til fødselsdato, køn og "ingen fund".

6.1.5. Immunoabsorptioner.

For hver enkelt af immunoabsorptionsmetoderne er den vægt af absorberende protein, som er angivet i beskrivelsen af tegningen (afsnit 4 ovenfor), blevet koblet til 0,5 g cyanogenbromidaktiveret "Sepharose^{A}4B" (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) i en 0,7 x 10 cm kolonne. 40-50 µl serum fortyndet 1:50 med 1%'s BSA/natriumboratpuffer, pH 7,5, lægges i lag på kolonnen, som derefter blandes ved at vendes rundt natten over ved 4°C. Det absorberede serum tømmes ud af kolonnen og afprøves ved ELISA ved de noterede fortyndinger for reaktivitet med de designerede antigener.

6.1.6. Homologieftersøgning.

En eftersøgning efter proteiner, som bærer et segment på 6 rester betegnet som et segment med et minimum på 4 arginylrester, herunder en klynge på 3, er blevet gennemført af Protein Identification Source hos National Biomedial Research Foundation og suppleret med egne undersøgelser af den øjeblikkelige litteratur.

6.2. Resultater.

6.2.1. Protaminreaktive antistoffer forekommer i humane sera.

Data i tabel I viser, at protaminreaktive antistoffer er til stede i alle sera fra en gruppe af normale individer i alderen 0-60 år.

Tabel I

Forekomst af humane serumantistoffer, som er reaktive med humane spermaprotaminer.*

Alder	Antal afprøvet	IgM	IgG
0 (navlestrengsblod)	1	0	1
1 dag	2	0	2
2 dage	2	0	2
4 dage	3	0	3
5 dage	2	0	2
7 dage	3	2	3
10 dage	3	2	3
12-28 dage	11	11	11
1-12 måneder	9	9	9
1-2 år	4	4	4
voksen mand	41	41	41
voksen kvinde	59	59	59

* Alle sera er blevet afprøvet ved fortyndinger 1:100, 1:500, 1:1.000 med humane protaminer i pulje som antigen. Alle sera, som er betegnet som positive, udviser reaktivitet ved fortyndingen 1:500. Titere og IgM- og IgG-reaktivitet med protaminer er blevet beregnet i forhold til reaktiviteten af et referenceserum (F.H.Pruslin et al., 1986, J. Immunol. Methods 94:99; T.C. Rodman et al., 1986, J. Immunol. Methods 94:105). Negative IgM-værdier er under 1% af referenceserum, positive IgM-værdier for sera fra børn varierer fra 15% (7 dages nyfødt) til 65% af referenceserum, IgG-værdier er 40-90% af referenceserum. For sera fra voksne er intervallet for IgM-reaktivitet med protamin 54-180% af referenceserum, og for IgG-reaktiviteten er det 50-200%. De totale IgG- og IgM-titere for alle sera falder inden for det normale område for de respektive aldersgrupper (C. de Preval, 1982, Immunology, J.F. Bach og R.S. Schwartz, udg., John Wiley & Sons, New York, side 230).

Som det er vist i tabel I er protaminreaktive IgG-antistoffer til stede i alle sera, og IgM-antistoffer er til stede i sera fra de individer, hvis immunsystemer er modnet tilstrækkeligt til frembringelse af en signifikanat titer af IgM (C. de Preval, 1982, Immunology, J.F. Bach og R.S. Schwartz, udg., John Wiley & Sons, New York, side 230). En proportionalitet for det totale IgM repræsenteret ved det protaminreaktive IgM er blevet beregnet for hvert enkelt serum for en gruppe fra hver enkelt individkategori (figur 1). Beregningen definerer titeren af protaminreaktivt antistof sammenlignet med titeren af totalt IgM indenfor en tilsvarende afprøvningsprotokol. De værdier, som er afledt for denne proportionalitet, dvs. forholdet mellem protaminreaktivt IgM og totalt IgM, falder for alle befolkningsundergrupper inden for et relativt snævert interval (figur 1), hvilket antyder, at de protaminreaktive antistoffer repræsenterer en specifik komponent i normalt, humant serum.

6.2.2. Idenfikation af humane spermaprotaminer.

Kerneproteinerne i human sperma omfatter to protaminer, betenget P1 og P2. Bestemmelse af aminosyresekvenserne har vist, at P2 eksisterer som to varianter, P2a og P2b, som kun afviger ved, at P2a har tre yderligere rester ved sin NH_2-ende (Tabel IIA) (D.J. McKay et al., 1986, Eur. J. Biochem. 156:5; H. Ammer et al., 1986, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367:515).

Tabel II Aminosyresekvenser

A. Humane spermaprotaminer

P1 A R Y R C C R S Q S R S R Y Y R Q R Q R S R R R R R R S C Q T R R R A M R C C R

P2a R T H G Q S H Y R R R H C S R R R L H R I H R R Q H R S C R R R K R R S C R H R

P2b G Q S H Y R R R H C S R R R L H R I H R R Q H R S C R R R K R R S C R H R R R H

P1, fortsat P R Y R P R C R R H

P2a, fortsat R R H R R G C R T R K R T C R R H

P2b, fortsat R R G C R T R K R T C R R H

B. Syntetiske peptider (P2b-fragmenter)

Pepetider	Sekvenser
peptid 1 (P2b 16-25)	H R I H R R Q H R S
peptid 2 (P2b 26-35)	C R R R K R R S C R
peptid 3 (P2b 42-51)	R G C R T R K R T C

Det er fornyligt blevet påvist, at P1 og P2a,b kan fås, i renset form og i højt udbytte, separat ud fra en gruppe af phosphorylerede varianter af P2 (F.H. Pruslin et al., 1987, Gamete Res. 18:179). Disse fremstillinger af P1 og P2 foretrækkes til anvendelse som antigen ved fastfaseafprøvning, da de hver især er et lille molekyle med høj positiv ladning, hvilket begunstiger lineær orientering på polystyrenoverfladen, og der er ringe mulighed for intramolekylær tværbinding, da cysteinylresterne aminoethyleres ved fremstillingsprocessen (se afsnit 6.1.2), således at dannelsen af disulfidbindinger blokeres.

6.2.3. Specificitet af monoclonalt anti-protamin-antistof for protaminer: Definition af epitopen.

Der er blevet fremstillet et mAb (HPmAb) ved anvendelse af nucleoproteinfraktionen fra humant sperma som det immunogen, som er reaktivt med P1 og P2 og de phosphorylerede varianter af P2 og ikke med nogen anden komponent i humant sperma (figur 2). Gentagne afprøvninger, ved anvendelse af forskellige portioner af renset P1 og P2, har bekræftet, at HPmAb, selvom reaktiviteten med hver enkelt er af samme størrelsesorden, udviser større reaktivitet med P1, når det afprøves imod molære ækvivalenter af P1 og P2. Inspektion af den primære struktur af disse molekyler (Tabel IIA) afslører, at der ikke er udstrakt aminosyresekvenshomologi mellem de to, positionshomologi for fire rester inden for et stykke på seks rester udvises kun i tre segmenter: aminosyrerne 7-12 i P1 med 20-25 i P2b, 29-34 i P1 med 34-39 i P2b og 45-50 i P1 med 49-54 P2b. For hver enkelt, P1 og P2b, udgør argininrester imidlertid 48% af aminosyresammensætningen, og i hver af dem er et antal af arginylresterne i klynger. Selvom en større del af arginylresterne i P2 er grupperet i klynger på 2 eller flere rester, har P1 en enkelt klynge med 6 arginylrester. Analyse af aminosyresekvenserne antyder, at erkendelse af protaminerne af HPmAb kunne være afhængig af arginintætheden. Derfor er HPmAb blevet afprøvet imod tre syntetiske decapeptider (tabel IIB), som repræsenterer

segmenter af P2 udvalgt for forskellig tæthed af arginin og for variation i andre aminosyrer, og imod polyarginin, som repræsenterer maksimal arginintæthed.

Resultaterne er vist i tabel III.

Tabel III

Reaktivitet (OT_{490}) af monoclonalt antiprotaminantistof med syntetiske peptider (tabel II) og polyarginin

Forsøg *	Antigen	Anti-protamine-mAb (HPmAb), 1:1.000 fortynding	Myosin--mAb, 1:1.000 fortynding	Ikke-immuniseret museserum, 1:1000 fortynding
A	Peptid 1 (50)	0,06	0,06	
	Peptid 1 (10)	0,00	0,01	
	Peptid 2 (50)	0,33	0,05	
	Peptid 2 (10)	0,27	0,01	
	Peptid 3 (50)	0,25	0,05	< 0,04
	Peptid 3 (10)	0,11	0,01	
	Polyarginin (20)	0,82	0,08	
	Polyarginin (10)	0,80	0,08	
B	Peptid 1 (50)	0,06	0,04	
	Peptid 2 (50)	0,32	0,03	
	Peptid 3 (50)	0,05	0,04	

* Del A: Peptider ubehandlet. HPmAb er reaktivt med peptiderne 2 og 3 (ubehandlet) og med poyarginin.
Del B: Peptider aminoethyleret til blokering af dannelse af disulfidblandinger mellem cysteinylrester. Aminoethylering af peptider resulterer i eliminering af reaktivitet af HPmAb med peptid 3 og ingen ændring i reaktivitet for peptid 1 og 2. Kontrol-mAb- (anti-myosin-) og ikke -immuniseret museserum er ikke reaktive med peptiderne eller med polyarginin.

Den høje reaktivitet af HPmAb med polyarginin (tabel IIIA) understøtter den formodning, at erkendelsen er afhængig

af arginylrester i klynger, og antyder, at andre aminosyrer ikke er essentielle for erkendelse af epitopen. Peptid 1 udviser ingen reaktivitet med HPmAb, hvilket antyder, at en klynge på 2 arginylrester er utilstrækkelig til erkendelse, medens den beskedne, men virkelige reaktivitet af peptid 2 antyder, at en tæthed på 4 arginylrester, herunder en klynge på 3, i et stykke på 6 rester erkendes (tabel IIIA). Den tilsyneladende uoverensstemmelse, som udvises af reaktiviteten af peptid 3 (tabel IIIA), hvor de 4 arginylrester er enkeltvise, løses let. Når de syntetiske peptider anvendes som syntetiseret, dvs. ikke behandlet til blokering af cystein-cysteintværbindingen, udviser peptid 3 reaktivitet med HPmAb. Når de 3 peptider imidlertid behandles, såsom ved fremstillingen af protaminerne (se afsnit 6.1.2) til blokering af dannelsen af disulfidbindinger mellem cysteinylresterne, elimineres reaktiviteten af peptid 3 med HPmAb (tabel IIIB). Denne iagttagelse fortolkes som antydende, at de to cysteinylrester i peptid 3 er tværbundet i den ubehandlede tilstand, hvilket resulterer i en form, i hvilken de 4 enkelte arginylrester bringes i sammenstilling, således at disse rester er i hensigtsmæssig nærhed eller hensigtsmæssigt orienteret, således at antistoferkendelse finder sted. Med cysteinylresterne blokeret frembringes denne form ikke, og peptid 3 er ikke reaktivt med HPmAb (tabel IIIB). I samklang med denne iagttagelse ændres reaktiviteten af peptid 2, som formodentlig er afhængig af en tæthed på 4 arginylrester, herunder en triplet, og fraværelsen af reaktivitet i peptid 1 ikke ved behandlingen til blokering af cystein-cysteintværbinding (tabel IIIB).

Det specifikke krav fra HPmAb om en epitop, som omfatter en arginintriplet, er blevet yderligere dokumenteret, når HPmAb ingen reaktivitet udviser imod det mere dominerende sæt af basiske kerneproteiner, histonerne, og især imod det argininrige histon H3, hvori der er 2 argininddubletter, resterne 52, 53 og 128, 129, men ingen arginintriplet (R.J. DeLange et al., 1972, Porc. Natl. Acad. Sci. USA 69:882).

Den mulighed, at erkendelsen af HPmAb af en klynge på 3 eller flere arginylrester kun eller hovedsagelig skyldes en koncentreret, høj positiv ladning, er blevet sonderet yderligere ved sammenligning af reaktiviteten af HPmAb med polyarginin, som repræsenterer den maksimale positive nettoladning samt den maksimale arginintæthed, og med polylysin, som repræsenterer en næsten lige så høj positiv nettoladning (figur 3). Afprøvningsdata i figur 3 antyder, at specificiteten af HPmAb ikke er en erkendelse af en epitop med høj positiv ladning, men har relation til særegne egenskaber, som er iboende i en klynge af arginylrester.

Sammenligning af reaktivitetskurverne (figur 3 og 4) antyder større lighed i bindingskinetikken af HPmAb med P1 og polyarginin end med P1 og P2. For både P1 og polyarginin ser HPmAb ud til at være mættet ved lav antigenkoncentration. For polyarginin kan denne mættethed postuleres at skyldes en højere gentagelsesorden i epitopen, men i både P1 og P2 forekommer den formentlig minimale epitop på 6 aminosyrer (H.M. Geysen et al., 1987, Science 235:1184, i dette tilfælde på 6 aminosyrer med 4 arginylrester, herunder en klynge på 3, 2 gange. Den større reaktivitet af HPmAb med P1 (figur 4) kan derfor skyldes klyngen på 6 arginylrester, en arginintæthed, som ikke er til stede i P2 (tabel IIA).

Et resumé af ovenstående data fører til den formodning, at HPmAb reagerer med arginylrester i klynge, med aktivitetstyrken relateret til arginintætheden, med et minimumkrav på 4 i en epitop på 6 rester med 3 af arginylresterne i række eller tæt sammen til tilvejebringelse af en specifik konfiguration eller klynge på 3 arginylrester.

6.2.4. Protaminreaktive IgM-antistoffer til stede i normalt humant serum.

Egenskaberne af de protaminreaktive IgM-antistoffer i humant serum (tabel I) er blevet undersøgt ved sammenligning med de egenskaber, som er fastlagt for HPmAb, og ved bestemmelse af, om reaktiviteten beror på et specifikt undersæt af humane IgM-antistoffer.

De relative reaktiviteter af en repræsentativ gruppe af humane sera (voksen mand, voksen kvinde og barn) med P1 og P2 og polyarginin er blevet afprøvet (figur 5). Til trods for de forventede forskelle i absolut titer antyder ligheden mellem disse sera i rangorden for aktvitet med de 3 antigener ved hældningerne i kurverne for serumfortynding imod reaktivitet og i reaktionen på voksende antigenkoncentration, at serumaktiviteten er den hos et særskilt sæt IgM-antistoffer, som er til stede i alle normale sera. Data i figur 5 bekræfter også, at det protaminreaktive IgM-antistofsæt i sera fra børn har samme egenskaber som i sera fra voksne.

Overensstemmelse mellem immunoerkendelsesegenskaberne hos humane IgM-antistoffer og hos HPmAb er blevet påvist ved konkurrence-ELISA (figur 6). Inhiberingen ved hjælp af HPmAb af serumantistofreaktiviteten med både P1 og P2 er proportional med koncentrationen af HPmAb. Nærved 50% inhibering af serumreaktiviteten med P1 opnås ved en HPmAb-fortynding på 1:1000. I samklang med den iagttagelse, at HPmAb udviser større reaktivitet med P1 end med P2 (figur 2B og 4), angiver data i figur 6 også, at HPmAb udviser større konkurrence med P1-reaktiviteten af serumantistofferne end med P2-reaktiviteten.

Sikkerhed for, at blokeringen af serum-IgM-reaktiviteten med P1 og P2 skyldes en specifik epitoperkendelse af HPmAb, er tilvejebragt ved parallelle afprøvninger gennemført med et muse-mAb til kyllingemyosin og med normalt (ikke-immuniseret) museserum, idet ingen af dem udviser nogen inhibering af IgM-reaktiviteten af humant serum med P1 og P2.

Den omvendte konkurrenceafprøvning, dvs. blokering af HPmAb med humant serum, viser også, at den af HPmAb erkendte epitop udviser homologi med den, som erkendes af de humane protaminreaktive IgM-antistoffer (tabel IV).

Tabel IV

Konkurrence af humane sera (voksen mand, voksen kvinde, barn) med reaktivitet af HPmAb imod (A) P1 (10 µg/ml) og (B) P2 (10 µg(ml)*

Forsøg	Serum (1:100 fortynding)	HPmAb (1:1.000 fortynding) OT	% nedgang	HPmAb (1:10.000 fortynding) OT	% nedgang
A	0	0,79	--	0,74	--
	Voksen mand	0,71	10	0,65	12
	Voksen kvinde	0,70	12	0,65	12
	Barn	0,68	14	0,63	15
B	0	0,64	--	0,57	--
	Voksen mand	0,61	--	0,53	--
	Voksen kvinde	0,62	--	0,51	--
	Barn	0,58	10	0,51	11

* ELISA-protokollen er blevet modificeret ved indsættelse af et enkelt trin: før tilsætning af HPmAb sættes 50 µl humant serum til hvert enkelt hul, og efter 1 time (ved stuetemperatur) fjernes serum, og hullerne vaskes. Reaktiviteten påvises ved binding til peroxidasekonjugeret anti-muse-IgA, IgG og IgM.

OT: optisk tæthed.

Selvom den maksimale inhibering af humant serum, som er blevet afsløret ved den fastfaseblokeringsafprøvning, som er anvendt ved dette studium, kun er ca. 15% (tabel IV), har et repræsentativt serum fra hver enkelt af de humane befolkningsklasser, voksen mand, voksen kvinde og barn, haft tilsvarende blokeringsaktivitet. Denne iagttagelse er i overensstemmelse med, at sera fra voksne og børn udviser tilsvarende skelnen og aktivitet med de syntetiske peptider, som er anvendt til definition af epitopen af HPmAb (sammenlign tabel III og V).

Tabel V

Reaktivitet OT_{490}) af humane sera-IgM med syntetiske peptider fra tabel II): (A) Peptider ubehandlet (B) peptider aminoethyleret *

Forsøg	Peptid	Serum Voksen mand 1:100	Voksen mand 1:500	Voksen kvinde 1:100	Voksen kvinde 1:500	Barn 1:100	Barn 1:500
A	Peptid 1	0,12	0,09	0,02	0	0,07	0,02
	Peptid 2	0,72	0,24	0,70	0,29	0,63	0,19
	Peptid 3	0,82	0,24	0,47	0,18	0,56	0,20
B	Peptid 1	0,06	0,02	ND	ND	ND	ND
	Peptid 2	0,78	0,24	ND	ND	ND	ND
	Peptid 3	0,05	0,01	ND	ND	ND	ND

* Serumfortyndinger er vist over hver enkelt kolonne. IgM-antistoffer fra humant serum er ikke signifikant reaktive med peptid 1 ubehandlet eller behandlet, er reaktive med peptid 2, både ubehandlet og behandlet, og er reaktive med peptid 3 ubehandlet, men ikke, når peptidet behandles til forhindring af cystein-cystein-tværbinding (se tabel III). ND: ikke bestemt.

Data i tabel V, som viser, at reaktiviteten af serumantistofferne med de syntetiske peptider er parallel med reaktiviteten af HpmAb, tilvejebringer også yderligere støtte for den betragtning, at epitoperne for de to kategorier af antistoffer er ens. IgM-antistofferne i alle tre sera erkender, ligesom HPmAb gør (tabel III), peptid 2 i enten ethyleret eller ikke-ethyleret tilstand (cystein-cystein-tværbinding blokeret eller ublokeret), erkender ikke peptid 1 i nogen af tilstandene og erkender peptid 3, når det er ikke-ethyleret, men ikke, når det er ethyleret (tabel V).

Til sikring af, at serumaktiviteten med protaminer kan tilskrives et afgrænset sæt af IgM-antistoffer, er der blevet gennemført en række affinitetsabsorptionsprocesser. Først er det blevet påvist, at disse antistoffer skelner

mellem en fraktion af protaminer i pulje og en fraktion af spermamembranproteiner, der som tidligere vist (T.C. Rodman et al., 1985, Science 228:1211) omfatter otte eller ni proteiner, som er reaktive med naturligt forekommende antistoffer i humant serum. Efter absorption på en affinitetskolonnne, hvortil der bindes stigende mængder af protaminer i pulje, nedsættes serumreaktiviteten med protaminer progressivt til 0, medens der kun iagttages en mindre nedsættelse af serumaktiviteten med spermamembranproteinfraktionen (figur 7).

Som ved analysen af epitopen for HPmAb er den mulighed blevet taget i betragtning, at reaktiviteten af serum-antistofferne primært er en ladningsafhængig reaktion. Ligeledes er der, da autoantistoffer til histoner er blevet identificeret i både normale og pathologiske, humane sera (Y. Shoenfeld et al., 1987, Arthritis Rheum. 30:169), blevet foretaget en vurdering af evnen hos IgM-antistoffer fra humant serum til at skelne mellem protaminer og histoner. Som bekræftelse på den høje følsomhed af den ved dette studium anvendte ELISA-metode (F.H. Pruslin et al., 1986, J. Immunol. Methods 94:99; T.C. Rodman et al., 1986, J. Immunol. Methods 94:105) er der i forsøgsserum blevet påvist en høj titer af IgM-antistoffer, som er reaktive med rensede kalvethymushistoner (figur 8A). Efter absorption af en portion serum på en histonbundet affinitetskolonne er denne reaktivitet imidlertid elimineret, medens reaktiviteten af det histonabsorberede serum imod protaminer er praktisk taget uændret (fig. 8, B og C).

Yderligere sikkerhed for, at protaminreaktiviteten af et undersæt af IgM-antistoffer i humant serum ikke stammer fra ladningstiltrækning, er opnået ved hjælp af data i figur 9. Afprøvet med polylysin binder IgM-antistoffer i humant serum ikke til dette antigen. Når dette serum absorberes på en polylysinbundet affinitetskolonne, fjernes imidlertid reaktiviteten med polylysin, medens reaktiviteten med protaminer og med polyarginin bibeholdes (figur 9B). Når dette serum omvendt absorberes på polyarginin, bibeholdes reaktivi-

teten med polylysin, medens reaktiviteten med protamin 1, protamin 2 og polyarginin fjernes (figur 9C).

6.2.5. Antigeniske steder erkendt af HPmAb og immunoglobulinantistoffer fra humant serum svarer til hinanden og er måske identiske.

Tabel VI er en summarisk sammenligning af reaktiviteten af HPmAb, et muse-anti-protamin-IgG udskilt af et hybridoma og med rimeligt sikker monoclonalitet (se afsnit 6.1.3) og reaktiviteten af et specifikt undersæt af IgM-antistoffer i humane sera.

Tabel VI

Resumé af overensstemmelse af antigenerkendelse af HPmAb og protaminreaktive serum-IgM-antistoffer.

Antigen	ELISA HPmAb	ELISA Totalt serum--IgM	Protamin-reaktivt serum-IgM
P1	++	+	
P2	+	++	
Polyarginin	++	++	
Polylysin	-	+	--*
Peptid 1	-	-	
Peptid 1, ethyleret	-	-	
Peptid 2	+	+	
Peptid 2, ethyleret	+	+	
Peptid 3	+	+	
Peptid 3, ethyleret	-	-	
Kalvethymushistoner i pulje	-	+	-- **
Histoner H3	-	+	-- ***
Spermamembranproteiner	-	+	-- ****

* Serum absorberet på polylysin, polylysinreaktive antistoffer fjernet, protaminreaktive antistoffer bibeholdt.

** Serum absorberet på kalvethymushistoner, histonreaktive antistoffer fjernet, protaminreaktive antistoffer bibeholdt.

*** Som for **.

**** Serum absorberet på protaminer i pulje, protaminreaktive antistoffer fjernet, spermamembranproteinreaktive antistoffer bibeholdt.

Sammenligningen (tabel VI) angiver, at epitoperne for de to antistofsæt udviser en høj grad af homologi. Den principielle forskel, som er påvist af forsøgsprotokollerne ved dette studium, er en tilsyneladende rangorden for reaktivitet med de tre antigener, humant spermaprotamin 1, humant spermaprotamin 2 og polyarginin (sammenlign figur 3 og 4 med figur 5). En mulig forklaring på denne forskel kan være, at de forskellige undersæt af protaminreaktive, humane IgM-antistoffer, dvs. dem med forskellige bindingsaffiniteter, har moderat forskellige præferencer for arrangementet af arginylrester inden i epitopen eller for faktorer uden for epitopen, som har indflydelse på bindingsmønstrene (H.M. Geysen et al., 1987, Science 235:1184; T. Dryberg og M.B. A. Oldstone, 1986, J. Exp. Med. 164:1344). Det er imidlertid indlysende, at den dominerende og fælles egenskab hos den epitop, som erkendes af både HPmAb og serum-IgM-antistoffer, er arginylrester i klynge.

Da de protaminreaktive IgM-antistoffer er til stede i sera fra børn, som ikke har været udsat for sperma eller protaminer, er den mulighed blevet overvejet, at andre proteiner, som er autogene for mennesker med segmenthomologe til denne formodede epitop, kunne være beslægtede enten med hensyn til oprindelse (immunogenisk stimulering) eller til rolle (antigenisk erkendelse) med dette sæt af naturlige IgM-antistoffer. En eftersøgning er blevet foretaget i proteinsekvensdatabaser for segmenter på 6 aminosyrer med 4 arginylrester, herunder en klynge på 3. Resulaterne er vist i tabel VII.

Tabel VII

Andre proteiner end protaminer og spermaspecifikke histoner med et segment på 6 aminosyrer omfattende 4 arginylrester, hvoraf 3 er anbragt i en klynge.

	Protein	Rester
Humant	Komplement C3-forstadium	668-673
	Komplement C4A	1.426-1.431
	T celleoverfladeglyco-protein CD8-forstadium	208-213
	T celleoverfladeglyco-protein CD4-forstadium	422-427
	Udledt forstadium af ¡-kæde i histo compatibilitetsantigen	
Bacterier		
Escherichia coli	Replikationsiniterings-protein	57-62
		65-70
	Transposase	139-144
	nus-B-protein	3-8
	30 S ribosomalprotein	2-7
	Alanyl-tRNA-synthetase	430-435
	Diaminopimelatdecarboxy-lase	403-408
	DNA-dirigeret RNA-polyme-rase	197-202
		1.368-1.373
Serratia marcescens	Anthranilatsynthetase (komponent II)	157-163
Vira		
Herpes simplex (type 1)	Kinasebeslægtet, omdan-nende protein	141-146
Herpes simplex (type 2)	Glycoprotein D	364-369
Papillomavirus (type 6b)	Sandsynligt L2-protein	4-9
Papillomavirus (type II)	Sandsynligt L2-protein	3-8
		438-443
Papillomavirus (type 33)	Sandsynligt L2-protein	450-455
	Sandsynligt E6-protein	140-145
Papillomavirus (type 8)	Sandsynligt L2-protein	318-323
		327-332
Hepatitis B-virus (undertype AYW og 6 undertyper)	Kerneantigen	150-155
		155-160
		164-169
		171-176

Epstein-Barr-virus (stamme B95-8)	Hypotetisk BHLF 1--protein	157-162 282-287 407-412 532-537 2.085-2.090
	Hypotetisk BORF 1--protein	9-14
	Sandsynligt glycoprotein	528-533 837-842
	Hypotetisk BSLF 1--protein	859-864
	Hypotetisk BLLF 2--protein	53-58
	Hypotetisk BERF 3--protein	90-95 362-367
	Hypotetisk BRLF 1-- protein	86-91
Adenovirus 2	Mindre kerneprotein	315-320 331-336
	Sandsynligt tidligt E4-34K--protein	265-270
	Sandsynligt tidligt E4-13K -protein	70-75
	Sandsynligt tidligt E1B-21K--protein	157-162
	Sent L1-52K-protein	53-58
	Tidligt E2A-DNA-bindings-protein	46-51
	Hovedkerneproteinforstadium	100-105 152-157
	Terminalt protein	349-354 366-371
Adenovirus 5	Sandsynligt tidligt E1B-21K--protein	157-162
	Sent L1-52K-protein	54-59
	Tidligt E2A-DNA-bindings-protein	46-51
Adenovirus 7	Terminalt protein	338-343 355-360
Rhinovirus 2	Genompolyprotein	1.396-1.401
Gul febervirus (stamme 17D)	Genompolyprotein	1.720-1.707
Sindbisvirus (to (stammer)	Strukturelt polyprotein	22-27
	Ikke-strukturelt polyprotein	1.886-1.891
T-celleleukæmivirus (HTLV II)	env-polyprotein	305-310
HIV (HTLV III)	Trans-aktiverende transkriptionelt reguleringsprotein:	
	version 1	61-66
	version 2	39-44

Sekvensen, 6 aminosyrer med 4 arginylrester, herunder en klynge på 3, er blevet identificeret i alle de protaminer fra hvirveldyr og ikke-hvirveldyr eller spermaspecifikke histoner, som er blevet sekventeret, i nogle få bakterierproteiner, hovedsageligt fra Escherichia coli, og i en række virusproteiner (tabel VII). De eneste humane, autogene proteiner, som udviser denne sekvens, bortset fra protaminer, er 2 komplementforstadier, 2 T-celleglycoproteiner og 1 (udledt) variant af ¡-kæden i histokompatibilitetsantigener af klasse II (tabel VII).

6.3. Diskussion.

Der er blevet påvist et sæt af naturlige IgM-antistoffer i sera fra normale mænd og kvinder af alle aldersgrupper, hvilke antistoffer er reaktive med humane protaminer, de grundlæggende kerneprotaminer i sperma, og det minimale antigeniske sted med 6 rester er blevet identificeret som et med 4 arginylrester, herunder en klynge på 3. Da disse antistoffer er til stede i sera fra børn, som ikke har været udsat for protaminer, argumenteres der imod immunogenisk stimulering af protaminer som oprindelsen til disse antistoffer. Inden for sammenhængen af fornyligt erkendte, immunologiske mekanismer kan oprindelsen til disse antistoffer derfor tilskrives andre autogene molekyler med en sekvens, som er homolog med protaminets antigeniske sted, eller idiotoper på andre immunoglobuliner, som bærer billedet af det antigeniske protaminsted.

Muligheden for, at disse antistoffer er frembragt af et vilkårligt af de segmenter af humane proteiner, som er angivet i tabel VII, er interessant, da det antages, at de alle er involveret i immunoregulatoriske mekanismer, og at de alle kan være til stede i immunsystemet hos nyfødte. Da på den anden side den neonatale mave-tarm-kanal er befolket med E. coli, må den mulighed, at E. coli-proteiner (tabel VII) tilvejebringer den indledende stimulans for frembringelsen af de protaminreaktive antistoffer, også tages i betragtning. Den hypotese er blevet fremsat, at naturlige antistof-

fer kan stamme fra stimulering ved hjælp af tarmkanalens flora (S.V. Boyden, 1966, Adv. Immunol. 5:1).

Det er også muligt, at virusproteiner kan være det antigeniske mål for disse antistoffer. Den hypotese er blevet fremsat, at en rolle for naturlige antistoffer kan være et forsvar imod potentielle, inficerende stoffer (J.G. Michael et al., 1962, J. Exp. Med. 115:131).

Disse studier har tilvejebragt en afgrænsning af det antigeniske sted, hvormed et sæt af naturlige IgM-antistoffer i humane sera er reaktivt.

7. Eksempel: Protaminreaktive IgM-antistoffer med lav affinitet til stede i humane sera har relation til latensen af det humane immunomangelvirus.

I beskrivelsens detaljerede eksempler er der beskrevet anti-protamin-IgM-antistoffer med lav affinitetsbinding i humane sera, hvis tilstedeværelse i sera har relation til latensperioden mellem infektion med humant immunomangelvirus (HIV) og udbrud af AIDS.

Latensperioden mellem infektion med HIV og den kliniske manifestation af AIDS er yderst variabel, og den maksimale periode er endnu ikke blevet fastslået, lige som det er muligt, at nogle HIV-inficerede individer aldrig udvikler sygdommen. Der er her beskrevet identifikationen og en fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af en faktor, som ser ud til at angive evnen hos et HIV-inficeret individ til at modstå den patogene fremadskriden til AIDS. Denne faktor kan påvises i sera fra normale individer, og HIV-inficerede individer, som senere udviser en signifikant latensperiode, men den er fraværende eller mangelfuld i sera fra individer, som er diagnosticeret med AIDS, og sera fra HIV-inficerede individer, som, skønt de er symptomfrie på blodprøveudtagningstidspunktet, skrider frem til AIDS i løbet af et relativt kort tidsrum. Denne faktor er et undersæt af en population af IgM-antistoffer, som er reaktive med et specifikt antigenisk sted, som er karakteristisk for spermaprotaminer. Det kritiske undersæt af protaminreaktive IgM-antistoffer

ser ud til at være naturlige antistoffer. Den her beskrevne afprøvningsmetode tilvejebringer en modalitet til forudsigelse af den sandsynlige latensperiode for et HIV-inficeret individ.

7.1. Tilstedeværelsen i normale sera og fraværelsen i sera fra AIDS-patienter af protaminreaktive IgM-antistoffer med lav affinitet.

Det har vist sig, at der, når normale sera fra voksne afprøves ved ELISA med stigende koncentrationer af protaminer, fremkommer en skarp stigning i hældningen for kurven over aktiviteten (optisk tæthed, O.T.) imod serumfortynding ved de højere antigenkoncentrationer (figur 10A). Summariske kurver (figur 10B) for en tilsvarende afprøvning af 20 tilfældigt udvalgte, normale sera fra voksne har verificeret, at stigningen i hældning ikke er noget unormalt for et eller nogle få sera, men er en gennemgående egenskab hos normale sera fra voksne, hvilket antyder, at der, udover hovedantistofsættet, er et påviseligt sekundært undersæt af protaminreaktive IgM-antistoffer. Den mulighed, at det sekundære undersæt er et, som erkender en forskellig epitop på protaminmolekylet, eller er et med samme erkendelsesspecificitet som hovedsættet, men som udviser forskellige bindingsaffiniteter, er blevet afprøvet. Sammenlignelige afprøvninger (figur 10C) med samme sera som dem, som er afprøvet imod protamin ved som antigen at anvende et syntetisk decapeptid (DP), som omfatter en kopi af det antigeniske sted, som erkendes af de serumprotaminreaktive IgM-antistoffer (se afsnit 6 ovenfor), har antydet, at stigningen i hældning for aktivitetskurven for disse sera med høj antigenkoncentration ikke har kunnet tilskrives et undersæt med forskellig erkendelsesspecificitet, men har kunnet fortolkes som afslørende et undersæt, som er reaktivt med samme antigeniske sted, men med en påviselig lavere affinitet.

Når en gruppe på 15 sera fra patienter diagnosticeret med AIDS på samme måde er blevet afprøvet imod stigende koncentrationer af protamin, er stigningen i hældningen af

reaktivitetskurven ved høj antigenkoncentration, fortolket som et tegn på et andet undersæt af protaminreaktive IgM-antistoffer, ikke blevet iagttaget ved nogen afprøvninger (figur 11), selv ikke ved afprøvninger af de sera (figur 11A), som har en høj total titer af protaminreaktive IgM-antistoffer.

7.2. En kvantifikation af anti-protamin-antistoffer til forudsigelse af HIV-latens.

Da tilstedeværelsen i normale sera og fraværelsen i AIDS-sera af en specifik faktor har antydet muligheden for en sygdomsrelateret mangel, er der blevet udviklet et beregningssystem til kvantifikation af denne faktor, dvs. til bedømmelse af den forholdsvise titer af det sekundære undersæt af protaminreaktive IgM-antistoffer repræsenteret ved stigningen i hældning af reaktivitetskurven med høj antigenkoncentration. Ved undersøgelse af kurvesættene (figur 10A, B) er 2 µg/ml og 20 µg/ml blevet empirisk udvalgt som egnede forsøgsantigenkoncentrationer. Stigningen af kurven mellem to punkter på X-aksen, serumfortyndingerne 1:100 (x1) og 1:500 (x2), kan udtrykkes som forskellen mellem O.T.-værdierne på Y-aksen for disse to punkter. Forøgelsen i stigning fra kurven over 2 µg protamin til kurven over 20 µg er (O.T.x1-O.T.x2) ved 20 µg/ml protamin - (O.T.x1-O.T.x2) ved 2 µg/ml protamin og kan angives som í 20 - í 2.

Værdier for í 20 - í 2 er blevet beregnet for sera fra en gruppe voksne mænd og kvinder fra den almindelige befolkning (HIV-negative ved Western plet), en gruppe af patienter diagnosticeret som havende AIDS og en gruppe med risiko for AIDS (seropositive, homoseksuelle mænd) og diagnosticeret som symptomfrie eller med mild immunomangel (lav T4-tælling eller lavt mitotisk stimuleringsindeks eller begge dele, men intet andet unormalt) på det tidspunkt, hvor blodprøven udtages. For nogle af sidstnævnte har en klinisk opfølgningsbedømmelse været til rådighed som anført. Resultaterne er vist i figur 12.

Ved undersøgelse af figur 12A er en værdi på 15 blevet

betragtet som den nedre grænse for det "normale" område. På denne basis er procentdelen for hver enkelt gruppe af sera inden for normalområdet blevet bestemt (tabel VIII).

Tabel VIII

Protentdel af sera i det normale område for antiprotamin-IgM-niveauer for hver patientgruppe

	Gruppe	Totalt	% i normalt område
A	normale	57	95
B	AIDS	31	6
C	symptomfrie --> AIDS	14	0
D	symptomfrie --> symptomfrie	10	90
E	symptomfrie --> ukendt skæbne	10	50

De data, som er vist i figur 12, antyder, at en í 20 - í 2-værdi i normalområdet i et HIV-positivt serum forudsiger en latensperiode på mindst 2 år før en manifestation af AIDS, sandsynligvis længere, medens en lav í 20 -í 2-værdi forudsiger, at fremadskriden til sygdommen er nært forestående.

Den omstændighed, at værdierne for grupperne A og D og værdierne for grupperne B og C udgør to adskilte fordelinger, medens værdierne for gruppe E omfatter begge fordelinger (figur 12), antyder, at sættet af intervaller mellem HIV-seropositivitet og AIDS-manifestation for hver enkelt af grupperne C og D er karakteristisk og relevant.

7.3. Bekræftelse af eksistensen af et undersæt af protaminreaktive antistoffer med lav affinitet.

Undersættet af protaminreaktive IgM-antistoffer repræsenteret ved í 20 - í 2 er blevet skelnet som værende med "lav affinitet". Antistofaffinitet er et udtryk for den styrke, med hvilken antistoffet binder til et antigen, som det erkender. Denne binding er afhængig af den sammensatte virkning af de intermolekulære kræfter, f.eks. hydrogenbin-

ding, hydrophobicitet, ionisk vekselvirkning (F. Karysh, 1962, Adv. Immunol. 2:1-40). Et mål for bindingsstyrken kan fås for bindingen af homogent antistof til en hapten eller en enkelt antigenisk determinant og, ved anvendelse af massevirkningsloven, udtrykkes som affinitetkonstanten. Affinitetskonstanten har derfor direkte relation til modstandsevnen mod dissociation af antistof/antigen-komplekset.

Da det er kendt, at en række antistoffer med forskellige affiniteter fremkommer som reaktion på en enkelt immunologisk påvirkning (T.P. Werblin et al.,1972, Immunochem. 9:987-1011), har megen opmærksomhed været viet og mange metoder udviklet til bestemmelse af de separate, "tilsyneladende" affinitetskonstanter for en population af antistoffer, som er reaktive med samme antigeniske determinant (J. Steensgaard et al., 1980, Mol. Immunol. 17:689-698; A.M. Lew, 1984, Immunol. Meth. 72:171-176; E. Sciutto et al., 1987, Mol. Immunol. 24:577-585). Selvom disse metoder og deres anvendelser er blevet modsagt og forsvaret, er et værdifuldt empirisk princip dukket op: I et antistof, som er heterogent for affinitet, vil antistofferne med høj affinitet binde til antigen og modstå dissociation fra antigen med større held end antistoffer med lav affinitet. Derfor kan antistofunderstofpopulationer med forskellige affiniteter for samme antigen identificeres, ved at et fastlagt volumen af antistofblandingen (f.eks. serum) tillades at reagere med voksende mængde antigen. Efterhånden som koncentrationen af antigen vokser, mættes antistoffer med høj affinitet, og antistoffer med lavere affinitet vil reagere med antigen. Bevismateriale fra forsøg har også vist, at sådanne antistofserier hyppigt har unimodale eller bimodale affinitetsfordelinger, med en eller to hovedunderpopulationer (A. Gandolfi et al., 1981, Theor. Biol. 92:57-84). I overensstemmelse med dette princip kan det undersæt af antistoffer, som er repræsenteret ved í 20 - í 2, dvs. det, som påvises ved høj antigenkoncentration, betragtes som repræsenterende en population med lavere affinitet end hovedpopulationen, som påvises ved lavere anti-

genkoncentrationer.

Bekræftende beviser for den formodning, at í 20 - í 2-værdien repræsenterer et undersæt med lavere affinitet end hovedpopulationen i protaminreaktive IgM-antistoffer, er opnået, ved at bindingsreaktionen er gennemført ved forhøjet NaCl-molaritet, hvilket eliminerer fasen med antistofbinding på grund af ionisk vekselvirkning. Fortyndingsmidlet for det afprøvede serum justeres fra 0,15 M NaCl til 0,3 M NaCl. Reaktivitetskurverne for de afprøvninger, som er gennemført i dette medium (figur 10D), viser, at forøgelsen i kurvens stigning ved høje antigenkoncentrationer (figur 10A, 10B) er elimineret, og at í 20 - í 2-værdierne er bemærkelsesværdigt formindskede. Eliminering af fasen med antistofbinding på grund af ionisk vekselvirkning, som antages at være en bindingskomponent med lav energi (F. Karysh, 1962, Adv. Immunol. 2:1-40) ser ud til at resultere i en fortrinsvis eliminering af bindingen af undersættet af antistoffer med lav affinitet (figur 10A, 10D).

7.4. Sera fra børn indeholder en population af protaminreaktive IgM-antistoffer, som er homogen i bindingsaffinitet.

Som beskrevet ovenfor i afsnit 6 indeholder sera fra klinisk normale børn protaminreaktive IgM-antistoffer med samme antigenerkendelsesspecificitet som dem i sera fra voksne. Når sera fra børn er blevet afprøvet med stigende koncentrationer af P2 (figur 13A) og DP (figur 13B) angiver det faktum, at kurverne er parallelle, at de protaminreaktive IgM-antistoffer i sera fra børn, til forskel fra normale sera fra voksne, er en homogen (eller unimodal) population med hensyn til bindingsaffinitet.

7.5. Naturligt forekommende anti-protamin-antistoffer.

De protaminreaktive IgM-antistoffer, som findes i sera fra børn, kan ikke tilskrives immunogenisk stimulering ved hjælp af protamin, da protaminer synthetiseres de novo i testis efter puberteten og heller ikke er inkorporeret i andre cellekerner end dem fra den spermiogeniske række.

Heller ikke kan de protaminreaktive IgM-antistoffer i sera fra 12 dage gamle eller ældre (se afsnit 6 ovenfor) nyfødte tilskrives oprindelse hos moderen, da IgM ikke krydser placenta. Det identificerede, antigeniske sted for de protaminreaktive antistoffer har en meget begrænset forekomst i andre humane, endogene proteiner end protaminer (se afsnit 6.2.5 ovenfor). Det er derfor rimeligt at slutte, at de protaminreaktive IgM-antistoffer fra sera fra børn er naturlige antistoffer, og ved ekstrapolering at et af de to undersæt af de protaminreaktive IgM-antistoffer fra sera fra voksne består af naturlige antistoffer.

Protaminer sekvestreres fra immunsystemet under deres syntese og cellulære inkorporering (M. Dym og D.W. Fawcett, 1970 Bio. Reprod. 3:308-326), og det er nu vist, at protaminer er ikke-immunoundertrykkende, dvs. de inhiberer ikke T-cellemitogenesis in vitro, således som andre fra sperma stammende proteiner gør (T.C. Rodman et al., 1985, Science 228:1211-1215. Derfor kan sera fra mænd efter puberteten og kvinder med seksuel erfaring indeholde nogle protaminreaktive antistoffer, som kan tilskrives immunogenisk frembringelse af protaminer. Derfor postuleres det, at de protaminreaktive IgM-antistoffer i humant sera fra voksne omfatter to undersæt, som har forskellig oprindelse: (1) naturlige antistoffer, (2) frembragte antistoffer.

Ovenstående diskussion og forsøgsresultater viser, at de protaminreaktive antistoffer i sera fra børn er naturlige antistoffer, og antyder, at de naturlige, protaminreaktive antistoffer i sera fra børn svarer til undersættet af protaminreaktive IgM-antistoffer med lav affinitet i sera fra voksne.

Det foreslås, at manglen på et (potentielt naturligt) undersæt af protaminreaktive antistoffer med lav affinitet i HIV-positive sera (figur 11, 12) kan have relation til den patogenetiske fremadskriden til AIDS, enten som et indeks eller som en bidragende faktor.

Den her beskrevne afprøvnings- og beregningsmetode

tilvejebringer en modalitet til forudsigelse af den sandsynlige latensperiode, før AIDS sætter ind, for et HIV-inficeret individ. En sådan information kan være værdifuld ved lægens behandling af individuelle patienter, ved projekteringen af det offentlige behov for faciliteter til lægebehandling og ved udvælgelsen af hensigtsmæssige personer til afprøvning af forelsåede terapeutiske midler.

8. Deponering af hybridoma.

Hybridomacellelinie HPmAb, som producerer det monoclonale anti-protamin-antistof HPmAb er blevet deponeret hos American Type Culture Collection, Rockville, MD, den 23. marts 1988 og er blevet tildelt accessions nr. HB 9668.

Den foreliggende opfindelse skal ikke være begrænset i omfang af den deponerede cellelinie, da den deponerede udførelsesform er tilsigtet som en enkelt illustration af et aspekt ved opfindelsen, og alle cellelinier, som er funktionelt ækvivalente, falder inden for opfindelsens rammer. Faktisk vil forskellige modifikationer af opfindelsen ud over dem, som er vist og beskrevet i nærværende beskrivelse, være indlysende for fagfolk på området ud fra ovenstående beskrivelse og de ledsagende tegninger. Sådanne modifikationer skal forstås som faldende inden for rammerne af de tilhørende patentkrav.

Patentkrav

1. Humant eller naturligt IgM-antistof eller et fragment deraf omfattende Fv-regionen, kendetegnet ved, at det binder til et humant protamin.

2. Humant eller naturligt IgM-antistof eller et fragment deraf omfattende Fv-regionen, kendetegnet ved, at det binder til et peptid eller protein omfattende 4 arginylrester, herunder en triplet, i en sekvens på 6 aminosyrerester.

3. Humant eller naturligt IgM-antistof eller et fragment deraf omfattende Fv-regionen, kendetegnet ved, at det binder til et peptid eller protein omfattende en formafhængig epitop, som omfatter 4 arginylrester, herunder en tripletklynge.

4. Humant eller naturligt IgM-antistof eller et fragment deraf omfattende Fv-regionen, kendetegnet ved, at det binder til en epitop, som er karakteriseret ved evnen til at blive bundet af et monoclonalt antistof HPmAb som produceret af det hybridoma, som har ATCC accessionsnummer HB 9668.

5. Antistof ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det binder protaminet med lav affinitet i forhold til bindingsaffiniteter, som udvises af en hovedpart af protaminspecifikke IgM-antistoffer, som er til stede i sera fra et sundt, voksent menneske.

6. Antistof ifølge krav 2, kendetegnet ved, at det binder peptidet eller proteinet med lav affinitet i forhold til bindingsaffiniteter, som udvises af en hovedpart af protaminspecifikke IgM-antistoffer, som er til stede i sera fra et sundt, voksent menneske.

7. Antistof ifølge krav 3, kendetegnet ved, at det binder peptidet eller proteinet med lav affinitet i forhold til bindingsaffiniteter, som udvises af en hovedpart af protaminspecifikke IgM-antistoffer, som er til stede i sera fra et sundt, voksent menneske.

8. Antistof ifølge krav 1, 2, 3 eller 4, kende-

t e g n e t ved, at det er polyclonalt.

9. Antistof ifølge krav 5, 6 eller 7, k e n d e t e g n e t ved, at det er polyclonalt.

10. Fragment af antistoffet ifølge krav 1, 2, 3 eller 4, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter Fv-regionen.

11. Antistof ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at protaminet er et humant protamin.

12. Antistof ifølge krav 11, k e n d e t e g n e t ved, at protaminet er humant protamin 1 eller humant protamin 2.

13. Fremgangsmåde til prognose eller diagnose af AIDS hos et individ, k e n d e t e g n e t ved, at man påviser eller måler protaminspecifikke IgM-antistoffer med lav affinitetsbinding, som er til stede i en legemsvæske fra individet, hvor den lave affinitetsbinding udvises i forhold til bindingsaffiniteter af en hovedpart af protaminspecifikke IgM-antistoffer, som er til stede i legemsvæsken fra individet eller i legemsvæsken fra et sundt, voksent menneske, og hvori fraværelsen eller nedsatte niveauer af antistofferne med lav affinitetsbinding i forhold til niveauerne i legemsvæsken fra et sundt, voksent menneske angiver tilstedeværelse eller indtræden af AIDS hos individet i løbet af ca. 2 år.

14. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at antistofferne med lav affinitetsbinding påvises eller måles ved en fremgangsmåde, som omfatter et første trin, hvor legemsvæsken bringes i kontakt med et peptid eller protein omfattende 4 arginylrester, herunder en triplet, i en sekvens på 6 aminosyrerester, således at der dannes et immunospecifikt kompleks mellem antistoffer med lav affinitetsbinding og peptidet eller proteinet.

15. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at antistofferne med lav affinitetsbinding påvises eller måles ved en fremgangsmåde, som omfatter, at legemsvæsken bringes i kontakt med et peptid eller protein omfattende en formafhængig epitop, som omfatter 4 arginyl-

rester, herunder en tripletklynge, således at der dannes et immunospecifikt kompleks mellem antistoffer med lav affinitetsbinding og peptidet eller proteinet.

16. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at antistofferne med lav affinitetsbinding påvises eller måles ved en fremgangsmåde, som omfatter et første trin, hvor legemsvæsken bringes i kontakt med en epitop, som er karakteriseret ved evnen til at blive bundet af et monoclonalt antistof HPmAb som produceret af hybridomaet med ATCC accessionsnummer HB 9668.

17. Fremgangsmåde ifølge krav 13, 14, 15 eller 16, k e n d e t e g n e t ved, at den yderligere omfatter, at de protaminspecifikke IgM-antistoffer bringes i kontakt med en mærket bindingspartner for de protaminspecifikke IgM-antistoffer, således at der sker immunospecifik binding af de protaminspecifikke IgM-antistoffer til bindingspartneren, og at den immunospecifikke binding til bindingspartneren påvises eller måles ved påvisning eller måling af mærkningen.

18. Fremgangsmåde ifølge krav 14, 15 eller 16, k e n d e t e g n e t ved, at peptidet eller proteinet er immobiliseret.

19. Fremgangsmåde ifølge krav 18, k e n d e t e g n e t ved, at den yderligere omfatter, at de protaminspecifikke IgM-antistoffer bringes i kontakt med en mærket bindingspartner for de protaminspecifikke IgM-antistoffer, således at der sker immunospecifik binding af de protaminspecifikke IgM-antistoffer til bindingspartneren, og at den immunospecifikke binding til bindingspartneren påvises eller måles ved påvisning eller måling af den immobiliserede mærkning.

20. Fremgangsmåde ifølge krav 14, 15 eller 16, k e n d e t e g n e t ved, at antistofferne med lav affinitetsbinding påvises eller måles ved en fremgangsmåde, som yderligere omfatter et andet trin, hvor legemsvæsken bringes i kontakt med peptidet eller proteinet, således at der dannes et immunospecifikt kompleks mellem de protaminspecifikke antistoffer

og peptidet eller proteinet, og hvor peptidet eller proteinet forligger i en forhøjet koncentration i forhold til første trin, og således at der dannes en mængde immunospecifikke komplekser mellem antistofferne med lav affinitetsbinding og peptidet eller proteinet, som er forøget i forhold til mængden i første trin.

21. Fremgangsmåde ifølge krav 18, k e n d e t e g n e t ved, at antistofferne med lav affinitetsbinding påvises eller måles ved en fremgangsmåde, som yderligere omfatter et andet trin, hvor legemsvæsken bringes i kontakt med peptidet eller proteinet, således at der dannes et immunospecifikt kompleks mellem de protaminspecifikke antistoffer og peptidet eller proteinet, og hvor peptidet eller proteinet foreligger i en forhøjet koncentration i forhold til første trin, og således at der dannes en mængde immunospecifikke komplekser mellem antistofferne med lav affinitetsbinding og peptidet eller proteinet, som er forøget i forhold til mængden i første trin.

22. Diagnosesæt, k e n d e t e g n e t ved, at det i én eller flere beholdere omfatter

(a) et peptid eller protein omfattende en sekvens på 4 arginylrester, herunder en triplet, i en sekvens på 6 aminosyrerester og

(b) et konjugat af en specifik bindingspartner for IgM-antistoffer og en mærkning, som kan frembringe et påviseligt signal.

23. Diagnosesæt, k e n d e t e g n e t ved, at det i én eller flere beholdere omfatter

(a) et peptid eller protein omfattende en sekvens på 4 arginylrester, herunder en triplet, og

(b) et konjugat af en specifik bindingspartner for IgM-antistoffer og en mærkning, som kan frembringe et påviseligt signal.

24. Diagnosesæt, k e n d e t e g n e t ved, at det i én eller flere beholdere omfatter

(a) et peptid eller protein karakteriseret ved evnen

til at blive bundet af et monoclonalt antistof HPmAb som produceret af hybridomaet med ATCC accessionsnummer HB 9668 og

(b) et konjugat af en specifik bindingspartner for et IgM-antistof og en mærkning, som kan frembringe et påviseligt signal.

25. Diagnosesæt ifølge krav 22, 23 eller 24, k e n d e t e g n e t ved, at proteinet er et protamin.

26. Diagnosesæt ifølge krav 22, 23 eller 24, k e n d e t e g n e t ved, at peptidet eller proteinet er immobiliseret.

27. Diagnosesæt ifølge krav 26, k e n d e t e g n e t ved, at den specifikke bindingspartner er et anti-IgM-antistof, og at mærkningen er et enzym.

28. Diagnosesæt, k e n d e t e g n e t ved, at det i én eller flere beholdere omfatter et konjugat af (a) et antistof, som er specifikt for et peptid eller protein omfattende 4 arginylrester, herunder en triplet, i en sekvens på 6 aminosyrerester, og (b) en mærkning, som kan frembringe et påviseligt signal.

29. Diagnosesæt, k e n d e t e g n e t ved, at det i én eller flere beholdere omfatter et konjugat af (a) et antistof, som er specifikt for et peptid eller protein omfattende en formafhængig epitop, som omfatter 4 arginylrester, herunder en tripletklynge, og (b) en mærkning, som kan frembringe et påviseligt signal.

30. Diagnosesæt, k e n d e t e g n e t ved, at det i én eller flere beholdere omfatter et konjugat af (a) et antistof, som er specifikt for et peptid eller protein karakteriseret ved evnen til at blive bundet af et monoclonalt antistof HPmAb som produceret af hydridomaet med ATCC accessionsnummer HB 9668 og (b) en mærkning, som kan frembringe et påviseligt signal.

31. Fremgangsmåde ifølge krav 20, k e n d e t e g n e t ved, at den yderligere omfatter, at de protaminspecifikke IgM-antistoffer med lav affinitetsbinding bringes i

kontakt med en mærket bindingspartner for de protaminspecifikke IgM-antistoffer med lav affinitetsbinding, således at der sker immunospecifik binding af de protaminspecifikke IgM-antistoffer med lav affinitetsbinding til bindingspartneren, og at den immunospecifikke binding til bindingspartneren påvises eller måles ved påvisning eller måling af mærkningen.

32. Antistof af IgM-isotypen, k e n d e t e g n e t ved, at det konkurrerende inhiberer den immunospecifikke binding til en epitop af monoclonalt antistof HPmAb som produceret af hybridomaet med ATCC accessionsnummer HB 9668.

33. Antistof af IgM-isotypen, k e n d e t e g n e t ved, at det er konkurrerende inhiberet i sin immunospecifikke binding til en epitop af monoclonalt antistof HPmAb som produceret af hybridomaet med ATCC accessionsnummer HB 9668.

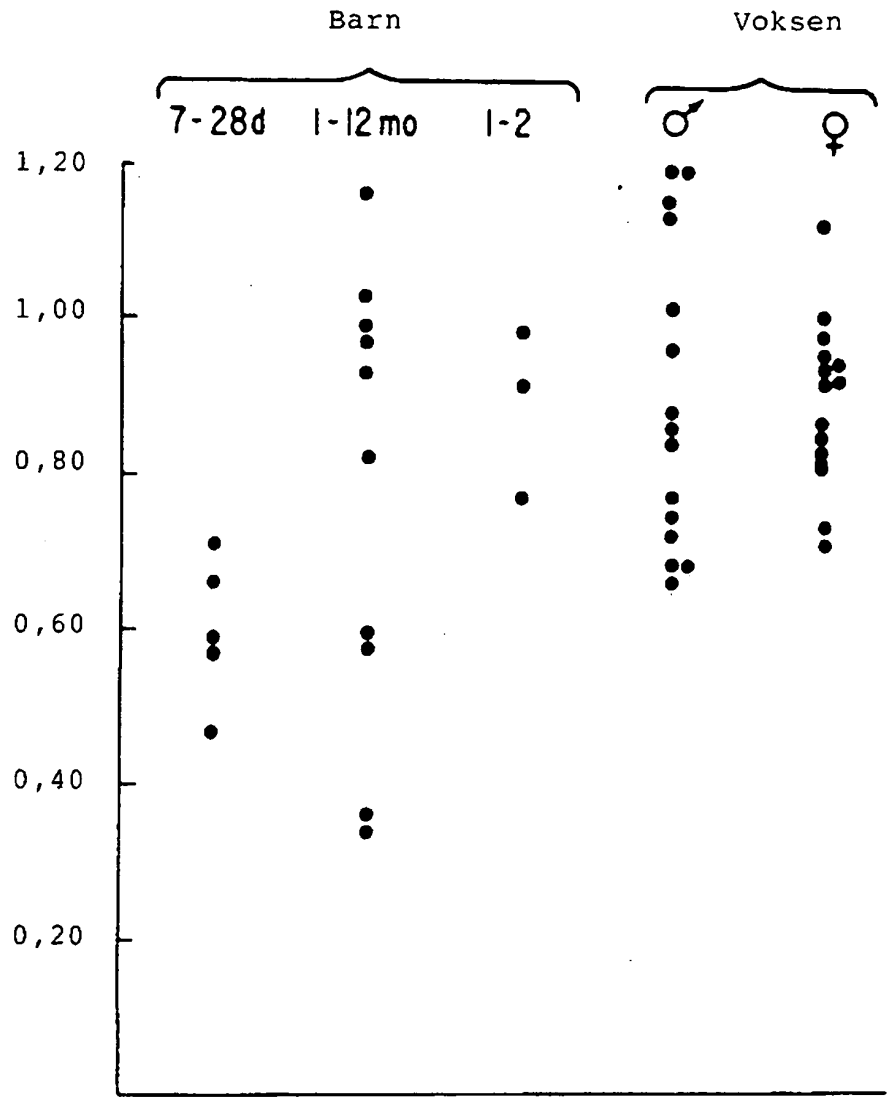


FIG. 1

FIG. 2A

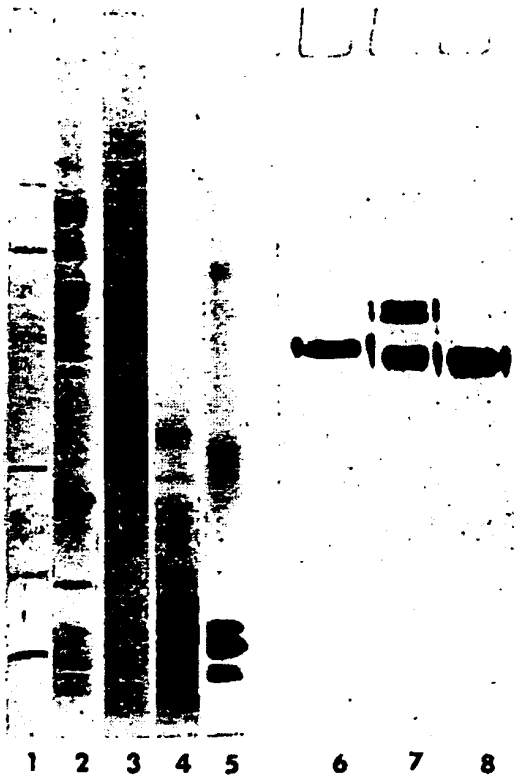


FIG. 2B

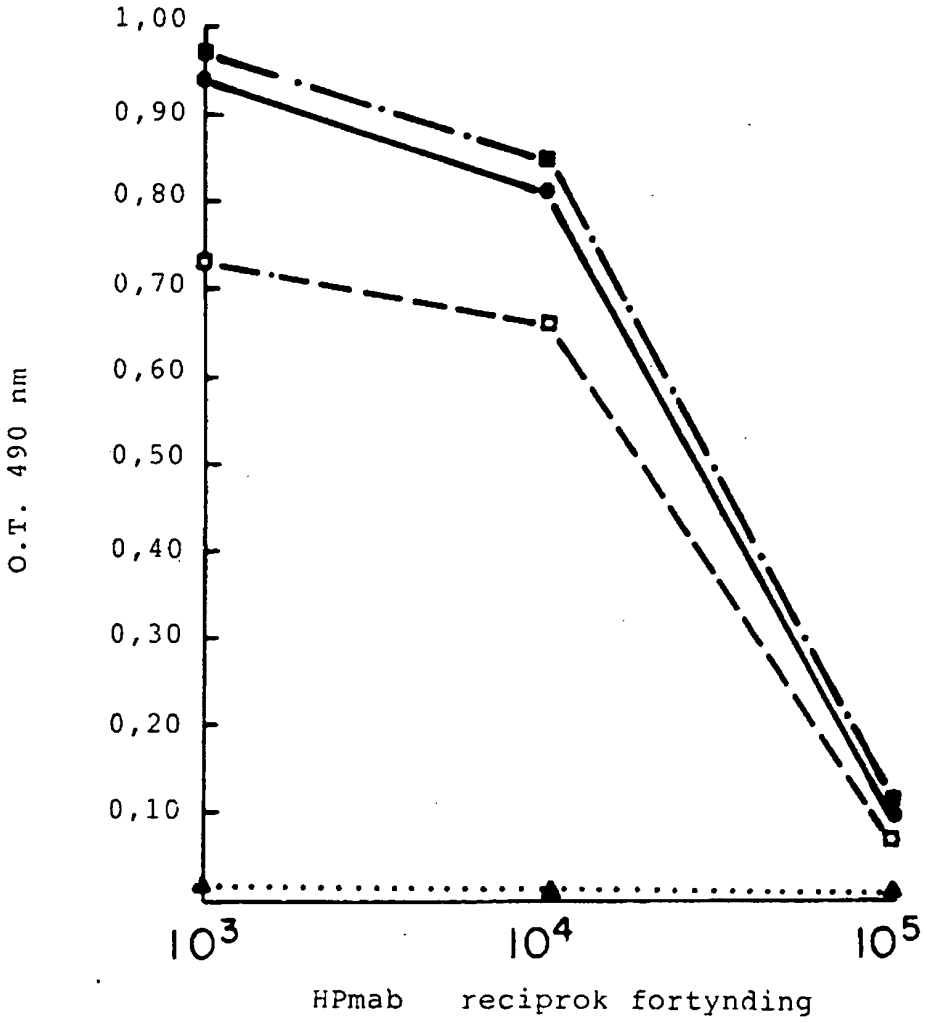
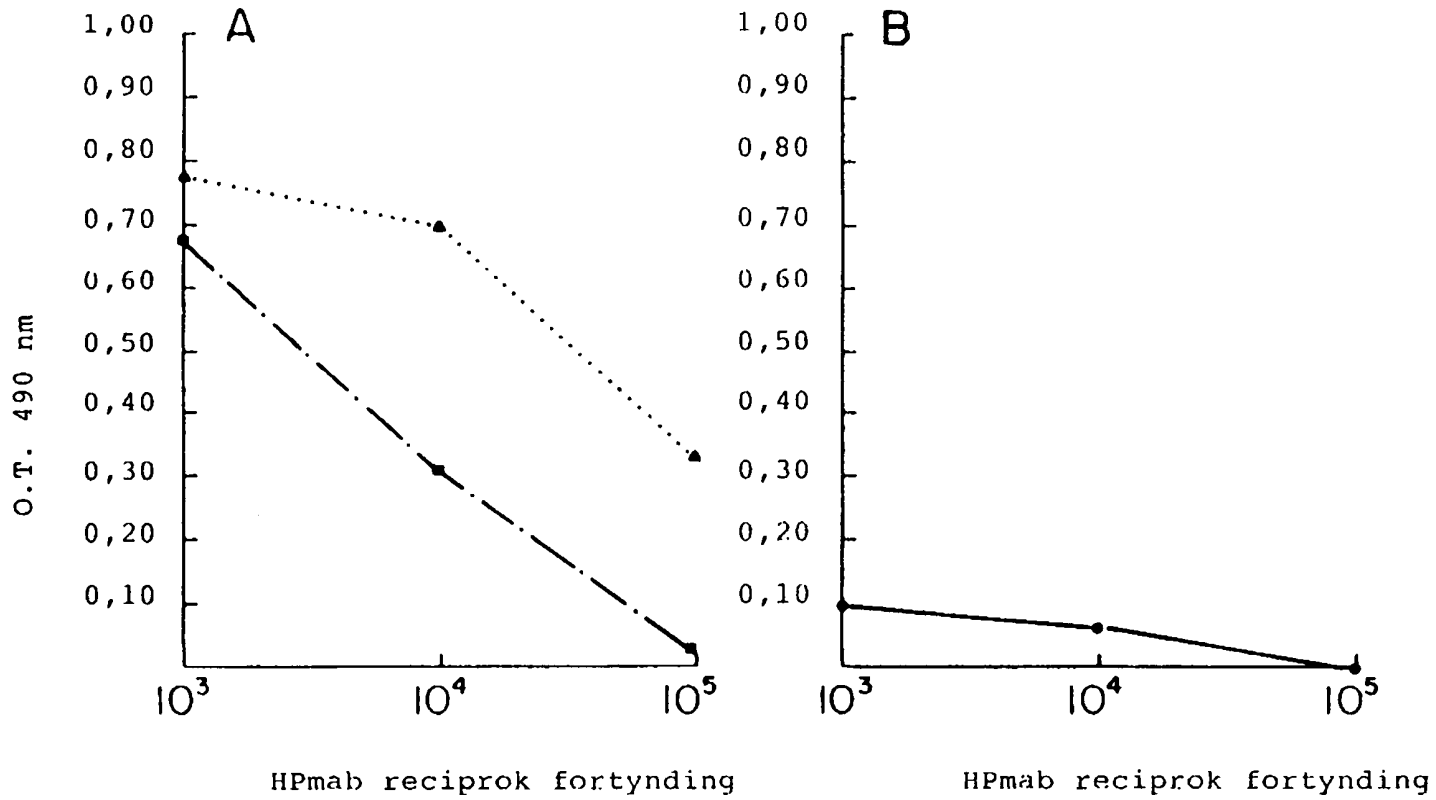

1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
O.T. 490 nm
10³
10⁴
10⁵
HPmab reciprok fortynding

FIG. 3


A
B
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
O.T. 490 nm
10^3
10^4
10^5
HPmab reciprok fortynding
HPmab reciprok fortynding

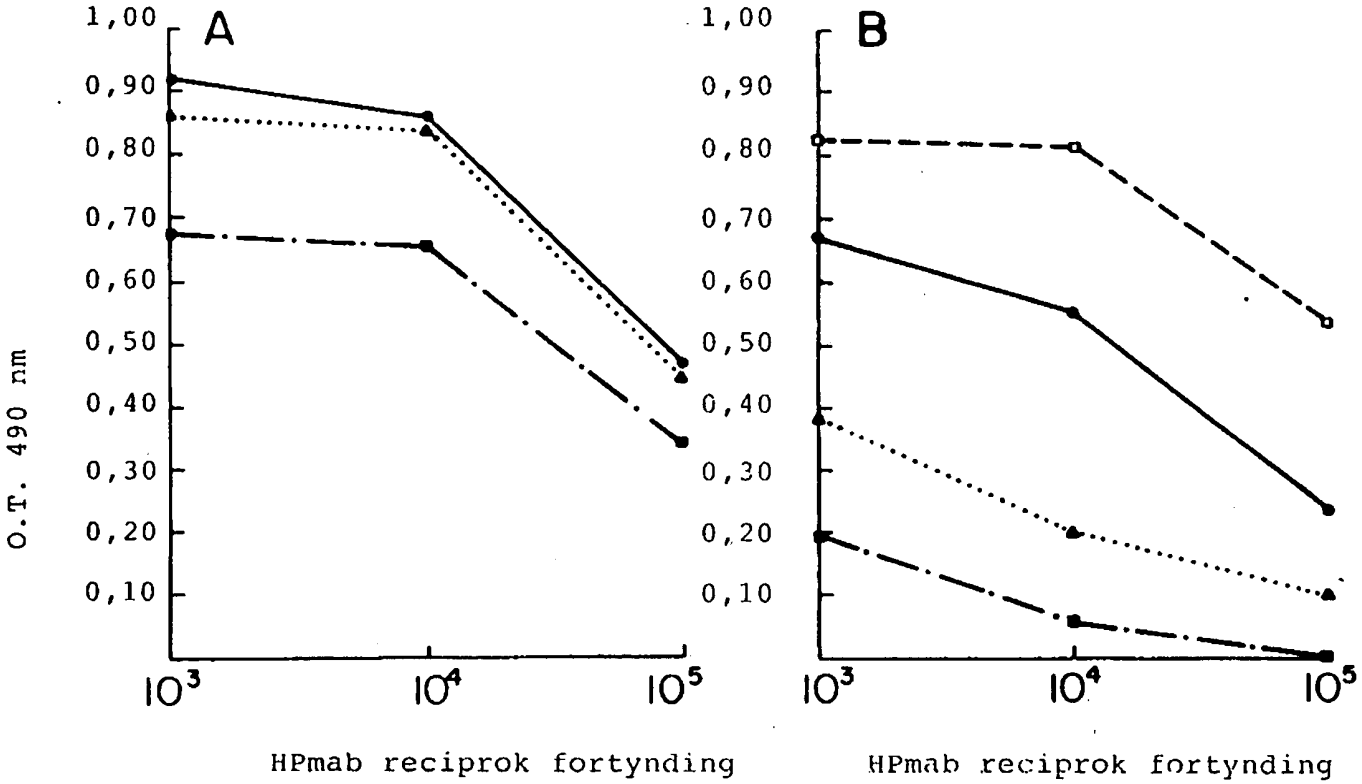
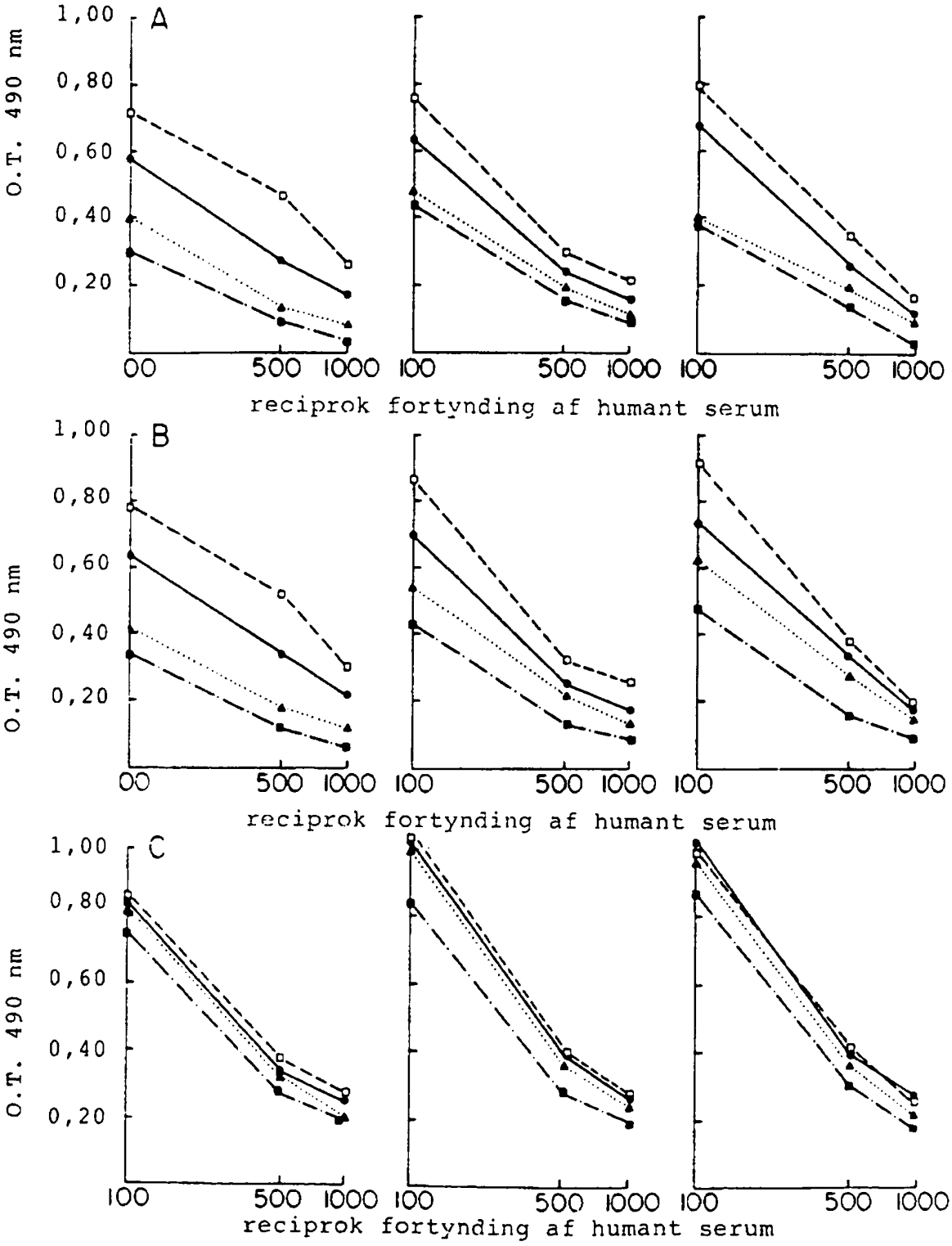


FIG. 4

DK 175152 B1

FIG. 5


A
B
C
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
O.T. 490 nm
00
100
500
1000
reciprok fortynding af humant serum

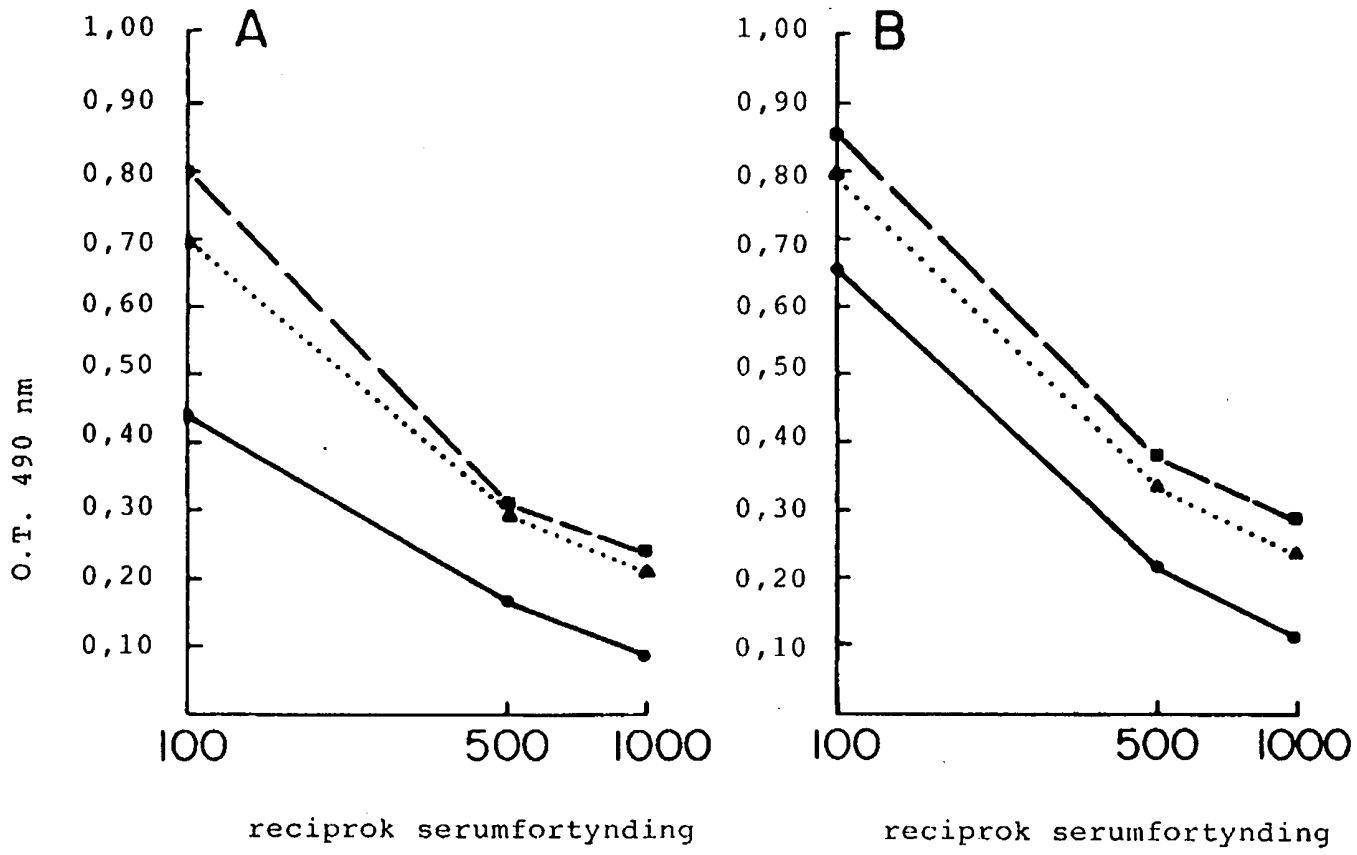

A
B
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
O.T. 490 nm
100
500
1000
reciprok serumfortynding
reciprok serumfortynding

FIG. 6

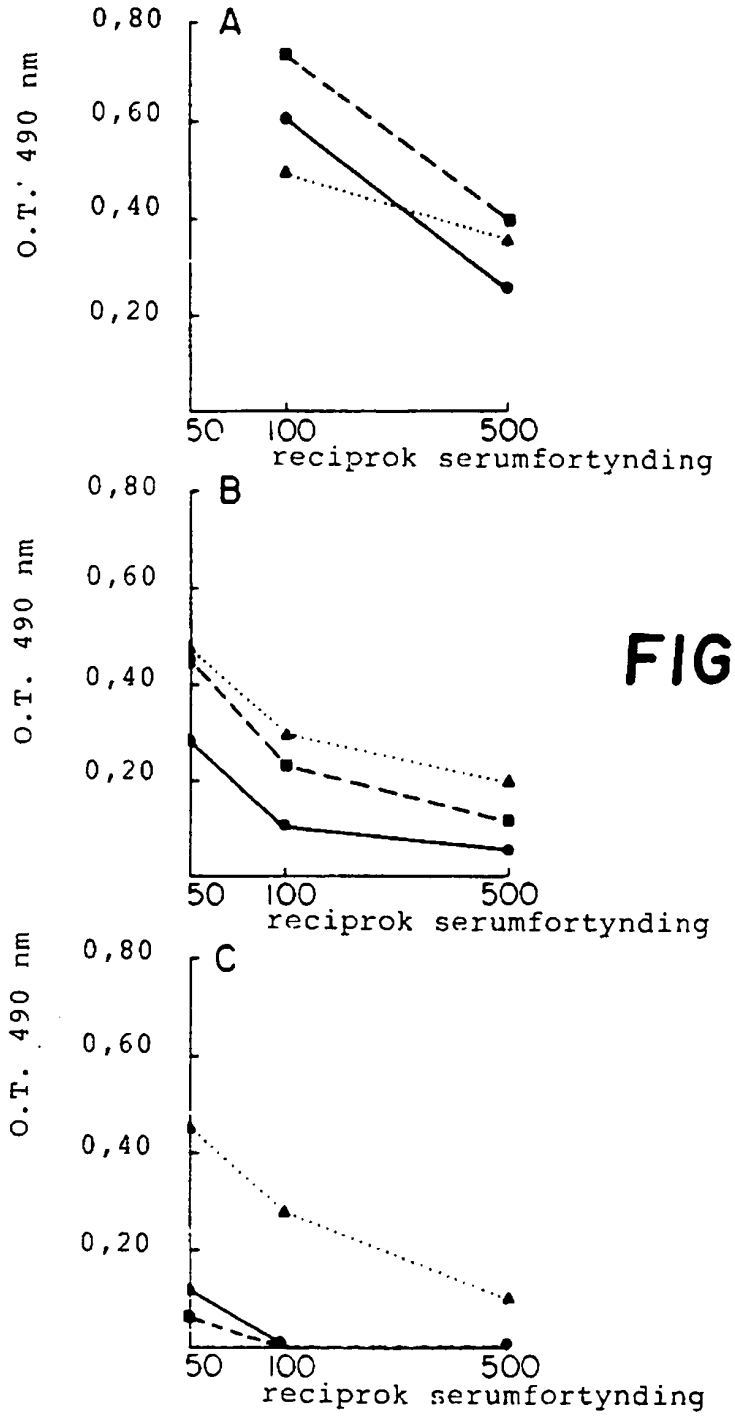
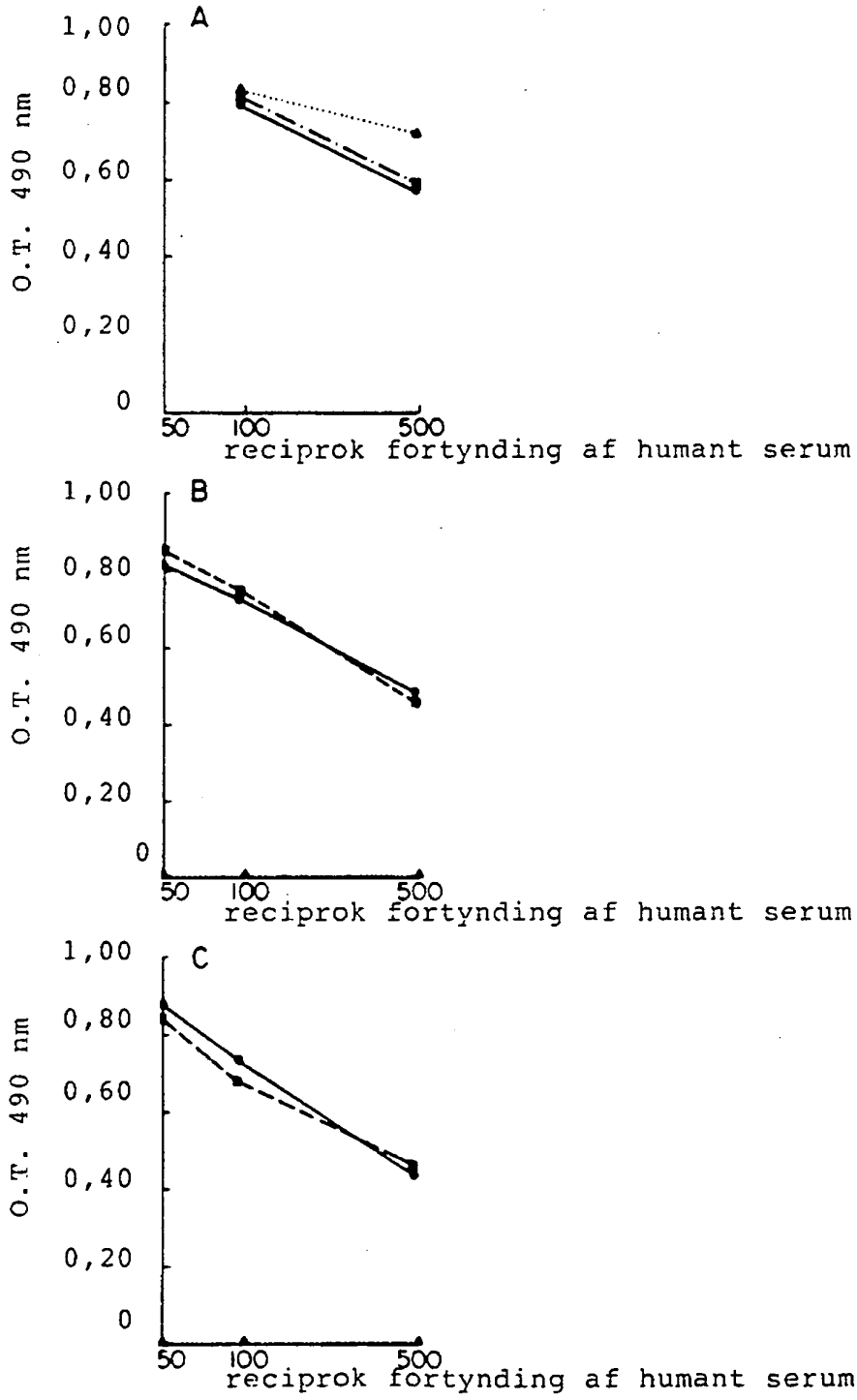

A
0,80
0,60
0,40
0,20
O.T.' 490 nm
50
100
500
reciprok serumfortynding
B
0,80
0,60
0,40
0,20
O.T. 490 nm
50
100
500
reciprok serumfortynding
C
0,80
0,60
0,40
0,20
O.T. 490 nm
50
100
500
reciprok serumfortynding

FIG. 7

FIG. 8


A
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0
O.T. 490 nm
50
100
500
reciprok fortynding af humant serum
B
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0
O.T. 490 nm
50
100
500
reciprok fortynding af humant serum
C
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0
O.T. 490 nm
50
100
500
reciprok fortynding af humant serum

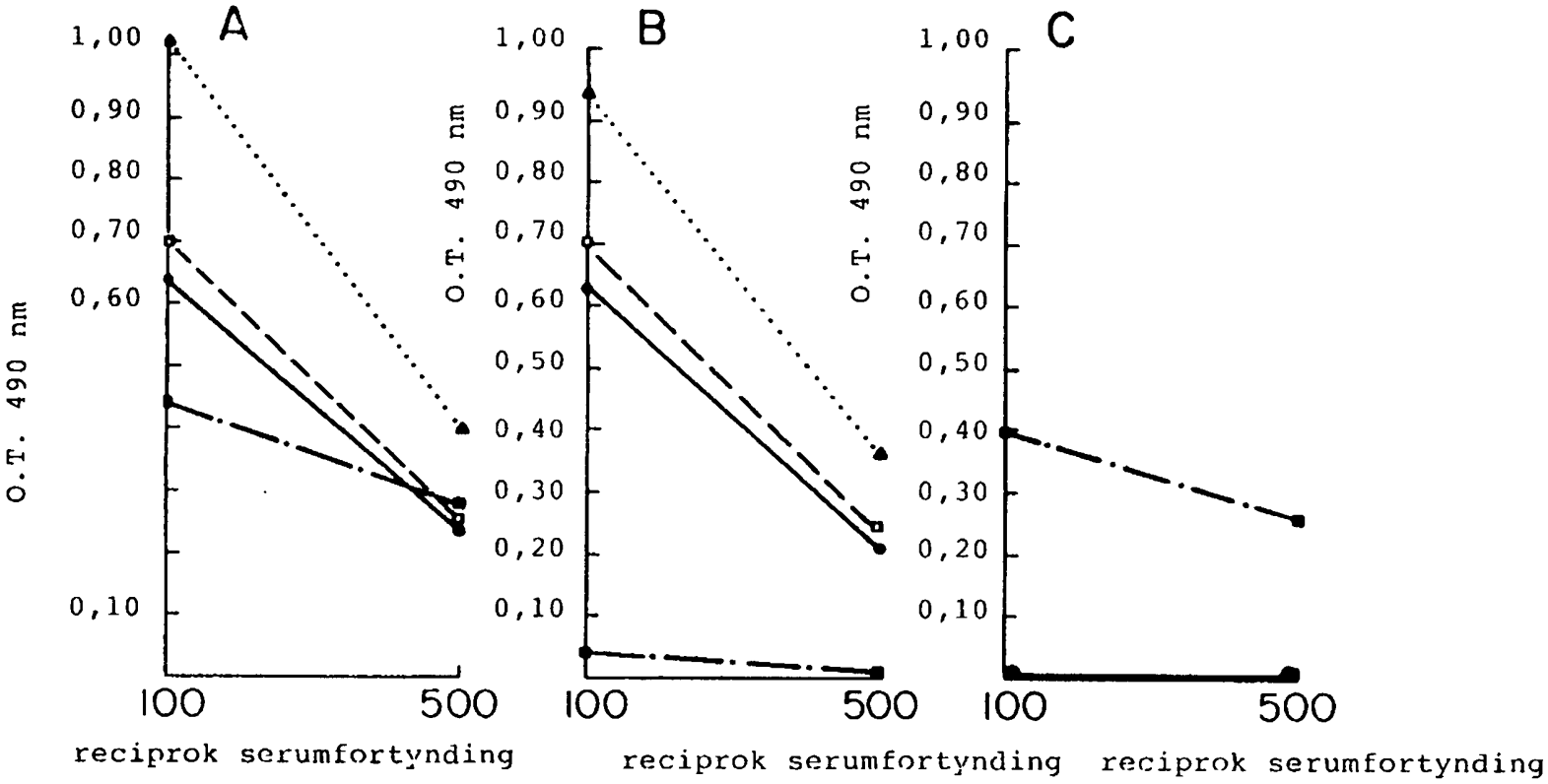


FIG. 9

DK 175152 B1

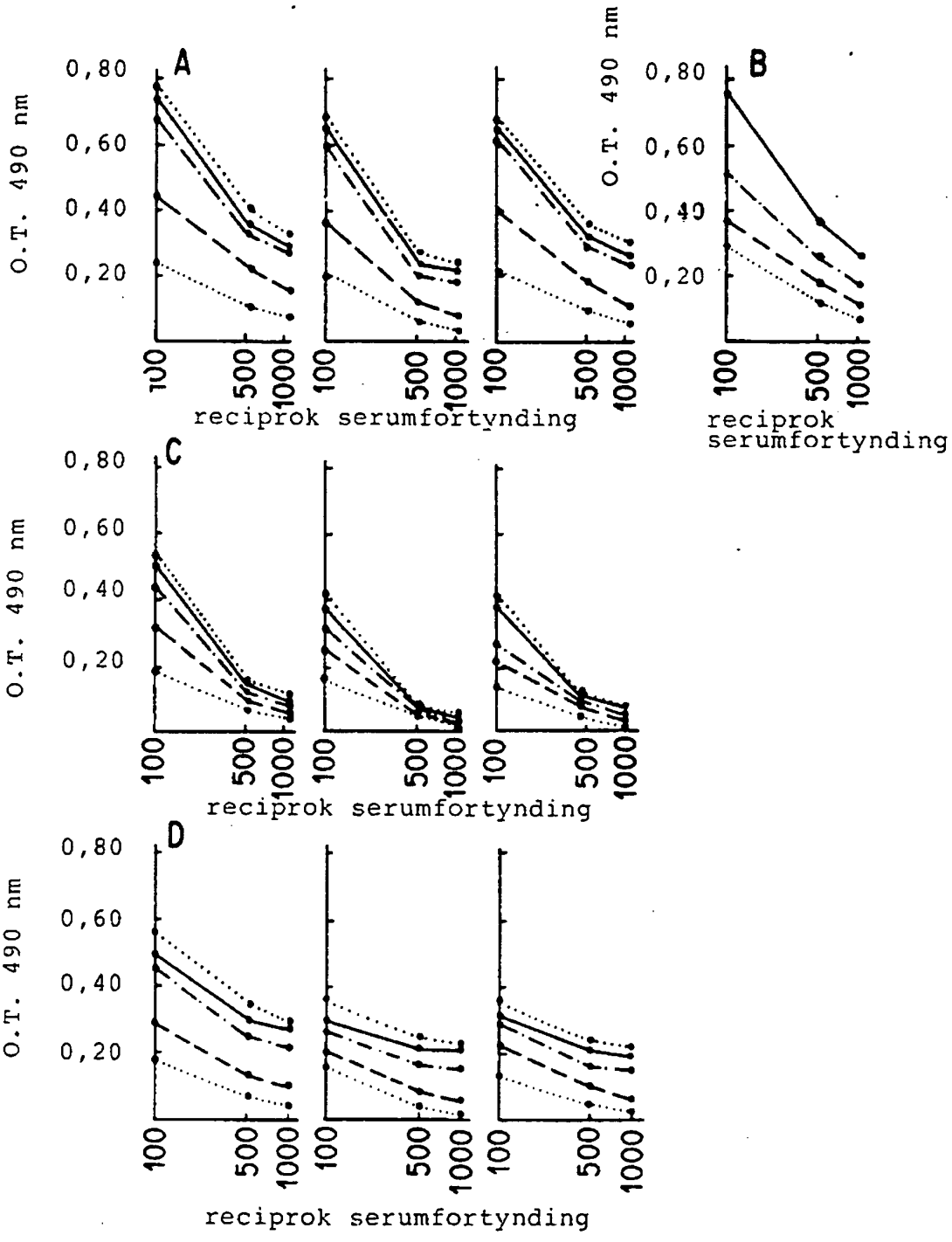

A
B
C
D
O.T. 490 nm
0,80
0,60
0,40
0,20
100
500
1000
reciprok serumfortynding

FIG. 10

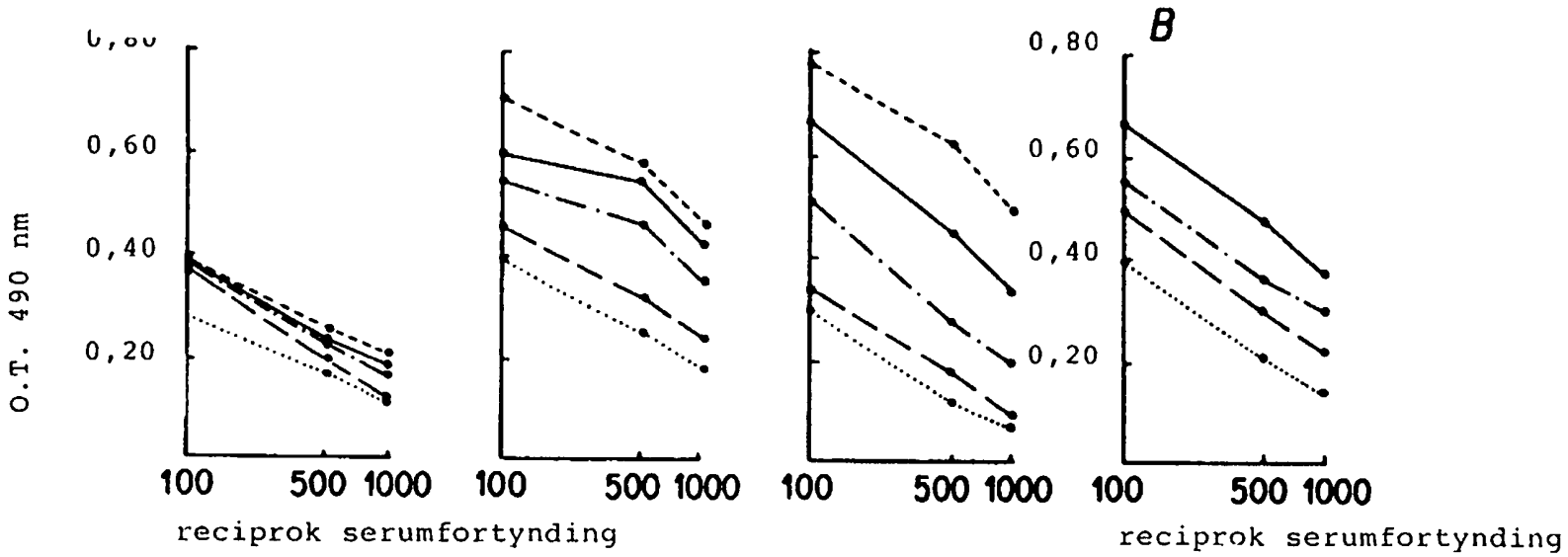


FIG. 11

DK 175152 B1

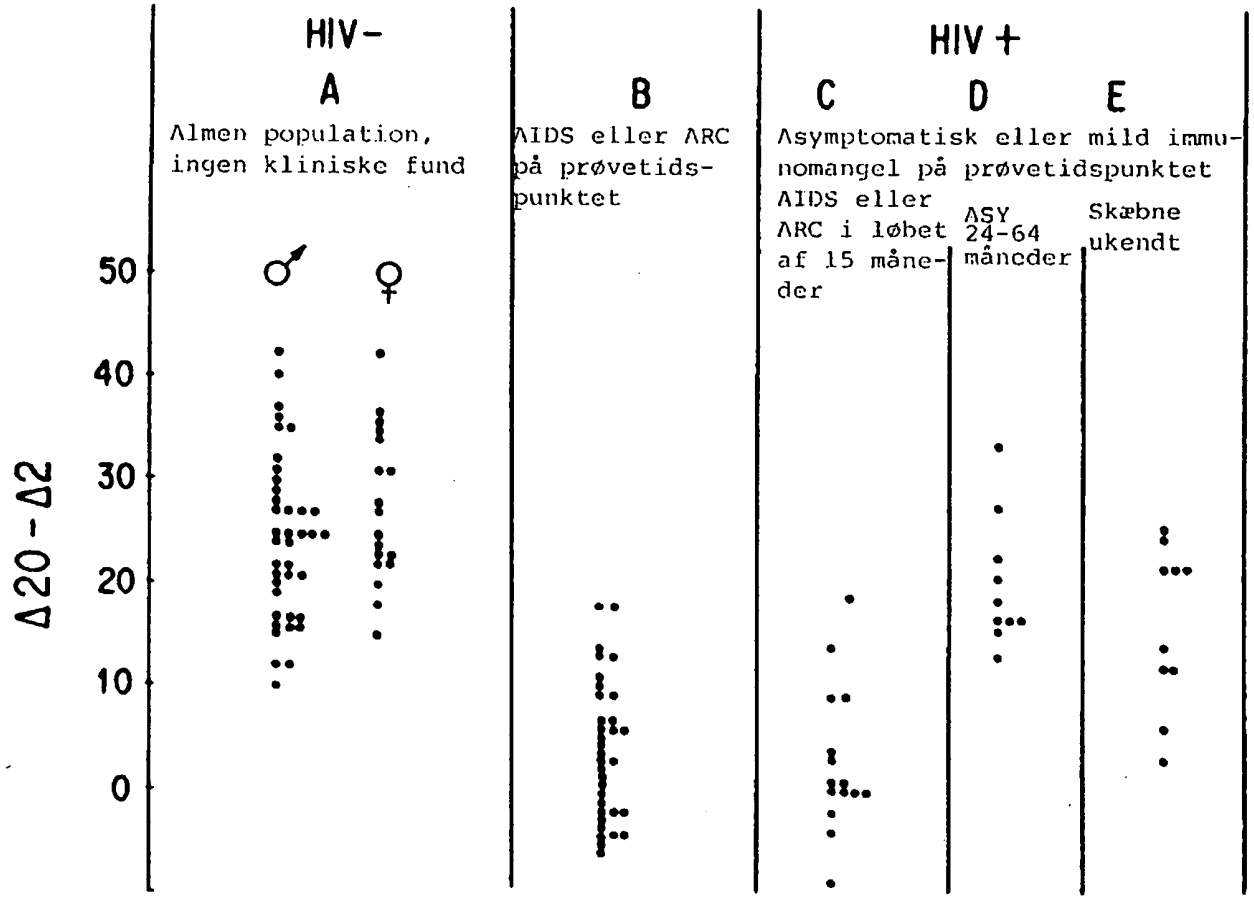


FIG. 12

DK 175152 B1

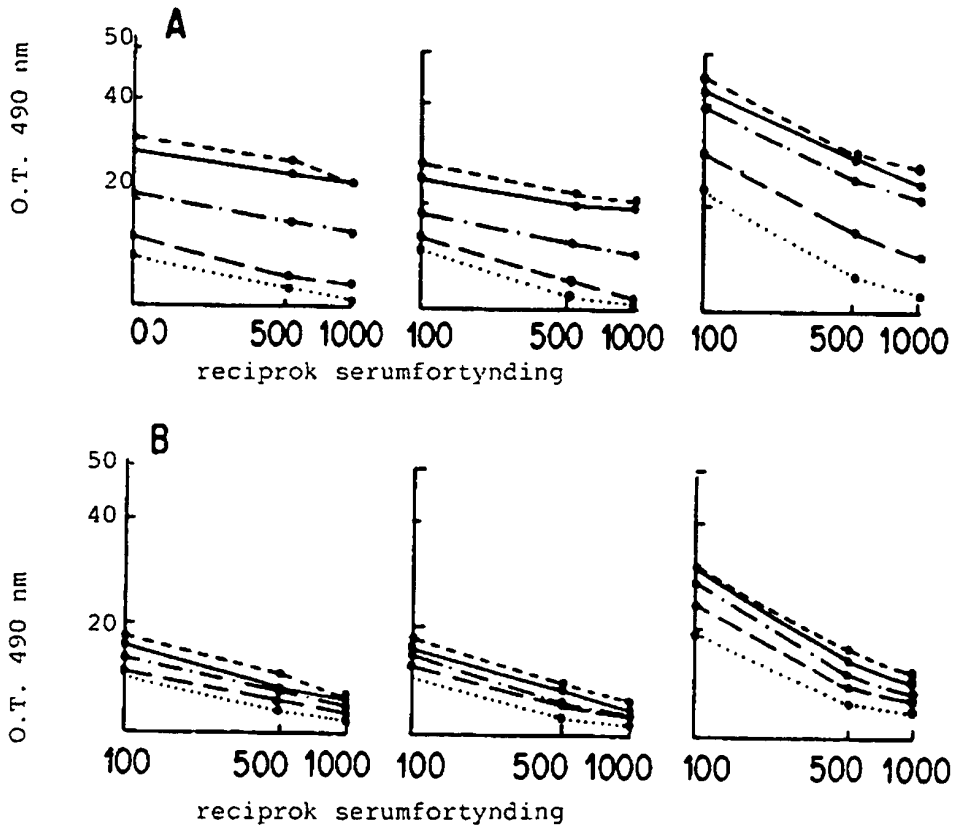

A
O.T. 490 nm
50
40
20
00
500 1000
100
500 1000
100
500 1000
reciprok serumfortynding
B
O.T. 490 nm
50
40
20
100
500 1000
100
500 1000
100
500 1000
reciprok serumfortynding

FIG. 13