

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 843451 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **843451**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C07K 7/08

C07K 7/10

A61K 37/02

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **21.12.1983**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **03.09.1984**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **03.09.1984**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **21.12.1983** **PCT/US1983/002008**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

03.01.1983 US 455265

12.12.1983 US 559469

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Scripps Clinic and Research Foundation, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Houghten, Richard A., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Escherichia colin syntetittinen, lämpöstabili enterotoksiinipolypeptid i ja sen multimeerit.

Syntetiska värmestabila enterotoxin-polypeptider av Excherichia coli o ch multimerer därav.

Escherichia colin synteettinen, lämpöstabiili enterotoksiinipolypeptidi ja sen multimeerit

Tämä keksintö kohdistuu synteettiseen polypeptidiin, joka vastaa Escherichia coli:n lämpöstabiilia enterotoksiinia, ja erityisesti synteettisiin polypeptideihin ja sen multimeereihin, jotka sisältävät ne pääasialliset määräävät alueet, jotka saavat Escherichia colin lämpöstabiilin enterotoksiinin antigeenisyyden aikaan.

Escherichia coli:n (E.coli tai ETEC) enterotoksigeenisten kantojen ohutsuolessa tapahtuvasta pesäkkeenmuodostuksesta aiheuttava akuutti ripulisairaus on maailmanlaajuisesti ajattelun huomattava terveydellinen vaikeus sekä ihmisissä, että eläintaloudessakin. Rotavirusten kanssa yhdessä nämä organismit ovat pääasiallinen syy usein tappavaan ripuliin, joka on tavallista alikehittyneissä maissa elävien pikkulasten keskuudessa sekä vastasyntyneissä eläimissä, erityisesti karitsoissa ja porsaissa. ETEC-kannat ovat myös tavallinen akuutin ripulin syy lauhkeiden vyöhykkeiden ihmisissä, jotka matkustavat tropiikkiin, ja ne saattavat olla syynä satunnaiseen tai epidemiankaltaiseen ripuliin joko lauhkeilla tai trooppisilla alueilla asuvien lasten tai aikuisten keskuudessa.

ETEC:n aiheuttama sairaus välittyy kahden enterotoksiinin vapautumisella, niiden vapautuessa joko erikseen tai yhdessä. Molekyyllipainoltaan suuri, antigeeninen, lämpöstabiili toksiini (LT) on puhdistettu homogeeniseksi, ja sen alayksikön rakennetta luonnehditaan viideksi B-alayksiköksi, jotka kiinnittävät holotoksiinin mukosaalipinnan spesifisiin GM_1 -gangliosidireseptoreihin, ja yhdeksi A-alayksiköksi, joka stimuloi solunsisäistä adenyylaattisyklaasin aktiivisuutta, jolloin nesteen ja elektrolyytin erittyminen elpyy.

Ihmisestä tai siasta peräisin olevien ETEC-kantojen tuottama, molekyylipainoltaan alhainen, lämpöstabiili toksini (ST) on myös puhdistettu äskettäin. ST-preparaattien puoli-kystiinin pitoisuus on suhteellisen suuri, ne aiheuttavat erittymistä stimuloimalla guanylaattisyklaasia ja ne ovat hapteenisia, minkä osoittaa se, että ne kykenevät kohottamaan antitoksiinin responssia sellaisissa eläimissä, jotka on tehty immuuneiksi molekyylipainoltaan korkeaan kantajaan yhdistetyllä toksiinilla.

Käyttökelpoisin menetelmä ETEC:n aiheuttaman ripulin estämiseksi olisi sellainen immunisointiohjelma, joka takaisi suojan sellaisia heterologisia ETEC-serotyyppejä vastaan, jotka tyypit tuottavat joko yhtä tai molempia LT- ja ST-enterotoksiineja. Immuuniksi tekeminen jommalla kummalla biologisella LT- tai biologisella ST-toksiinilla saa koe-eläimissä aikaan anti-toksiiniresponssin, joka suojaa immuuniksi tekemisessä käytettyä, spesifistä toksinia tuottavia, kantojen homologisia ja heterologisia serotyyppejä vastaan. Immuuniksi tekeminen koko LT-toksiinilla tai sen B-alayksiköllä aikaansaa suojan niitä eläviä heterologisia kantoja vastaan, jotka kannat tuottavat pelkästään tätä toksinia (LT^+/ST^-) tai tuottavat tätä toksinia yhdessä ST:n kanssa (LT^+/ST^+), mutta ei sellaisia kantoja vastaan, jotka tuottavat pelkästään ST:tä (LT^-/ST^+).

Immunointi molekyylipainoltaan korkeaan kantajaan yhdistetyllä biologisella ST:llä aiheuttaa seerumin vasta-aineita, jotka neutraloivat passiivisesti erittymisvaikutusta heterologisten kantojen tuottamassa ST:n imevän hiiren mallissa. Täten immunoinnilla saadaan aikaan suoja elävien heterologisten LT^-/ST^+ :n suoraa uhkaa vastaan, mutta ei LT:tä tuottavia kantoja vastaan. Kumpikaan näistä toksineista ei ole sopiva immunointiin yksin annettuna, kuitenkin ottaen huomioon niiden toksisuuden, niiden kykenemättömyyden aikaansaada suojaa toista toksinimuotoa tuottavia kantoja vastaan, ja sen tosiseikan, että ne molekyylipainoltaan suuret kantajat, joita on käytetty tekemään haptenisesta biologisesta ST-molekyylistä antigeenisen, ovat sopimattomia käytettäväksi ihmisille.

Julkaisussa Klipstein et al., *Infect. Immun.*, 37:550-557 (1982) on esitetty sellaisen rokotteen kehittäminen, joka roko- te on valmistettu konjugoimalla biologinen ST-toksiini LT-toksiiniin karbodi-imidireaktiolla. Tämän reaktion tuloksena biologinen ST muuttuu antigeeniseksi, kun se yhdistetään mole- kyyllipainoltaan suureen LT-kantajaan, koska molemmat ristisi- doksiset toksiinit säilyttävät suurimman osan antigeenisuudes- taan, mutta menettävät suurimman osan toksisista ominaisuuksistaan. Näin tuotetulla rokotteella immuuniksi tehdyt rotat olivat erittäin suojattuja joko LT:n tai biologisen ST:n uhkaa vastaan, sekä näitä toksiineja tuottavien ETEC-kantojen uhkaa vastaan.

Biologisen ST:n puolittain puhdasta valmistetta käytettiin tähän rokotteeseen, johtuen puhtaan biologisen ST:n suhteellisen alhaisesta saannosta nykyisiä puhdistusmenetelmiä käytet- täessä, joihin menetelmiin kuuluu lukuisia kromatografisia ero- tusvaiheita. Heterogeenisen materiaalin sisältyminen rokot- teeseen saattaa kuitenkin estää sen käytön ihmisen immuuniksi tekemisessä.

Tällä keksinnöllä, joka kohdistuu synteettisesti tuotettuun ST:hen, on voitettu luonnon lähteistä peräisin olevan ST:n käytön vaikeudet siten, että synteettistä ST:tä voidaan valmis- taa suuria määriä puhtaana, ja tällä ST:llä on samankaltaiset ominaisuudet, kuin mitä ihmisen ETEC-kannan bakteeriviljelmäl- lä saadulle puhtaalle ST:lle on esitetty. [Staples et al., *J. Biol. Chem.*, 255:4716-4721 (1980); ja Chan et al., *J. Biol. Chem.*, 256:7744-7746 (1981)]⁷.

Vähintään kaksi ST-tyyppiä on tunnistettu fysikaalisten ominai- suksiensa perusteella. Ensimmäinen ST I:nä tunnettu tyyppi (jota merkitään myös STa:lla) on liukoinen metanoliin, ja se on aktiivista imevän hiiren mallissa. Toinen tyyppi, ST II (jota merkitään myös STb:llä), on liukenematonta metanoliin, eikä se ole aktiivista imevän hiiren mallissa, mutta se on aktiivista sian ligatoiduissa ileaalisilmukoissa.

ST I-polypeptidien joukosta on tunnistettu vähintään kolme samankaltaista polypeptidiä tai niiden polypeptidien määräävät alueet, ja niiden aminohappojärjestys on määritetty. Näitä kolme ST I-tyyppiä merkitään tässä (i) ST Ia:lla, joka alunperin löydettiin härän E.coli-kannasta, ja jonka osa on myös koodautuneena porsaan kantoihin, (ii) ST Ib:llä merkitty on peräisin ihmisestä eristetyistä E.coli:sta ja (iii) ST Ic on samoin eristetty ihmistä infektoivasta E.coli:sta.

ST Ia-polypeptidin koodaava nukleotidijärjestys on määritetty. Nukleotidijärjestyksen translaatio polypeptidin aminohapposekvenssiksi johtaa polypeptidiin, joka käsittää 72 aminohappoa, joka karboksipäässä päättyy tyrosiiniryhmään [So et al., Proc. Natl.Acad.Sci. USA, 77:4011-4015 (1980)]. ST Ic-polypeptidin arvellaan samoin käsittävän 72 aminohappoa sekä ST Ia-polypeptidin kanssa lukuisia homologisia alueita. ST Ib-polypeptidin on esitetty sisältävän ainoastaan 18 aminohappoa [Chan et al., J.Biol. Chem., 256:7744-7746 (1981)].

ST Ib:n 18 aminohappoa (18-meeri) osoittavat huomattavaa homologisuutta ST Ia-polypeptidin aminohappojen 55-72 kanssa. Homologinen, lähes identtinen alue on esitetty seuraavassa, alkaen aminohaposta numero 55, vasemmalta oikealle kulkien ja ST Ia-polypeptidin suunnassa aminopää-karboksipää:

ST Ia: AsnThrPheTyrCysCysGluLeuCysCys

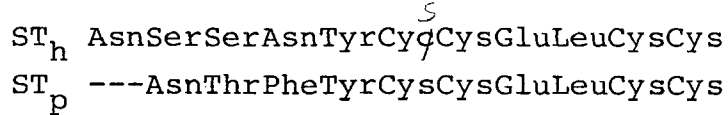
ST Ib: AsnThrPheTyrCysCysGluLeuCysCys

AsnProAlaCysAlaGlyCysTyr

TyrProAlaCysAlaGlyCysAsn

Tuoreimmissa julkaisuissa, Takeda et al., Abstracts, 19th Joint Conference US-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel (**where & when \$ other info**), 87-88 (1983) ja Ikemura et al., Chem. Letters, (Chem.Soc.Japan), 101-104 (1983), tälle 18-meerille polypeptidille on esitetty lisäpolypeptidijärjestysten läsnäolo. Nämä tutkijat merkitsivät ihmisen ja porsaan ETEC-kannoista saatua ST-molekyyliä

ST_h:lla ja ST_p:llä. Näiden tutkijoiden esittämät aminohappojäännösten järjestykset, vasemmalta oikealle ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän, ovat:



AsnProAlaCysThrGlyCysTyr

AsnProAlaCysAlaGlyCysTyr

Kuten molempia edellä esitettyjä järjestyksiä, eli ST Ia, ST Ib, ST_h ja ST_p verrattaessa voidaan nähdä, suuri osa homologisuudesta on jakaantuneena kunkin neljän esitetyn järjestyksen karboksipään neljääntoista jäännökseen.

Nämä tutkijat julkaisivat myös ST_h:n synteesin. Suojattua polypeptidiä valmistettaessa käytettiin synteesin liuosmenetelmiä. Suojausryhmät poistettiin vetyfluoridilla, ja Cys-merkaptoryhmät (tiolit) hapetettiin ilmalla. Ilmahapettaminen suoritettiin polypeptidin pitoisuuden ollessa 10^{-5} -molaarista tislatussa vedessä, jonka pH oli asetettu arvoon 8,0 ammoniakkin vesiliuoksella. Hapettamista jatkettiin, kunnes vapaat tioliryhmät katosivat.

Synteettisen ST_h:n biologisen aktiivisuuden imevän hiiren mallissa esitettiin olevan sama kuin luonnollisen toksiininkin. Synteettisen materiaalin toksisuus ilmoitettiin neutraloituvan luonnollista toksiinia vastaan vaikuttavalla antiseerumilla.

Edellä olevaa 18 aminohapon polypeptidijärjestystä tarkasteltaessa paljastuu samoin, että läsnä on myös kuusi puolikystiini-(Cys)-jäännöstä. Näiden puolikystiinijäännösten hapettumisen luonnollisesti esiintyvän enterotoksiinin molekyylin sisäisiä disulfidisidoksia sisältäviksi kystiinijäännöksiksi arvellaan aikaansaavan materiaalin havaitun lämpöstabiilisuuden.

Lisäksi on kuitenkin huomautettu, että vaikkakin kystiini-disulfidisidosten tiedetään olevan läsnä biologisessa ST:ssä,

niin kuitenkin ei tiedetä, mitkä puolikystiini-jäännöksen parit yhdistyvät, kun luonnollisessa ST-molekyyllissä läsnä-olevat kolme disulfididisidosta muodostuvat. Nämä kolme disulfididisidosta voivat teoreettisesti muodostua läsnäolevan kuuden Cys-jäännöksen viidestätoista erilaisesta yhdistelmästä.

Staples et al., supra, ovat osoittaneet, että biologisen ST:n disulfidiliitoksia tarvitaan toksiinin biologisessa aktiivisuudessa. Täten puolikystiinejä tuottavan kemiallisen pelkistämisen tai kysteiinihappoa tuottavan, permuurahaishapolla suoritettun hapettamisen osoitettiin tuhoavan toksiinin biologisen aktiivisuuden. Lisäksi Chan et al., supra, ovat esittäneet, että ST Ib:n yllä olevan sekvenssin 18 homologisen aminohapon aminopäästä peräisin olevaa neljää ensimmäistä jäännöstä ei tarvita biologiseen aktiivisuuteen. Täten biologinen aktiivisuus saavutettiin aminohapot käsittävästä polypeptidistä, joka sisälsi karboksipään 14 aminohappoa ja niiden disulfididisidokset.

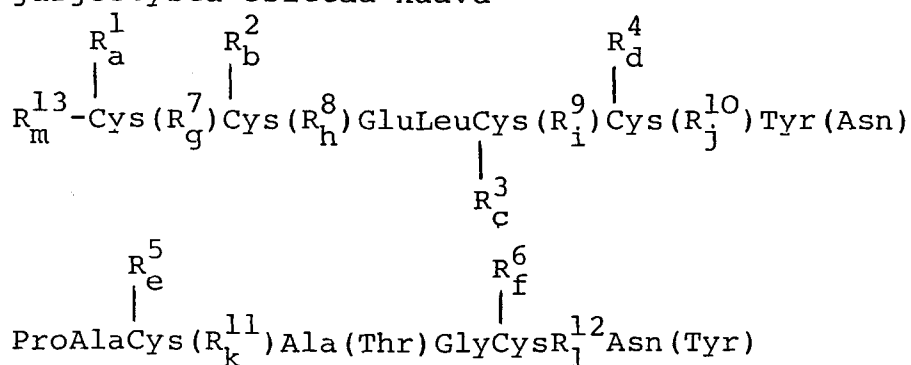
Julkaisussa Aimoto et al, Biochem. Biophys. Res. Chem., 112:320-326 (April 15, 1983) on esitetty edellä mainitun ST_h:n 14 aminohappojäännöstä karboksipään synteesissä. Tämän synteettisen molekyylin biologisen aktiivisuuden esitettiin olevan 2-5 kertainen natiiviin ST_h:hon verrattuna, molaarisesti määritettynä, imevän hiiren mallia käyttäen.

Suullisessa esityksessään elokuun 29 päivänä 1984, Duflot et al., Proceedings European Peptide Symposium: 683-686, joka on julkaistu Berliinissä kesäkuussa 1983, nämä tutkijat esittivät porsaan ja ihmisen ST 18-meeristen polypeptidien synteesin, joissa polypeptideissa niiden Cys-merkaptoryhmät oli suojattu (S-suojaus) asetamidometyyliryhmillä. Nämä aminohappojäännösten järjestykset olivat tarkoituksellisesti identtiset So:n et al., supra, ST Ia:lle esittämän järjestyksen kanssa ja Chan:in et al., supra, ST Ib:lle esittämän järjestyksen kanssa. Kuitenkin Duflot:in et al. esittämien järjestysten seitsemäs

aminohappojäännös oli glysiinijäännös (Gly) aminopäästä las-
kien, kun taas tämä jäännös edellä kuvatuissa järjestyksissä
on glutamiinihappojäännös (Glu).

Duflot et al. esittivät, että hiirien tai jänisten immunointi
heidän S-suojatulla porsaan ST-toksiinillaan, tetanus-
toksoidiin tai ovalbumiiniin liitettyinä, tuotti vasta-aineita,
jotka tunnistivat luonnollisen ja synteettisen toksiinin
samalla tavalla. Oleellista biologista aktiivisuutta imevän
hiiren kokeessa ei havaittu S-suojatulla, porsaan synteetti-
sellä polypeptiditoksiinilla. Nämä tutkijat esittivät biolo-
gisen aktiivisuuden puuttumisen johtuvan molekyylin sisäisten
difulsididosten puuttumisesta S-suojatussa molekyyllissä,
mikä pitää yhtä aikaisemman Staples:in et al., supra, julkai-
sun kanssa.

Tässä keksinnössä tarkastellaan synteettistä polypeptidiä, jolla
on antigeenisyyttä vapaana monomeerina tai multimeerina, eli
vähintään 10 % E.coli:n biologisen, lämpöstabiilin enterotok-
siinin (ST) antigeenisyydestä. Synteettinen polypeptidi
käsittää aminohappojäännösten järjestyksen, vasemmalta oikealle
tarkasteltuna, ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän, jota
järjestystä esittää kaava



jossa suluihin ovat kolme spesifistä aminohappojäännöstä
ovat vaihtoehtoisia kulloinkin välittömästi edeltävälle jär-
jestyksen aminohappojäännökselle;

a-f ja g-l ovat kokonaislukuja, joiden kunkin arvo on nolla
tai yksi, mikä tarkoittaa, että mikäli jonkin a-f:n tai g-l:n
arvo on nolla, niin vastaava R_{a-f}^{1-6} tai R_{g-l}^{7-12} -ryhmä puuttuu,

ja kun R_{a-f}^{1-6} -ryhmä puuttuu, niin Cys-jäännöksen, jossa on puuttuva R_{a-f}^{1-6} -ryhmä, rikkiatomi muodostaa kystiinin disulfidisidoksen, kun taas a-f:n tai g-l:n arvo on yksi, niin vastaava R_{a-f}^{1-6} - tai R_{g-l}^{7-12} -ryhmä on läsnä; yksilöityinä R_{a-f}^{1-6} -ryhmät ovat samoja tai eri osia, jotka ovat sitoutuneet Cys-jäännöksiin rikkiatomiin, ja ne kuuluvat joukkoon, joka käsittää vedyn, noin 1-4 hiiliatomisen alkyyliryhmän, noin 2-20 hiiliatomisen substituoidun alkyyliryhmän, noin 1-8 hiiliatomisen asyyliiryhmän ja noin 2-10 hiiliatomisen substituoidun asyyliiryhmän; R_{g-l}^{7-12} -ryhmät ovat samoja tai erilaisia, vaihtoehtoisia aminohappojäännöksiä kulloinkin välittömästi edeltävälle Cys-jäännökselle;

vähintään kaksi a-f:stä ja kaksi g-l:stä ovat nollia ja kaksi Cys-jäännöstä on läsnä edellyttäen, että synteettinen polypeptidi käsittää vähintään yhden molekyyllinsisäisen kystiinin disulfidisidoksen, joka on muodostunut vähintään kahdesta läsnäolevasta Cys-jäännöksestä; ja

"m" on kokonaisluku, jonka arvo on nolla tai yksi, mikä tarkoittaa, että mikäli "m" on nolla, niin R_m^{13} puuttuu, ja mikäli "m" on yksi, niin R_m^{13} valitaan ryhmästä, joka käsittää noin 1-54 aminohappojäännöstä käsittävän ketjun, sitojarahmian ja noin 1-20 hiiliatomisen karboksyylihapon asyylioson, joka happo muodostaa amididisidoksen aminopään jäännöksen amiinin kanssa.

Mikäli monomeerimuodossaan, niin edellä mainituista vähintään yhdestä disulfidisidoksesta on kystiinin molekyyllinsisäinen disulfidi, joka on muodostunut vähintään niiden kahden Cys-jäännöksen väliin, jotka jäännökset ovat läsnä antigeenisessä polypeptidissä. Kun antigeeninen polypeptidi on multimeerisessä muodossaan, joka käsittää lukuisia polypeptideistä muodostuneita toistuvia yksiköitä, niin edellä mainittu vähintään yksi disulfidisidos voi olla kystiinin molekyyllinsisäinen disulfidi, joka on muodostunut niiden vähintään kahden Cys-jäännöksen väliin, jotka jäännökset ovat läsnä kussakin toistuvassa yksikössä, tai tämä disulfidisidos voi olla kystiinin

molekyyllinsisäinen disulfidi, joka on muodostunut yhden vähintään niistä kahdesta Cys-jäännöksestä, jotka ovat läsnä ensimmäisessä toistuvassa yksikössä ja toisen vähintään niistä kahdesta Cys-jäännöksestä, jotka ovat läsnä toisessa toistuvassa yksikössä, väliin.

Täten olipa kyseessä monomeerinen tai multimeerinen muoto, niin kystiinin disulfidisidos on molekyylin sisäinen. Kuitenkin monomeerisessä ST:ssa disulfidisidos on polypeptidin sisäinen sidos, kun taas multimeerisissä ST:n toteutusmuodoissa disulfidisidos saattaa olla polypeptidin sisäinen tai polypeptidien välinen sidos.

Edellä esitettyä antigeenista polypeptidiä voidaan käyttää pelkästään monomeerisessä muodossaan, kuten sellaisessa diagnostiikassa käytettynä, jossa toteutetaan kilpailevia sitoutumismäärityksiä, tai mieluummin rokotteen monomeerisena immunogeeninä, kun polypeptidi on yhdistettynä kantajamolekyyliin, kuten porsaen immunoglobuliini G:hen. Edelleen suositeltavammassa toteutusmuodossa antigeenista polypeptidiä käytetään multimeerisessä muodossa.

Multimeerisenä muotona käytettäessä polypeptidi on monomeerien lukuisista toistuvista yksiköistä muodostuva kokonaisuus. Eräässä toteutusmuodossa multimeeri käsittää vähintään kaksi antigeenista ST-polypeptidiä, jotka ovat sitoutuneina toisiinsa alku- ja loppupään avulla amidisidoksella, joka on muodostunut yhden polypeptidin aminopään amiiniryhmän ja toisen polypeptidin karboksipään karboksyyliiryhmän väliin. Toisessa multimeerisessä toteutusmuodossaan antigeeninen polypeptidi on polymeerin lukuisista toistuvista yksiköistä muodostuva kokonaisuus, jonka polymeerin polypeptidideistä muodostuvat toistuvat yksiköt ovat sitoutuneina toisiinsa polypeptidien välisinä, kystiinin disulfidisidoksilla, jotka ovat muodostuneet toistuvien polypeptidiyksiköiden Cys-jäännösten väliin.

Synteettisen ST:n monomeerisen ja multimeerisen muodon suositummassa käytännön toteutusmuodossa, antigeenisen synteettisen polypeptidin edellä esitettyyn kaavaan viitaten;

a-f ovat kokonaislukuja, joilla on arvo nolla tai yksi, edellyttäen, että:

"e" on nolla, kun "a" on nolla,

"d" on nolla, kun "b" on nolla, ja

"f" on nolla, kun "c" on nolla;

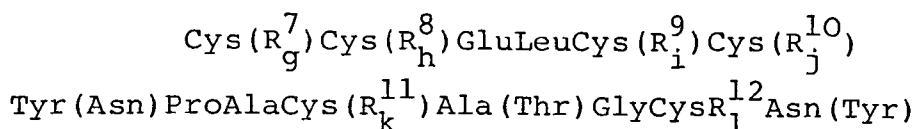
lisäedellytyksenä on, että vähintään yksi "a":sta, "b":stä tai "c":stä on oltava nolla, joten vastaava R_{a-c}^{1-3} puuttuu, kuten ryhmä R_{d-f}^{4-6} :kin, jonka alaindeksi on nolla, kun mainituista "a", "b" tai "c" jokin on nolla, ja molekyylin sisäinen kystiinin disulfidisidos on läsnä vastaavien Cys-jäännösten välissä, joille jäännöksille alaindeksin arvon oleminen nolla vaatii sen, että toisenkin alaindeksin arvo on nolla; ja kun jokin a-f on arvoltaan yksi, niin mainitut R_{a-f}^{1-6} -ryhmät, erillisinä tarkasteltuina, ovat samoja tai erilaisia osia, jotka ovat sitoutuneet Cys-jäännöksen rikkiatomiin, ja ne on valittu ryhmästä, johon kuuluu vety, noin 1-4 hiiliatomin alkyyli-ryhmä, ja noin 2-20 hiiliatomin substituoitu alkyyli-ryhmä; jossa g-l ovat kokonaislukuja, joiden arvo on nolla tai yksi, kuten edellä on esitetty, edellyttäen, että: sekä "g" että "k" ovat nollija, kun "a" on nolla, sekä "h" että "j" ovat nollija, kun "b" on nolla, ja sekä "i" että "l" ovat nollija, kun "c" on nolla, ja kun lukujen g-l arvo on yksi, niin R_{g-l}^{7-12} -ryhmät ovat samoja tai erilaisia vaihtoehtoisia aminohappojäännöksiä kulloinkin välittömästi edeltävälle Cys-jäännökselle.

Monomeerisen tai multimeerisen antigeenisen synteettisen polypeptidin voidaan täten katsoa käsittävän vähintään yhden molekyylinsisäisen disulfidin, joka on kystiini-jäännöksen polypeptidin sisäinen tai polypeptidien välinen disulfidisidos, joka on muodostunut kahden Cys-jäännöksen väliin. Suositeltavimmissa toteutusmuodoissa polypeptidin sisäinen kystiinin disulfidisidos on muodostunut ryhmien R_a^1 ja R_e^5 , tai R_b^2 ja R_d^4 , tai R_c^3 ja

R_f^6 Cys-jäännösten parien väliin. Edelleen suositeltavammassa toteutusmuodoissa monomeerinen synteettinen polypeptidi käsittää vähintään kaksi kystiini-jäännöstä ja niiden disulfididokset ovat muodostuneet edellä mainittujen Cys-jäännösten parien väliin, ja suositeltavimmissa toteutusmuodoissa synteettinen polypeptidi käsittää kolme kystiini-jäännöstä edellä mainittujen Cys-jäännösten välissä.

Biologinen, luonnollinen (natiivi) ST käsittää kolme disulfididosta, jotka ovat muodostuneet kuuden Cys-jäännöksen joukkoon. Tämän keksinnön suositeltavimmalla monomeerisellä synteettisellä ST:llä on biologiseen, natiiviin ST:hen verrattuna identtinen, 18 aminohappojäännöksen järjestys, ja se sisältää samoin kolme molekyyllinsisäistä, polypeptidin sisäistä disulfididosta, jotka ovat muodostuneet sen kuuden Cys-jäännöksen joukkoon. Kuitenkin ohutkerroskromatografinen ja elektroforeettinen liikkuminen kirjallisuuden arvoihin verrattuna, ja biologisten sekä synteettisten monomeeristen ST-molekyylien immunologiset ominaisuudet ovat erilaiset, vaikkakin näiden kahden molekyylin primäärinen rakenne on sama, ja kukin käsittää kolme molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä disulfididosta.

Tämän keksinnön mukaista monomeerista tai multimeerista synteettistä ST:tä, jolla on vähintään 10 % biologisen ST:n antigeenisyydestä, voidaan valmistaa syntetoimalla ei-hapettavissa olosuhteissa ensimmäinen hapettamaton polypeptidi, kuten edellä kuvatun kaltainen polypeptidi, jossa vety tarkoittaa R_{a-f}^{1-6} -ryhmää vähintään kahdella lukujen a-f arvolla, jotka ovat yksi. Suositeltavampaa, monomeeriselle synteettiselle ST:lle ja multimeeriselle synteettisen ST:n muodolle on, että ensimmäinen hapettamaton polypeptidi käsittää sen aminohappojäännösten järjestyksen, vasemmalta oikealle, ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän kulkien, jota esittää kaava:



missä yllä oleva suositeltavampi aminohappojäännöksen järjestyks ilman kolmea spesifistä, suluissa olevaa aminohappojäännöstä ja R_{g-1}^{7-12} -ryhmiä vastaa ST Ib-polypeptidin aminohappojäännöksiä, jotka on numeroitu 5:stä 18:aan tämän ST Ib-polypeptidin aminopäästä laskettuna;

kolme spesifistä suluissa olevaa aminohappojäännöstä ovat kulloinkin vaihtoehtoisia välittömästi edeltävälle aminohappojäännökselle;

$$R_g^7, R_h^8, R_i^9, R_j^{10}, R_k^{11} \text{ ja } R_l^{12}$$

ovat samoja tai erilaisia vaihtoehtoisia aminohappojäännöksiä edeltävälle Cys-jäännökselle; g-1 ovat kokonaislukuja, joilla kullakin on arvo nolla tai yksi edellyttäen, että mikäli jollakin luvuista g-1 on arvo nolla, niin vastaava yksittäinen R_{g-1}^{7-12} -ryhmä puuttuu, ja vähintään kahden luvuista g-1 arvo on nolla edellyttäen lisäksi, että vähintään yksi pari yksittäisiä R_{g-1}^{7-12} -ryhmiä edeltävistä Cys-jäännöksistä peräisin olevia ei-vierekkäisiä Cys-jäännöksiä on läsnä, jolloin Cys-jäännösten ei-vierekkäiset parit on valittu ryhmästä, joka käsittää ne Cys-jäännökset, jotka vastaavat ST Ib-polypeptidin aminohappojäännösten paikkoja, jotka on numeroitu 5:llä tai 6:lla ja 9:llä tai 10:llä, 5:llä tai 6:lla ja 14:llä, ja 9:llä tai 10:llä ja 17:llä ST Ib-polypeptidin aminopäästä laskien.

Sen jälkeen kun ensimmäinen polypeptidi on syntetisoitu, sitä voidaan käyttää, ja se liuotetaan tai suspendoidaan vettä sisältävään valmisteeseen pitoisuutena, joka on vähemmän kuin noin 5 milligrammaa millilitrassa, ja mieluummin vähemmän kuin noin 2 milligrammaa millilitrassa, ja mieluiten pitoisuutena, joka on noin 1 milligramma millilitrassa, pitoisuuteen noin 0,1 milligrammaa millilitrassa. Vettä sisältävä valmiste on mieluiten alkalista, ja sen pH-arvo on pienempi kuin noin 10,5.

Tämän jälkeen saatu, polypeptidiä sisältävä valmiste saatetaan kosketuksiin hapettajana toimivan molekulaarisen hapen kanssa. Valmisteen ja molekulaarisen hapen välistä kosketusta pidetään yllä noin 1:stä noin 24:ään tuntia kestävä ajanjakson ajan,

vähintään yhden polypeptidin sisäisen tai yhden polypeptidien välisen vähintään kahden läsnäolevan Cys-jäännöksen väliin syntyvän kystiinin disulfidisidoksen muodostumiseksi.

Monomeerisen molekyylin suositeltavimmassa toteutusmuodossa disulfidisidos muodostuu niiden Cys-jäännösten parien väliin, jotka jäännökset vastaavat ST Ib-polypeptidin aminohappojäännösten asemia, jotka on numeroitu 5:llä ja 14:llä, 6:lla ja 10:llä, ja 9:llä ja 17:llä ST Ib-polypeptidin aminopäästä laskettuna. Tämän molekyylin edelleen suositeltavimmassa toteutusmuodossa molekulaarisen hapen ja ensimmäistä polypeptidiä sisältävän liuoksen välistä kosketusta pidetään yllä sellaisen ajanjakson ajan, joka jakso on riittävä kahden disulfidisidoksen muodostumiseen edellä mainittujen Cys-jäännösten parien väliin, ja edelleen suositeltavammin riittävä kolmen molekyylin sisäisen kystiinin disulfidisidoksen muodostumiseen näiden Cys-jäännösten parien väliin.

Tällä keksinnöllä on useita hyötyjä ja etuja. Eräs tällainen hyöty on, että se tuottaa immunologisesti aktiivisen ST:n lähteen, jolloin ST:tä voidaan valmistaa suuria määriä ja jokoseenkin puhtaana. Eräs tämän keksinnön eduista on se, että synteettistä ST:tä voidaan käyttää ihmisiä ja muita eläimiä rokotettaessa ST:tä tuottavia E.coli-kantoja vastaan. Toinen tämän keksinnön etu on se, että synteettistä ST:tä voidaan käyttää diagnostisessa reagenssissa tai reagenssijärjestelmässä kokeillessa ST:tä tuottavan E.coli:n aiheuttaman infektion läsnäoloa.

Tämän keksinnön lisäetu on edelleen siinä, että sellaisia ST-molekyyliä, joiden antigeenisuus on natiivin toksiinin antigeenisyyden moninkerta, voidaan valmistaa. Edelleen keksinnön etuna on se, että sellaisia synteettisiä ST-polypeptidejä, joilla natiiviin toksiiniin verrattuna on huomattavasti vähemmän biologistaa aktiivisuutta, voidaan valmistaa. Tämän keksinnön muut edut ja hyödyt ilmenevät alan asiantuntijoille seuraavista yksityiskohtaisista malliesimerkeistä ja patenttivaatimuksista.

Piirustuksissa, jotka muodostavat tämän julkaisun osan; Kuva 1 esittää synteettisen ja biologisen ST:n potentiaalia indusoida nesteen erittymistä imevän hiiren kokeessa. Yksi hiiriyksikkö (MU) on määritetty siksi toksiniinimääräksi, jolla saavutetaan suhteen sisälmysten (suoliston) paino : ruumiin paino arvoksi vähintään 0,083. Esitetyt MU-arvot ovat yksiköissä mikrogrammaa toksiniin kohden. Abskissa esittää toksiniin annostuksen nanogramminoina (ng).

Kuva 2 esittää nesteen erittymistä sen jälkeen kun toksiniin on tiputettu 18 tunnin ajan ruuatta olleiden rottien ligatoituihin suolisilmukoihin. Oordinaatan arvot ovat mikrolitraa nestettä senttimetriä suolenpituutta kohden. Abskissan arvot ovat toksiniinannostuksen nanogrammoja. ED_{50} tarkoittaa sitä annostusta nanogramminoina, jolla saadaan aikaan puolet suurimmasta mahdollisesta erittymisresponssista.

Kuva 3 esittää synteettisen ja biologisen ST:n antigeenisyyttä, joka on määritetty kaksoiskerros-ELISA-menetelmää käyttäen, käyttäen biologisen ST:n hyperimmuunia antiseerumia. Näiden kahden ST-toksiinin antigeenisuus oli jokseenkin sama, kun niitä kokeiltiin synteettisen ST:n hyperimmuunia antiseerumia vastaan. Oordinaatan yksiköt ovat optisen tiheyden yksiköissä, kun taas abskissa on antigeeninä toimivan ST:n nanogrammoja.

Kuva 4 esittää hyperimmuunin antiseerumin neutraloivaa vaikutusta toksiniinien erittymistehoon synteettisellä tai biologisella ST:llä, imevän hiiren kokeessa.

Kuva 5 esittää niiden konjugaattien koostumusta ja ominaisuuksia, jotka konjugaatit on saatu konjugoimalla synteettistä ST:tä LT-holotoksiiniin alkuperäisen moolisuhteen ollessa 100:1 vaihtelevien karbodi-imidireagenssin 1-etyyli-3-(3-dimetyyliamino-propyyli)-karbodi-imidi (EDAC) pitoisuuksien läsnäollessa. Lopullisissa konjugaateissa olevan ST:n prosenttiset osuudet (oordinaatta) perustuvat Lowry-proteiinin painoon [Lowry et al.,

J. Biol. Chem., 193:265-275 (1951)7. Toinen, sisempi abskissa esittää konjugaatissa jäljellä olevan LT-holotoksiinin toksisuutta prosentteina konjugoimattoman LT-holotoksiinin toksisuudesta.

Kuva 6 esittää synteettisen ST:n ja LT:n B-alayksiköiden välisen alkuperäisen moolisuhteen vaikutusta lopulliseen konjugaattiin sisältyneen ST:n määrään määritettynä radioaktiivisella jodilla merkityn ST:n merkkiannosta käyttäen. EDAC:n suhde konjugaattiin oli 2:1.

Kuva 7 esittää EDAC:n ja konjugaatin välisen suhteen muuntelun vaikutusta niiden konjugaattien koostumukseen ja antigeenisyyteen, jotka konjugaatit oli saatu synteettisen ST:n ja B-alayksikön alkuperäisen moolisuhteen ollessa 50:1. Tiedot ST:stä on esitetty vasemmassa palstassa, kun taas tiedot B-alayksiköstä on esitetty oikeassa palstassa. Antigeeniyksiköt, ilmoitettuna 100 mikrogrammaa konjugaattia kohden, oli saatu kertomalla keskenään läsnäolevan toksiinin prosenttinen määrä (painona) ja antigeenisyyden prosenttinen osuus. Ympyröidyt numerot osoittavat EDAC:n ja kunkin spesifisen toksiinin suhteen.

Kuva 8 esittää synteettisen ST:n ja B-alayksikön välisen alkuperäisen moolisuhteen muuttamisen vaikutusta konjugaattien koostumukseen ja antigeenisyyteen. Tiedot on esitetty kuten kuvassa 7. Ympyröidyt numerot osoittavat EDAC:n suhteen kuhunkin spesifiseen toksiiniin. EDAC:n ja konjugaatin välinen suhde oli 1,5:1.

Kuva 9 esittää sitä suojaa, joka saavutettiin rotissa, jotka oli tehty immuuneiksi porsaen immunoglobuliini G:hen (PIG) kytkeytyllä, joko B-alayksikköä tai synteettistä ST:tä käsittävällä asteittaisella antigeenin yksikköannostuksella. Rotat, joille annettiin ruuansulatuskanavan sisäistä (i.p.) primääristä immunointia varten vaihtelevia annoksia (vasen palsta), saivat kaikki yhteensä suun kautta (p.o.) 2000 antigeeniyksikön jarruttavan annoksen; niille, joille annettiin vaihtelevia jarruttavia

annoksia p.o. (oikea palsta), annettiin primääri immunointi i.p. 200 antigeeniyksiköllä. Kussakin palstassa olevat mukosaaaliset IgA-antitoksiinin (mukosaali-AT) arvot esittävät immunoiduissa rotissa olevan tiitterin geometrisen keskiarvon käänteisluvun kasvua immunoimattomien vertailurottien vastaviin arvoihin verrattuna. Neliöissä olevat numerot esittävät ST-mukosaalin AT-arvoja, kun taas ympyröissä olevat numerot ilmoittavat mukosaaalisen AT-arvon LT B-alayksiköille.

Kuva 10 esittää sitä suojaa, joka saavutettiin ihmisen LT^+/ST^+ E.coli-kannan (O----O) uhkaa vastaan, verrattuna siihen suojaan, joka saavutettiin ihmisen ainoastaan LT- tai ST-E.coli-kannan (● — ●) uhkaa vastaan rotissa, jotka oli tehty immuuneiksi PIG:hin liitettyllä, joko B-alayksikön tai synteettisen ST:n asteittaisilla p.o. antigeenin yksikköannostuksilla. Kaikille rotille annettiin i.p. primäärinen immunointi 200 antigeeniyksiköllä.

Kuva 11 esittää ST:n (● — ●) ja B-alayksikön (O----O) välisen alkuperäisen moolisuhteen muuttamisen vaikutusta ristisidoksellisessa rokotteessa olevien toksiniyhdisteiden antigeenisyyteen. Karbodi-imidin suhde konjugaattiproteiiniin oli jatkuvas-
ti 1,5:1, painoina.

Kuva 12 esittää ST:n immunogeenisyyttä, kun ST:tä annetaan PIG:hin yhdistettynä tai ristisidoksellisen rokotteen komponenttina. Kaikille rotille annettiin (i.p.) primääri immunointi 200 ST-antigeeniyksiköllä, mitä seurasivat asteittaiset, suun kautta annetut (p.o.) ST-annokset, kuten abskissalla on esitetty, jonka jälkeen ne altistettiin ihmisen LT^-/ST^+ E.coli-kannan uhalle. Mukosaaaliset AT-arvot on esitetty ympyröissä tai neliöissä olevilla numeroilla, ja ne ovat kuten kuvassa 9 on esitetty.

Kuva 13 esittää kytkemättömän, synteettisen ST:n toksisuutta (vasen palsta) ja rokotteen toimivan, PIG:hin yhdistetyn ST:n toksisuutta (oikea palsta) imevän hiiren kokeessa. Arvot ovat

kulloisenakin päivänä kolmen hiiren keskiarvoja $\pm$ keskiarvon standardipoikkeama. MED, pienin tehokas annos, on se annos (tässä nanogrammaa mikrogrammassa), jolla saavutetaan suoliston: ruumiinpainojen suhde, joka on vähintään 0,083, positiivinen responssi. Abskissat esittävät niitä annostuksia, jotka on annettu nanogrammoina (vasen palsta) tai mikrogrammoina (oikea palsta).

Kuva 14 esittää kytkemättömän synteettisen ST:n toksisuutta (vasen palsta) ja PIG:hin kytketyn ST:n toksisuutta (oikea palsta) rokotteenä rotan ligatoiduissa suoliston silmukoissa. Arvot ovat kunkin päivän kolmen rotan keskiarvoja $\pm$ keskiarvon standardipoikkeama. ED₅₀ on se annostus nanogrammoina tai mikrogrammoina, jolla saavutetaan puolet maksimaalisesta erittymisresponssista. "Kuumennettu" tarkoittaa sitä, että rokotetta pidettiin 65°C:ssa tunnin ajan ennen kokeen suorittamista. Abskissalla on esitetty ne annostukset, jotka on annettu nanogrammoina (vasen palsta) tai mikrogrammoina (oikea palsta).

Kuva 15 esittää sitä suojaa, joka saavutettiin immunoiduissa rotissa. Vaakasuora viiva tarkoittaa 50 % immunoimattomien eläinten maksimaalisesta erityksestä ja ED₅₀ tarkoittaa sitä annostusta nanogrammoina, joka tuotti tämän arvon tässä rotaryhmässä. PI tarkoittaa suojaindeksiä, ja IP/PO (vatsakalvon sisäinen/suun kautta tapahtuva) tarkoittaa immunointitapahtuman reittiä. Ylemmässä palstassa esitetään tulokset, jotka on saatu LT:n uhasta, kun taas alemmassa palstassa esitetään ne tulokset, jotka on saatu monomeerisen ST:n uhasta. Kummankin paneelin abskissat esittävät uhkaavan toksiinien annostusta nanogrammoina. Oordinaatta esittää erittymistilavuuden millilitroina/suolisilmukan senttimetriä kohden.

Kuva 16 esittää sitä suojaa, joka on saavutettu immunoiduissa jäniksissä. Merkitykset ovat samat, kuin kuvassa 15, paitsi että uhkaavat annokset ja ED₅₀-arvot ovat mikrogrammoina, ja IM/PO tarkoittaa immunointireittiä lihaksen sisäisesti/suun kautta tapahtuvasti.

Kuva 17 on käyrä, joka esittää polymeerisen ST (P-ST)-valmisteen erottamista Sephadex G-50-kolonnikromatografiaa käyttäen. Abskissan numerot viittaavat kolonnin eluaattia keräävien putkien numeroihin, kunkin putken kerätessä 4,5 millilitraa eluaattia, kun taas ordinaatan numerot viittaavat keräilyputkien sisällön optiseen tiheyteen, joka on mitattu arvolla 278 nanometriä. Numeroilla 5-9 varustettujen keräilyputkien sisältö yhdistettiin, pääasiassa P-ST:tä sisältävän liuoksen saamiseksi, kun taas numeroilla 10-18 varustettujen keräilyputkien sisällöt yhdistettiin pääasiassa synteettistä monomeerista ST:tä (M-ST) sisältävän liuoksen saamiseksi.

Kuva 18 esittää annos-erittymisen responssiarvojen graafista kuvausta immunoiduissa (●) ja immunoimattomissa (○) rotissa, joita uhattiin. E.coli-ST:n (—) tai Klebsiella pneumoniae ST:n (----) asteittaisia annoksia tiputtamalla ligatoituihin suolisilmukoihin 18 tunnin ajan. Rotat oli immunoitu rokotteella, joka sisälsi immunogeenina synteettistä monomeerista ST:tä, joka oli kytketty luonnolliseen LT B-alayksikköön. Abskissa esittää uhkaavan toksiinimäärän nanogrammina, kun taas ordinaatta esittää niiden suolisilmukoiden erittymisresponssia mikrolitroina silmukan senttimetriä kohden. ED_{50} tarkoittaa sitä annosta, joka tuottaa 50 % maksimaalisesta erityksestä immunoimattomissa rotissa. PI on suojaindeksi, joka on saatu jakamalla immunoiduissa eläimissä oleva toksiiniannos, jolla saavutettiin sama erittyminen kuin 50 % tehokkaalla annoksella (ED_{50}) immunoimattomissa eläimissä, immunoimattomien eläinten arvolla.

Kuva 19 on käyrä, joka esittää synteettisen monomeerisen ST:n (M-ST; ●----●), synteettisen multimeerisen pää-loppupää-ST-dimeerin (ST/ST; ○----○) ja polymeerisen synteettisen ST-valmisteen (P-ST; Δ — · — Δ) suhteellisia antigeenisyyksiä, määritettynä kaksoiskerros-ELISA-menetelmää käyttäen M-ST-konjugaattiin liitetyn hyperimmuunisen antiseerumin kanssa. Prosenttinen antigeenisuus perustuu siihen ST:n mikrogrammamäärään, joka tarvitaan tuottamaan 0,600:n optinen tiheys 410 nanometrillä. Abskissa esittää ST:n määrän mikrotiitterilevyn koloa kohden mikrogrammina.

Kuva 20 esittää kolmen sellaisen ST-valmisteen ominaisuuksien graafisia kuvioita, jotka ST:t on konjugoitu LT B-alayksikköön glutaraldehydiä kytkevä aineena käyttäen, glutaraldehydin ja B-alayksikön moolisuhteen ollessa 700:1. Palstassa A esitetään ne konjugaatit, jotka on valmistettu käyttäen synteettistä monomeeristä ST:tä (M-ST), palstassa B esitetään ne konjugaatit, jotka on valmistettu synteettistä multimeeristä pääloppupää-ST-dimeeriä (ST/ST) käyttäen, ja palstassa C esitetään ne konjugaatit, jotka on valmistettu polymeeristä synteettistä ST:tä (P-ST) käyttäen. Kunkin palstan abskissan numerot esittävät kyseessä olevan ST-valmisteen ja B-alayksikön välistä molaarista suhdetta alkuperäisessä konjugointireaktion seoksessa. Kunkin palstan vasemmanpuoleinen oordinaatta tarkoittaa reaktioseoksessa olevan toksiinimäärän painoprosenttia, ja yhtenäisen viivan (—) yhdistämät mittapisteet esittävät kahden reaktioseoksessa olevan toksiinin moolisuhdetta. Kunkin palstan oikeanpuoleinen oordinaatta esittää antigeeniyksiköiden määrättyä lukumäärää valmistetun rokotteen milligrammaa kohden, ja pilkkuviivalla (---) yhdistetyt mittapisteet esittävät kunkin konjugaatin antigeenisyyttä. ST-toksiiniin viittaavat käyrät on piirretty täytetyillä ympyröillä (●), kun taas B-alayksikkö-toksiiniin viittaavat käyrät on piirretty avoimilla ympyröillä (○). Vastaavasti B-alayksikköön ja synteettiseen ST:hen liittyvään tietoon viittaavat kirjaimet "B" ja "ST" on samoin merkitty kunkin viivan viereen selvyuden vuoksi. Konjugaattien antigeeniyksiköt määritettiin kaksoiskerros-ELISA-menetelmällä M-ST:n antiseerumilla; kaikkien konjugaattien ST-arvot on ilmoitettu M-ST-antigeeniyksiköiden suhteen.

Kuva 21 esittää sellaisten rokotteiden immunogeenisyyttä, jotka rokotteet sisältävät synteettisen monomeerisen ST:n (M-ST) tai polymeerisen synteettisen ST:n (P-ST) konjugaatteja LT B-alayksikön kanssa, rokotteiden aiheuttaessa pienentyntä eritystä (molempien palstojen oordinaatta) ja immunoinnin jälkeen lisääntyntä mukosaaalisia IgA-antitoksiinititeereitä. Kaikille rotille annettiin primäärinen ruuansulatuskanavan sisäinen immunointi, joka sisälsi 200 antigeeniyksikköä jompaa kumpaa

konjugaattia, mitä seurasi suun kautta annetut (p.o.) saman rokotteen eri määriä olevat lisäannokset. Rotat altistettiin elävän, ihmisestä peräisin olevan LT^-/ST^+ -kannan uhalle tiputamalla tätä kantaa eläimiin. Mukosiaalisen IgA-antitoksiinin (AT) arvot on ympyröity ja ne on esitetty immunoitujen rottien tiittereiden pääasiallisena kasvuna immunoimattomien vertailurottien vastaaviin arvoihin verrattuna; P-ST-konjugaattia sisältävällä rokotteella immunoitujen rottien AT mitattiin ja se on ilmoitettu M-ST-tiittereinä. Palstan A tiedot on esitetty suun kautta annettuina (p.o.) kokonaisannoksina M-ST-antigeenin yksiköissä, kun taas palstan B tiedot on esitetty suun kautta annettuina (p.o.) kokonaisannoksina, mikrogrammoina ST:tä, M-ST:nä, joka ST sisältyi annettuihin annoksiin.

Kuva 22 käsittää kaksi käyräpalstaa, jotka esittävät toksiinin painoprosenttia ja antigeeniyksiköiden lukumäärää milligrammassa konjugaatteja, jotka on valmistettu polymeerisestä ST:stä (P-ST) ja LT B-alayksiköstä konjugaattien P-ST:n ja B-alayksikön välisen moolisuhteen funktiona. Niiden konjugaattien ominaisuudet, jotka valmistettiin dimetyyli-suberimidaattia käyttäen (DMS), on esitetty palstassa A, kun taas niiden konjugaattien, jotka valmistettiin EDAC:ia γ -etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)-karbodi-imidiä käyttäen, ominaisuudet on esitetty palstassa B. Kummankin palstan LT B-alayksiköihin viittaavat tiedot on esitetty kolmioina, kun taas P-ST:hen viittaavat tiedot on esitetty ympyröinä. Täytetyt kolmiot ja ympyrät (Δ , $\odot$), ja yhteinäiset viivat viittaavat toksiinin prosenttisuuksiin, kun taas avoimet kolmiot ja ympyrät (Δ , $\circ$), sekä pilkkuviivat viittaavat antigeeniyksiköiden tietoihin. Yhdistävän aineen ja B-alayksikön painosuhteet olivat 1:1 DMS:lle ja 1,5:1 EDAC:lle.

I. Synteettinen ST

Tässä keksinnössä käsitellään synteettisesti tuotettuja polypeptidejä, joiden aminohappojärjestys on vähintään sama, kuin Escherichia coli:n (E.coli) tuottaman lämpöstabiilin enterotoksiinin (ST) karboksipään neljätoista aminohappojäännöstä.

Tämän keksinnön synteettiset polypeptidit monomeerisessä ja multimeerisessä muodossaan ovat käyttökelpoisia rokotteiden immunogeeneina tai niiden osina, joita rokotteita voidaan käyttää suojaamaan tämänkaltaisia toksiineja tuottavan *E.coli*:n aiheuttamia ripuli-infektioita vastaan, kuten myös muiden bakteereiden, kuten *Klebsiella pneumoniae*:n, jotka tuottavat samankaltaisia toksiineja, aiheuttamia infektioita vastaan. Monomeeriset ja multimeeriset synteettiset ST-polypeptidit ja niitä vastaan tuotetut vasta-aineet ovat myös käyttökelpoisia diagnostiikassa, jossa pyritään saamaan selville ST:tä tuottavien organismien, kuten *E.coli*:n, läsnäolo.

Immunointiin tarkoitettuina rokotteina käytettäessä synteettisiä ST-polypeptidejä voidaan käyttää yksin, kuten polymeerisen ST- (P-ST) multimeerin tapauksessa tai niitä voidaan käyttää kantajaan yhdistettyinä konjugaatteina, kuten monomeerisen ST:n (M-ST) ja ST-multimeerien tapauksissa. Tämänkaltaisessa rokotteessa synteettistä ST-immunogeenia on läsnä tehokas määrä, ja se dispergoidaan tai liuotetaan fysiologisesti siedettävään laimentimeen.

Erityisen käyttökelpoisiin konjugaattien kantajiin kuuluvat *E.coli*:n lämpöstabili enterotoksiini (LT) sekä pienempi, tämän toksiinin B-alayksikkö (LT B). Edelleen käyttökelpoisiin kantajiin kuuluvat porsaan immunoglobuliini G (PIG), tarttuva avainreikä-hemosyaniini (KLH), tetanustoksoidi, poly-L-(Lys:Glu), maapähkinän agglutiniini, ovalbumiini, soijapavun agglutiniini, härän veren albumiini ja muut senkaltaiset aineet.

Fysiologisesti siedettyihin (hyväksyttyihin) laimentimiin kuuluvat mm. vesi, suolaliuos, fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS) ja muut vastaavat, ja tyypillisesti ne edelleen sisältävät apuainetta. Täydellinen Freund'in apuaine (CFA), epätäydellinen Freund'in apuaine (IFA) ja aluma ovat tavallisesti käytettyjä apuaineita, jotka tunnetaan hyvin alalla, ja niitä on kaupallisesti saatavana useista lähteistä.

Rokotteeseen sisältyvää ST-immunogeenia on läsnä "tehokas määrä", joka määrä riippuu lukuisista tekijöistä, mikä hyvin tunnetaan immunologian alalla. Näiden tekijöiden joukkoon kuuluvat immunoitavan eläimen ruumiin paino ja laji, kantaja mikäli sitä käytetään, ja ST:n kytkemisessä kantajaan käytetty aine, apuaine mikäli sitä käytetään, toivottavan suojauksen kesto, ja käytettävä immunointitapa.

Esimerkiksi eräissä uhkatutkimuksissa rotille annettiin noin 1500:sta noin 2500:aan antigeeniyksikköä (määritetty jäljempänä olevassa osassa III B), kun ne immunoitiin ST-konjugaatilla siten, että ruuansulatuskanavan sisäisiä injektioita seurasi kaksi suun kautta annettua lisäännosta. Toisessa uhkatutkimuksessa jäniksille annettiin noin 2500:sta noin 3000:een ST:tä sisältävän konjugaatin antigeeniyksikköä ja ne tulivat suojatuiksi.

Tämänkaltaisissa rokotteissa olevan synteettisen ST:n paino riippuu käytettyjen ST-valmisteiden antigeenisyyksistä ja ST:tä sisältävän konjugaatin antigeenisyydestä. Täten sitä tietoa käyttäen, että rotat tulivat uhkaa vastaan suojatuiksi, kun ne immunoitiin yhteensä noin 1500:sta noin 2500:aan ST:tä sisältävän rokotteen antigeeniyksiköllä, jolloin M-ST--LT B-konjugaattia annettiin noin 1500:sta noin 2500:aan mikrogrammaa rottaa kohden, kun taas samanlaisen tuloksen saamiseksi noin 100:sta noin 300:aan mikrogrammaa P-ST--LT B-konjugaattia annettiin rottaa kohden. Yhteensä noin 600 mikrogrammaa kytkemätöntä (konjugoimatonta) P-ST:tä käytettiin jäniksissä takaamaan sellainen antiseerumitiitteri, joka oli riittävä osoittamaan suojan uhkaa vastaan.

Täten nähdään, että se ST:n määrä, joka tarvitaan takaamaan "tehokkaan määrän", saattaa vaihdella huomattavasti. Kuitenkin alan asiantuntija saa tehokkaan määrän selville rutiininomaisia laboratorimenetelmiä käyttäen seuraavien tarkastelujen ja lausuntojen avulla.

Tämän keksinnön toteutusmuotona oleva synteettinen ST osoittaa antigeenisyyttä sekä yksin olevana monomeerinä että proteiini-kantajaan konjugaatiksi sitoutuneena tai yksin olevana multi-meerinä tai konjugaatiksi kantajaan liittyneenä, eli joka antigeenisuus on vähintään noin 10 % E.coli:sta saatavan biologisen, natiivin ST:n osoittamasta antigeenisyydestä, joka E.coli infektoi ihmisiä ja muita eläimiä. Tunnettua on, että monomeerinen, luonnollisesti esiintyvä, biologinen ST käsittää kuusi Cys-jäännöstä, jotka muodostavat kolme molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä kystiini-jäännösten disulfididisidosta. Toiset tutkijat, Chan et al., supra, ovat osoittaneet kystiinin disulfididisidosten läsnäolon olevan välttämätöntä luonnollisesti esiintyvän ST:n toiminnalle.

Kaksi kuudesta ST:n Cys-jäännöksestä voi teoreettisesti yhdistyä 15 erilaisella tavalla yhden kystiini-jäännöksen disulfididisidosta muodostaessaan. Toisen disulfididisidoksen muodostumiseen jää kuusi mahdollista pariutuneiden Cys-jäännösten yhdistelmää, ja jonka jälkeen ainoastaan yksi yhdistelmä on jäljellä kolmatta disulfididisidosta varten. Täten kuusi Cys-jäännöstä ja kaksi tai kolme disulfididisidosta käsittävän ST:n kunkin primäärisen aminohappojäännösten järjestykselle on olemassa yhdeksänkymmentä (15x6x1) teoreettisesti mahdollista sekundääristä rakenneisomeeriä.

Kuitenkin johtuen siitä käytännön vaikeudesta, jota esiintyy kystiinin disulfididisidoksen muodostuessa vierekkäin olevien Cys-jäännösten parien väliin, joita jäännöksiä ST-molekyyliin on kaksi paria ja lukuisina mahdollisina rakenteina, niin olemassa on huomattavasti vähemmän kuin yhdeksänkymmentä sekundääristä, kaksi tai kolme disulfididisidosta käsittävää rakenneisomeeriä. Niitä Cys-jäännösten spesifisiä pareja, jotka muodostavat luonnollisesti esiintyvän, biologisen ST:n disulfididisidokset, ei tunneta.

On todettu, että immunologisesti aktiivista, synteettistä ST:tä voidaan valmistaa, jonka ST:n primäärinen aminohappojäännösten

järjestys on jokseenkin sama kuin luonnossa esiintyvän, biologisen ST:n, mutta jonka sekundäärinen rakenne, jonka disulfidisidosten muodostuminen määrää, eroaa luonnossa esiintyvän ST:n rakenteesta. Antigeenista aktiivisuutta löydetään sellaisista monomeerisistä synteettisistä ST-molekyyleistä, jotka käsittävät ainoastaan yhden polypeptidin sisäisen kystiinin disulfidisidoksen läsnäolevien Cys-jäännösten parien joukossa. Synteettiseen monomeeriseen ST:hen saadaan parantunutta antigeenisyyttä, kun Cys-jäännösten polypeptidin sisäisen kahden parin väliin muodostuu kaksi disulfidisidosta, kun taas maksimaalinen antigeeninen aktiivisuus saavutetaan, kun Cys-jäännösten kolmen parin välille muodostuu kolme polypeptidin sisäistä disulfidisidosta. Synteettisen ST:n multimeerisissä muodoissa on läsnä vähintään yksi molekyylinsisäinen, polypeptidin sisäinen kystiinin disulfidisidos, tai yksi molekyylin sisäinen, polypeptidien välinen kystiinin disulfidisidos, kuten jäljempänä esitetään.

Tässä käytettävän synteettisen ST:n kuvataan olevan monomeerisessä ja multimeerisessä muodossa. Monomeerinen, synteettinen ST käsittää vähintään ne neljätoista aminohappojäännöstä (14-meeri), jotka jäljempänä on esitetty kaavassa I, johon kuuluvat myös lukuisat esitetyt R-ryhmät.

Multimeerinen synteettinen ST käsittää lukuisia, vähintään 14-meerisistä synteettisistä ST:stä muodostuneita toistuvia yksiköitä. Eräässä toteutusmuodossa multimeerin synteettisen ST:n muodostamat toistuvat yksiköt ovat sitoutuneet toinen toisiinsa pää-loppupää-tavalla, eli yhden toistuvan yksikön aminopään amiini on sitoutunut amidisidoksella toisen, synteettisen ST:n muodostaman toistuvan yksikön karboksipään karboksyyliin, jolloin syntyy multimeeri, joka käsittää vähintään kaksi toistuvaa ST-yksikköä.

Tavalla pää-loppupää toisiinsa yhdistyneitä, ST:stä muodostuneita toistuvia yksiköitä sisältäviä ST-multimeerejä kutsutaan

joskus seuraavassa dimeereiksi, trimeereiksi, tetrameereiksi, ja muiksi vastaaviksi ST-multimeereiksi osoittamaan multimeerin sisältävien ST:stä muodostuneiden toistuvien yksiköiden lukumäärää. Dimeerinen ST-multimeeri esitetään siis joskus lyhyessä muodossa ST/ST, trimeeri ST-multimeeri lyhyessä muodossa ST/ST/ST ja niin edelleen, jolloin kukin "ST" tarkoittaa vähintään 14-meeristä polypeptidiä, jonka järjestys on esitetty kaavassa I.

Toinen tämän keksinnön toteutusmuoto on ST-multimeeri, johon seuraavassa viitataan "polymeerisellä synteettisellä ST:llä", "synteettisellä ST-polymeerillä" tai "P-ST:llä". Tässä toteutusmuodossa erilliset ST-polypeptidin toistuvat yksiköt ovat sitoutuneet toisiinsa polypeptidien välisillä kystiinin disulfidisidoksilla, jotka ovat muodostuneet ST:n muodostaman toistuvan yksikön Cys-jäännösten väliin ja joukkoon. Polymeerisen synteettisen ST:n kukin ST:n muodostama toistuva yksikkö sisältää siis vähintään ne neljätoista aminohappojäännöstä, jotka on esitetty kaavassa I.

Tämän keksinnön mukaisia ST:n multimeerisiä muotoja voidaan myös kuvata polymeerikemiassa tavallisesti käytetyillä termeillä. Tätä terminologiaa käyttäen, pää-loppupää-tyyppistä multimeeristä ST:tä, jonka toistuvat yksiköt, joilla on ST:n aminohappojäännösten järjestys, ovat sitoutuneet toisiinsa yhden toistuvan yksikön karboksipään karboksyyli ryhmän ja toisen toistuvan yksikön aminopään amiiniryhmän välisellä amidisidoksella, voidaan myös kutsua suoraketjuiseksi ST-oligopolymeeriksi (oligomeeriksi), tai palaoligomeeriksi, jonka toistuvilla paloilla on ST-polypeptidin aminohappojäännösten järjestys. Luullaan, että edellä esitettyä polymeeristä ST:tä, jonka toistuvat yksiköt, joilla on ST:n aminohappojäännösten järjestys, ovat sitoutuneet toisiinsa polypeptidien välisillä kystiinin disulfidisidoksilla, voidaan kuvata ristisidoksisena tai verkkomaisena polymeerinä, jonka lukuisilla toistuvilla yksiköillä on ST-polypeptidin aminohappojäännösten järjestys ja jonka

ristisidokset ovat muodostuneet polypeptidien välisistä kystiinin disulfididisidoksista.

Yllä esitetty terminologia säilyttäen, edellä esitettyjä toistuvia yksiköitä sisältäviä multimeerejä, joilla yksiköillä on pääasiassa ainoastaan yksi ST:n aminohappojäännösten järjestys, voidaan nimittää suoraketjuisiksi ST-homo-oligopolymeereiksi tai ristisidokselliseksi (verkkomaisiksi) homopolymeereiksi, vastaavasti. Multimeerit voivat myös sisältää sellaisia toistuvia yksiköitä, joilla on erilainen tai eripituinen aminohappojäännösten järjestys, missä tapauksessa näitä multimeerejä voidaan kutsua suoraketjuisiksi ST-ko-oligopolymeereiksi tai ristisidokselliseksi (verkkomaisiksi) kopolymeereiksi.

On ymmärrettävä, että edellä esitetyt synteettisen ST:n multimeeriset muodot edustavat vain kahta useasta mahdollisesta ST-multimeeristä. Esimerkiksi kun sellaista multimeeriä, johon viitataan pää-loppupää-tyyppisenä multimeerinä tai suoraketjuisena homo-oligopolymeerinä, jolla on kaksi toistuvaa yksikköä, valmistetaan hapettamalla sellaista 36-jäännöksistä ensimmäistä polypeptidiä, jolla on kahden ST-polypeptidin aminohappojäännösten järjestystä vastaava järjestys, niin myös sellaista polymeeristä ST:tä, jossa on polypeptidin välisiä kystiinin disulfididisidoksia (verkkomainen homopolymeeri), muodostuu. Tämän verkkomaisen homopolymeerin toistuvat yksiköt käsittävät kaksi ST:n 18-meeristä aminohappojäännösten järjestystä toistuvassa yksikössä. Kopolymeeri voidaan valmistaa hapettamalla 18-meeriset ST:n ensimmäiset polypeptidit edellä mainittujen 36-meeristen multimeeristen ST:n ensimmäisten polypeptidien kanssa, jolloin saadaan verkkomaista tai ristisidoksellista materiaalia, jonka toistuvissa yksiköissä on ST-polypeptidin aminohappojäännösten järjestys.

Tässä sanaa "synteettinen" käytetään tarkoittamaan sitä, että ST-polypeptidin molekyyli tai polypeptidin toistuva yksikkö on muodostettu kemiallisin keinoin (syntetoitu kemiallisesti),

•

I



ja ne on valittu ryhmästä, johon kuuluu vety, 1:stä noin 4:ään hiiliatomin alkyyli-ryhmä, 2:sta noin 20:een hiiliatomin substituoitu alkyyli-ryhmä, 1:stä noin 8:aan hiiliatomin asyyli-ryhmä ja 2:sta noin 10:een hiiliatomin substituoitu asyyli-ryhmä; R_{g-1}^{7-12} -ryhmät ovat samoja tai erilaisia vaihtoehtoisia amino-happojäännöksiä kulloinkin välittömästi edeltävälle Cys-jäännökselle; ja

luvusta a-f vähintään kaksi, ja luvusta g-l kaksi on nollia ja kaksi Cys-jäännöstä on läsnä edellyttäen, että synteettinen polypeptidi käsittää vähintään yhden molekyylin sisäisen kystiinin disulfidisidoksen, joka on muodostunut vähintään kahdesta läsnäolevasta Cys-jäännöksestä.

Monomeerisen muodon ollessa kyseessä ylläoleva, vähintään yksi disulfidisidos on molekyylin sisäinen, polypeptidin sisäinen kystiinin disulfidisidos, joka on muodostunut vähintään kahden antigeenisessä polypeptidissa läsnäolevan Cys-jäännöksen väliin. Kun antigeeninen polypeptidi on multimeerisessä muodossa, joka käsittää lukuisia polypeptidin muodostavia toistuvia yksiköitä, niin edellä mainittu disulfidisidos voi olla molekyylin sisäinen, polypeptidin sisäinen kystiinin disulfidisidos, joka on muodostunut vähintään kahden kussakin polypeptidin muodostamassa toistuvassa yksikössä läsnäolevan Cys-jäännöksen väliin, tai tämä disulfidisidos voi olla molekyylin sisäinen, polypeptidien välinen kystiinin disulfidisidos, joka on muodostunut yhden ensimmäisessä toistuvassa yksikössä läsnäolevan vähintään kahden Cys-jäännöksen ja toisen jälkimmäisessä toistuvassa yksikössä läsnäolevan vähintään kahden Cys-jäännöksen väliin. Tästä johtuen voidaan nähdä, että molekyylin sisäinen kystiinin disulfidisidos on läsnä sekä ST:n monomeerisessä että multimeerisessä muodossa. Monomeerisessä ST:ssä tämä kystiinin disulfidisidos on polypeptidin sisäinen sidos, kun taas multimeerisessä ST:ssä disulfidisidos voi olla polypeptidien välinen tai polypeptidin sisäinen sidos.

Synteettisen ST:n monomeerisen ja multimeerisen muodon suositeltavammassa toteutusmuodossa, edellä esitettyyn, kaavan I mukaiseen antigeeniseen synteettiseen polypeptidiin viitaten:

"e" on nolla kun "a" on nolla,
 "d" on nolla kun "b" on nolla, ja
 "f" on nolla kun "c" on nolla, ja
 kumpikin luvuista "g" ja "k" ovat nollia, kun "a" on nolla,
 kumpikin luvuista "h" ja "j" ovat nollia, kun "b" on nolla, ja
 kumpikin luvuista "i" ja "l" ovat nollia, kun "c" on nolla.

Kaavassa I esitetty järjestys, ilman kolmea spesifistä vaihtoehtoista aminohappoa ja substituenttina toimivia, vaihtoehtoisia R-ryhmiä, vastaa ST Ib:n karboksipään neljäntoista aminohappojäännöksen järjestystä, ja se on homologinen ST Ia:n niiden aminohappojäännösten kanssa, jotka jäännökset on numeroitu 59-72 aminopäästä lukien. ST Ia:n aminohapot 59-72 käsittävät neljäntoista aminohappojäännöstä eroavat edellä olevassa kaavassa I esitetystä järjestyksestä, ilman sen vaihtoehtoisia aminohappoja ja R-ryhmiä, aseman 65 suhteen, jossa asparagiini- (Asn) jäännös korvaa tyrosiini- (Tyr) jäännöksen numerolla 11 varustetussa asemassa ST Ib:n aminopäästä laskien (jäännösasema 8 karboksipäästä laskien), ja aseman 71 suhteen (karboksipää), jossa tyrosiinijäännös korvaa esitetyn asparagiinijäännöksen.

Täten välittömästi aminopäästä laskettuna neljännen Cys-jäännöksen oikealla puolella oleva Tyr-jäännös (Tyr-65) voidaan korvata Asn-jäännöksellä, joka edellä olevassa kaavassa on laitettu sulkuihin. Samanlainen Tyr-jäännöksen korvautuminen Asn-jäännöksellä voi myös esiintyä karboksipäässä, kuten lopussa olevan Tyr-jäännöksen laittaminen sulkuihin esittää.

ST Ic:stä peräisin oleva analoginen neljäntoista aminohappojäännöksen järjestys on sama kuin ST Ib:n järjestys, ST Ic:n asemaa 69 lukuunottamatta, jossa asemassa treoniini- (Thr) jäännös

korvaa ST Ib:n alaniini- (Ala) jäännöksen. Tämäkin korvautuminen on esitetty edellä olevassa kaavassa laittamalla Thr-jäännös sulkuihin.

Erityisen suositeltavaa on, että vähintään yksi niistä neljästä aminopään aminohappojäännöksestä, jotka ovat läsnä 18 jäännöstä käsittävän ST Ib-molekyylin järjestyksessä, olisi myös läsnä luonnollisessa asemallisessa järjestyksessään synteettisessä ST:ssä. Edelleen suositeltavampaa on, että noista lisäamino-hapoista kaikki neljä olisivat läsnä synteettisessä ST:ssä siinä samassa luonnollisessa, asemallisessa järjestyksessä, jossa ne esiintyvät ST Ib:ssä.

Synteettisen ST-molekyylin aminopäässä olevat neljä suositeltavaa lisäaminohappoa vastaavat ST Ia:n aminohappoja, joilla on numerot 55:stä 58:aan ja ne ovat identtisiä noiden neljän ST Ib:ssä olevien aminohappojen kanssa. Kolme neljästä ST Ic:n aminohaposta eroavat joko ST Ia:n tai ST Ib:n niistä aminohapoista, jotka ST Ia:ssa ovat asemassa 55-58. Täten käyttäen edellä mainittua suluissa esitettyä vaihtoehtoista nimeämisjärjestelmää kaavan I mukaisen synteettisen ST:n aminopäässä olevalla 4:n aminohapon polypeptidillä (4-meerillä), suositeltavimmassa toteutusmuodossaan, on se järjestys, vasemmalta oikealle, ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten, joka on esitettyä alla olevassa kaavassa II

Asn (Ser) Thr (Ser) Phe (Asn) Tyr

II

jossa suluissa esitetyt aminohapot voivat korvata välittömästi edeltävän aminohappojäännöksen.

Monomeerinen synteettinen polypeptidi käsittää vähintään yhden molekyylin sisäisen, polypeptidin sisäisen disulfidisidoksen, mieluiten kaksi molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä disulfidisidosta, ja mieluiten kolme molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä disulfidisidosta. Disulfidisidosten uskotaan muodostuneen Cys-jäännösten parien R_a^1 ja R_e^5 , ja R_b^2 ja R_d^4 väliin, sekä Cys-jäännösten R_c^3 ja R_f^6 väliin, kun luvuilla a-f on arvo nolla.

Kuitenkin Cys-jäännökset R_a^1 ja R_b^2 sekä jäännökset R_c^3 ja R_d^4 ovat vierekkäisiä naapuripareja. Näin ollen yhden disulfidisidoksen sisältävillä synteettisillä ST-polypeptideillä voi olla jokseenkin samanlainen sekundäärinen rakenne ja antigeenisuus riippumatta siitä, onko tämä ainut disulfidisidos muodostunut Cys-jäännösten R_a^1 ja R_e^5 vai R_b^2 ja R_e^5 väliin. Samanlaiset tulokset pitävät paikkansa niihin sekundäärisiin rakenteisiin nähden, joita rakenteita Cys-jäännösten R_a^1 ja R_d^4 , pikemminkin kuin R_b^2 ja R_f^6 , ja muiden vastaavien jäännösten väliin syntyvien disulfidisidosten muodostuminen aiheuttaa.

Ensimmäinen polypeptidi, joka syntetisoidaan ennen molekyylin sisäisen, polypeptidin sisäisen disulfidisidoksen hapettavaa muodostamista, sisältää vähintään kaksi Cys-jäännöstä, joten vähintään kahden luvuista g-l arvo on nolla ja vastaavat ryhmät R_{g-l}^{7-12} puuttuvat. Niiden sekundääristen rakenteiden, jotka syntyvät molekyylin sisäisen, polypeptidin sisäisen kystiinin disulfidisidoksen muodostumisella toisen kahdesta vierekkäisestä Cys-jäännöksestä ja toisen Cys-jäännöksen väliin, samanalaisuuteen nähden, monomeeriselle ja multimeeriselle synteettiselle ST:lle lisätään edellytys, että vähintään yksi pari niistä ei-vierekkäisistä Cys-jäännöksistä, jotka edeltävät R_{g-l}^{7-12} -ryhmiä, on läsnä. Tämä pari valitaan siitä ryhmästä, joka käsittää ne Cys-jäännökset, jotka edeltävät jäännöksiä R_g^7 , R_h^8 ja R_i^9 , R_j^{10} , R_g^7 , R_h^8 ja R_k^{11} , ja R_i^9 , R_j^{10} ja R_l^{12} . ST Ib:n aminohappojäännösten asemien suhteen monomeerisen synteettisen ST:n ei-vierekkäiset Cys-jäännösten parit valitaan ryhmästä, johon kuuluvat ne, jotka on numeroitu 5:llä tai 6:lla ja 9:llä tai 10:llä, 5:llä tai 6:lla ja 14:llä, ja 9:llä tai 10:llä ja 17:llä ST Ib:n 18-meerisen polypeptidin aminopäästä laskien.

Multimeeriset synteettiset ST-molekyylit, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa pää-loppupää-tavalla, käsittävät mieluiten vähintään yhden molekyylin sisäisen, polypeptidin sisäisen kystiinin disulfidisidoksen toistuvaa yksikköä kohden. Tällaisten multimeerien kussakin toistuvassa yksikössä läsnäolevat poly-

peptidin sisäiset kystiinin disulfidisillat ovat mieluiten niiden samojen Cys-jäännösten välissä kuin ne sidokset, jotka ovat läsnä monomeerisessä molekyylissä. Edelleen suositeltavampaa on kahden polypeptidin sisäisen, Cys-jäännöksen välisen sidoksen läsnäolo kussakin toistuvassa yksikössä, kun taas kaikkein suositeltavinta on kolmen polypeptidin sisäisen kystiinin disulfidisidoksen läsnäolo kutakin toistuvaa yksikköä kohden.

Tarkasteltaessa polymeerisiä synteettisiä ST-molekyylejä, joissa ST-polypeptidiset toistuvat yksiköt ovat sitoutuneina toisiinsa molekyylin sisäisillä, polypeptidien välisillä kystiinin disulfidisidoksilla, ei välttämättä uskota, että läsnäolevat kaksi Cys-jäännöstä ovat ei-vierekkäisiä. Kuitenkin parempana pidetään sitä, että nuo Cys-jäännökset olisivat ei-vierekkäisiä, kuten edellä on esitetty.

Primäärisen aminohappojäännösten järjestyksensä lisäksi monomeerisen synteettisen ST-molekyylin, joka käsittää yhden polypeptidin sisäisen kystiinin disulfidisidoksen kuuden Cys-jäännöksensä joukossa, asianmukaisena tunnusomaisena piirteenä on myös sen antigeeninen aktiivisuus, joka on vähintään noin 10 % kolme disulfidisidosta käsittävän biologisen ST:n antigeenisestä aktiivisuudesta. Ohutkerroskromatografisen ja elektroforeettisen liikkuvuuden erot kolme molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä disulfidisidosta käsittävien monomeeristen synteettisten ST-molekyylien, ja kirjallisuudessa esiintyvien biologisen ST:n arvojen välillä saattavat myöskin olla hyödyllisiä luonnehdittaessa synteettisiä ST-molekyylejä, jotka käsittävät yhden molekyylin sisäisen, polypeptidin sisäisen disulfidisidoksen, kun tällainen synteettinen ST voi muodostaa kolme molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä kystiinin disulfidia.

Koska samanlaisia Cys-jäännösten pariutumisia, jotka ovat muita kuin niitä, jotka ovat erityisen suositeltavia, voi myös esiintyä kaksi molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä disulfidisidosta käsittävissä, monomeerisissä synteettisissä ST-

molekyyleissä, niin tällaisia ST-molekyylejä voidaan sopivasti luonnehtia myös siten, että niillä on antigeenista aktiivisuutta, joka on vähintään noin 10 % kolme disulfidisisidosta käsittävän biologisen ST:n antigeenisestä aktiivisuudesta. Ohutkerroskromatografiset ja elektroforeettiset liikkuvuudet ovat jälleen käyttökelpoisia luonnehtimaan kaksi molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä disulfidisisidosta käsittäviä, monomeerisia synteettisiä ST-molekyylejä, kun myös kolmas disulfidi voi muodostua.

Synteettisen ST:n antigeenisyyttä prosentteina biologisen ST:n antigeenisyydestä tarkastellaan yksityiskohtaisesti jäljempänä osassa II. Karkeasti ottaen synteettisen ST:n prosenttinen antigeenisuus on kuitenkin suhteellinen mitta antibiologisen ST-vasta-aineen määrälle, joka vasta-aine tunnistaa synteettisen ST:n, biologiseen ST:hen verrattuna, jonka biologisen ST:n samat antibiologiset ST-vasta-aineet tunnistavat. Antigeenisyytstarkastelut perustuvat käytetyn ST-antigeenin painoon, ja ne ovat riippumattomia siitä, onko kokeessa käytetty antigeeni monomeerista vai multimeerista.

Sopivaa antigeenisyyttä on myös havaittu olevan sellaisissa synteettisissä ST-molekyyleissä, joissa Cys-jäännösten rikkiatomit käsittävät muitakin sidososia kuin kystiinin disulfidisisidoksia. Tästä tosiasiasta johtuen synteettisen ST:n edellä esitetyn kaavan I järjestyksen Cys-jäännökset on esitetty sitoutuneiksi R_{a-f}^{1-6} -ryhmiin, joiden identtisyyttä tarkastellaan jäljempänä.

Kuitenkin huomautettakoon, että koska vähintään yksi molekyylin sisäinen, polypeptidin sisäinen kystiinin disulfidisisidos vaaditaan monomeerisen synteettisen ST:n antigeeniseen aktiivisuuteen, sekä tarvittaessa biologiseen aktiivisuuteen, niin kaikki R_{a-f}^{1-6} -ryhmät eivät voi olla läsnä yhdessä synteettisessä molekyylissä. Pikemminkin ainoastaan neljä noista ryhmistä voi olla läsnä missä tahansa yhdessä molekyylissä. Täten esi-

merkiksi, Cys-jäännösten R_a^1 ja R_e^5 ollessa liittyneinä muodostamaan molekyylin sisäisen, polypeptidin sisäisen kystiinin disulfididisidoksen, niin lukujen "a" ja "e" arvot ovat nollia (alla), R_a^1 - ja R_e^5 -ryhmät puuttuvat, ja ainoastaan ryhmät R_b^2 , R_c^3 , R_d^4 , ja R_f^6 voivat olla läsnä monomeerisessä synteettisessä ST-molekyyliässä.

Jotta yhden, kahden tai kolmen molekyylin sisäisen, kystiini-jäännösten disulfididisidoksen, jotka ovat muodostuneet kuuden Cys-jäännöksen joukkoon, olemassaolo voitaisiin selittää, niin kukin R-ryhmästä 1-6 on myös varustettu alaindeksillä, joka on kirjain a-f. Kukin alaindeksin kirjaamista vastaa kokonaislukua, jonka arvo on nolla tai yksi. Suositeltavimmissa toteutusmuodoissa on lisäedellytys, että "e" on nolla, kun "a" on nolla, "d" on nolla, kun "b" on nolla, ja "f" on nolla, kun "c" on nolla, ja edelleen lisäedellytyksenä on, että vähintään jonkin luvuista "a", "b" tai "c" on oltava nolla, ja edelleen lisäedellytyksenä on, että disulfididisidos on läsnä Cys-jäännösten vastaavien parien välissä, jolle parille yhden alaindeksin arvon oleminen nolla vaatii myös toisen alaindeksin arvon olemisen nolla.

Kukin synteettisessä ST:ssä läsnä olevista R_{a-f}^{1-6} -ryhmistä voi olla vety. Tässä tapauksessa se Cys-jäännös, johon R_{a-f}^{1-6} -ryhmä on sitoutunut, on substituoimaton, mikäli vety on tavallinen ryhmä, joka on sitoutunut Cys-jäännöksen rikkiatomiin. Kystiinin rikkiatomiin sitoutuneen tyypin läsnäolo merkitään ohessa merkinnöillä Cys tai CysH.

R_{a-f}^{1-6} -ryhmät voivat olla myös alkyyliryhmiä, jotka käsittävät 1:stä noin 4:ään hiiliatomia. Esimerkkeinä näistä R_{a-f}^{1-6} -ryhmistä mainittakoon metyyli, etyyli, propyyli, i-propyyli, n-butyyli, i-butyyli, ja muut vastaavat.

Edelleen R_{a-f}^{1-6} -ryhmät voivat olla substituoituja alkyyliryhmiä, jotka käsittävät 2:sta noin 20:een hiiliatomia, joissa ryhmissä substituentti voi olla aryyli, substituoitu aryyli, hydroksi,

amino, karboksi, karboksiamido, halo, substituoitu vinyyli, substituoitunut tioryhmät, ja muut vastaavat. Esimerkkejä tämänkaltaisista substituoituista alkyyliryhmistä ovat bentsyyli, alfa-tolyyli, 2-hydroksietyyli, 2-hydroksipropyyli, 2-aminoetyyli, karboksimetyyli- $(-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})$, karboksiamidometyyli- $(-\text{CH}_2\text{CONH}_2)$, p-klorobentsyyli, etyleeni-bis-akrylyyli, 2-tioetaanikarboksi- $(-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})$, ja muut vastaavat.

Niihin substituoituihin alkyyliryhmiin, joista $\text{R}_{\text{a-f}}^{1-6}$ -ryhmät voidaan valita, kuuluu sitojaryhmä, joka on käyttökelpoinen synteettisen ST:n sitomisessa toiseen molekyyliin, kuten anti-geenikantajaan, kuten E.coli:n lämpöstabiilin (LT) toksiinin B-alayksikköön. Esimerkkinä tällaisesta sitovasta ryhmästä ovat diakrylaatit, kuten etyleeni-bis-akrylaatti, joka kykenee reagoimaan yhden kaksoissidoksen verran Cys-ryhmän rikkiatomin kanssa Michael-additioreaktiolla, jolloin toinen kaksoissidos jää vapaaksi, ja se voi sitoutua kantajaan; tioetikkahappo, tiopropionihappo, kysteiini ja N-2-hydroksietyyli-2-tiosukkinimidi, jotka voivat muodostaa sekoittuneita disulfididisidoksia Cys-jäännöksen rikkiatomin kanssa, ja jotka voivat reagoida toisen molekyylin, kuten kantajan, kanssa karboksyyli-ryhmällä, kysteiinin aminoryhmällä tai hydroksietyyli-ryhmällä, vastaavasti.

$\text{R}_{\text{a-f}}^{1-6}$ -ryhmä, vähemmän suositeltavassa toteutusmuodossa, voi olla 1:stä noin 8:aan hiiliatomia käsittävä asyyli-ryhmä, tai 2:sta noin 10:een hiiliatomia käsittävä substituoitu asyyli-ryhmä. Esimerkkeinä 1:stä noin 8:aan hiiliatomia käsittävistä asyyli-ryhmistä mainittakoon formyyli, asetyyli, propionyyli, heksanoyyli, bentsoyyli ja muut vastaavat. Esimerkkeinä 2:sta noin 10:een hiiliatomia käsittävistä substituoituista asyyli-ryhmistä mainittakoon 2-metoksiasetyyli, 3-etoksi-*propionyyli*, 4-klorobentsoyyli, 3-karboksi-*propionyyli* (maleiinianhydridin sukulainen), ja muut vastaavat. Asyyli- ja substituoitunut asyyli-ryhmät eivät ole kovin suosittuja, koska niiden tioesterisidokset eivät ole erityisen stabiileja vettä sisältävissä alustoissa.

R_{a-f}^{1-6} -ryhmät voivat olla läsnä synteettisessä ST-molekyyllisessä erikseen tai yhdessä ST-molekyyllisessä voi olla läsnä R_{a-f}^{1-6} -ryhmien seoksia. Kun kaikkien monomeerisen synteettisen ST-molekyylin alaindeksikirjaimien arvo on nolla, niin R_{a-f}^{1-6} -ryhmät puuttuvat, ja kolme molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä kystiinin disulfididisidosta on läsnä.

Kaikilla alaindeksikirjaimilla a-f voi myös olla arvo nolla, ja R_{a-f}^{1-6} -ryhmät puuttuvat polymeroidusta synteettisestä ST-molekyylistä (P-ST), jossa synteettisen ST-polypeptidin toistuvien yksiköiden välissä olevat, molekyylin sisäiset, polypeptidien väliset kystiinin disulfididisidokset ovat läsnä. Synteettisen ST:n toistuvissa yksiköissä olevat molekyylin sisäiset, polypeptidin sisäiset disulfididisidokset voivat myös olla läsnä P-ST:ssä. Tämänkaltaisen polymeerin toistuvat yksiköt käsittävät keskimäärin vähintään noin kaksi tällaista polypeptidien välistä kystiinisidosta toistuvaa yksikköä kohden. Näin ollen suositussa toteutusmuodossa tämänkaltaisen polypeptidin toistuvien yksiköiden vähintään kahdella luvuista a-f ja kahdella luvuista g-l on arvo nolla, ja vähintään kaksi R_{a-f}^{1-6} -ryhmää ja kaksi vastaavaa R_{g-l}^{7-12} -ryhmää puuttuu, vähintään kahden polypeptidien välisen kystiinin disulfididisidoksen muodostumisesta johtuen.

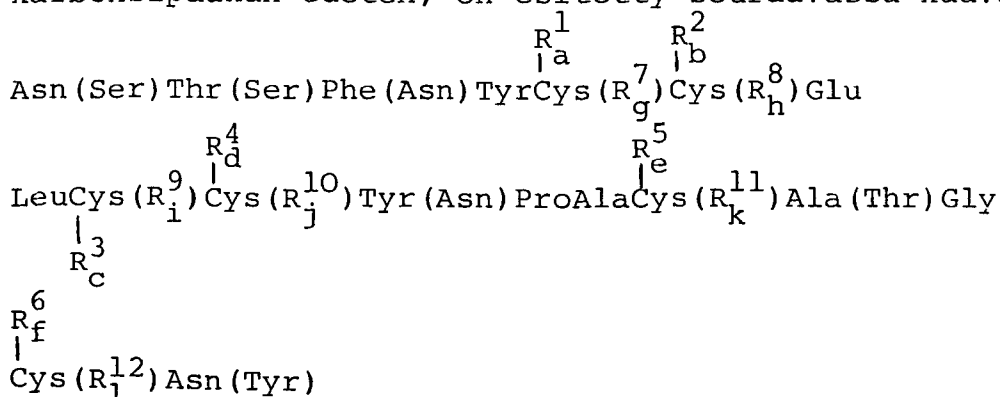
Antigeenisuus ja biologinen aktiivisuus voidaan myös saavuttaa käyttämällä sellaisia synteettisiä ST-molekyyliä, jotka käsittävät vähintään yhden molekyylin sisäisen, polypeptidin sisäisen kystiinin disulfididisidoksen, esimerkiksi niiden Cys-jäännösten parien välissä, jotka jäännökset on esitetty kaavassa I sitoutuneina jäännöksiin R_a^1 ja R_e^5 , R_b^2 ja R_d^4 , tai R_c^3 ja R_f^6 , jotka vastaavat numeroilla 5 ja 10, 6 ja 14, ja 9 ja 17 varustettuja asemia ST Ib-molekyylin aminopäästä lukien, vastaavasti, jolloin disulfididisidoksiin sisältyvät Cys-jäännökset ovat korvautuneet samoilla tai erilaisilla vaihtoehtoisilla aminohappojäännöksillä. Kaavan I Cys-jäännösten suositeltavimmat vaihtoehtoiset aminohappojäännökset eivät saa aikaan ioni-

varausta synteettiseen polypeptidiin, kun synteettinen polypeptidi on liuotettuna sellaiseen vesiliuokseen, jonka pH:lla on fysiologinen arvo; eli suosituimmilla vaihtoehtoisilla aminohappojäännöksillä ei ole ionivarausta, kun ne ovat osa polypeptidiä ja vesiliuoksessa.

Disulfididisidoksiin osallistumattomien Cys-ryhmien vaihtoehtoiset aminohappojäännökset on esitetty edellä olevassa kaavassa I suluissa olevilla ryhmillä R_g^7 , R_h^8 , R_i^9 , R_j^{10} , R_k^{11} ja R_l^{12} , joista kukin voi korvata edeltävän Cys-jäännöksen, ja joissa alaindeksit ovat kokonaislukuja, joiden arvo on nolla tai yksi. Suositeltavissa synteettisissä ST-polypeptideissä, mikäli "a" on nolla, niin kumpikin luvuista "g" ja "k" ovat nollija; mikäli "b" on nolla, niin kumpikin luvuista "h" ja "j" ovat nollija; ja mikäli "c" on nolla, niin kumpikin luvuista "i" ja "l" ovat nollija.

Aminohappojäännökset alaniini (Ala) ja seriini (Ser) ovat esimerkkejä niistä suositeltavista vaihtoehtoisista aminohapoista, jotka ovat käyttökelpoisia korvaamaan Cys-jäännökset. Sellaisen synteettisten ST-molekyylien, joissa Cys-jäännökset ovat korvautuneet Ser-jäännöksillä, biologista ja antigeenistä aktiivisuutta tarkastellaan jäljempänä.

Edellä esitetty julkaisu ryhmien $R_a^1-R_f^6$ sekä $R_g^7-R_l^{12}$ suhteen on yhtä hyvin sovellettavissa niihin synteettisiin ST-polypeptideihin, jotka käsittävät kaavassa I esitetyt neljätoista aminohappojäännöstä, sekä suositeltavampaan synteettiseen ST-polypeptidiin, joka käsittää ne 18 aminohappojäännöstä, joiden järjestys, vasemmalta oikealle, ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten, on esitetty seuraavassa kaavassa III:



III

jossa suluissa olevat aminohappojäännökset sekä ryhmät $R_a^1-R_f^6$ ja $R_g^7-R_l^{12}$ on määritelty kuten edellä on esitetty.

Sekä kaavan I mukainen suositeltava synteettinen polypeptidi että kaavan III mukainen suositeltavampi synteettinen polypeptidi voi myös käsittää lisäryhmän R_m^{13} , joka on sitoutunut polypeptidin aminopään jäännöksen amiiniin, jossa ryhmässä "m" on kokonaisluku, jolla on arvo nolla tai yksi, ja edellyttäen, että mikäli luvun "m" arvo on nolla, niin R_m^{13} puuttuu ja aminopään amiini on substituoimaton. Mikäli luvulla "m" on arvo yksi, niin R_m^{13} saattaa olla peptidi, joka käsittää 1:stä noin 58:aan aminohappojäännöstä, sitovan ryhmän ja sen karboksyylihapon, joka käsittää 1:stä noin 20:een hiiliatomia, ja joka muodostaa aminopään jäännöksen amiinin kanssa amidisidoksen.

Kun R_m^{13} käsittää lisäaminohappojäännöksiä, jotka ovat sitoutuneet kaavan I neljäntoista jäännöksen polypeptidin mukaisen, synteettisen polypeptidin aminopäähän, niin eräässä suositeltavassa toteutusmuodossa näillä lisäaminohappojäännöksillä on järjestys, aminopäästä karboksipäähän, joka edellä on esitetty kaavassa II. Kaavan II mukaisen aminohappojäännösten järjestyksen lisääminen suositeltavaan, neljäntoista aminohappojäännöksen järjestykseen tuottaa suositeltavamman, kaavan III mukaisen polypeptidin 18 aminohappojäännöksen järjestyksen, joka puolestaan vastaa ST Ia:n ja ST Ic:n karboksipään aminohappojäännösten järjestystä ja koko ST Ib-järjestystä, yhdeksi järjestykseksi yhteen kirjoitettuna.

Suosittelavassa neljäntoista jäännöksen polypeptidin toteutusmuodossa luvun "m" arvo on yksi ja R_m^{13} on ketju, joka käsittää kaavan II mukaisen, neljän aminohappojäännöksen järjestyksen. Edelleen suositeltavammassa toteutusmuodossa kaavan II vaihtoehtoiset, suluissa olevat aminohappojäännökset puuttuvat ja R_m^{13} on peptidiketju, joka käsittää ST Ib:n aminopään neljän jäännöksen aminohappojäännösten järjestyksen; eli AsnThrPheTyr, vasemmalta oikealle ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten.

Sitomalla 58 tai 54 aminohappojäännöstä neljäntoista tai kahdeksantoista jäännöksen synteettiseen ST-polypeptidiin, vastaavasti, voidaan saada aikaan sellainen synteettinen polypeptidijärjestys, joka vastaa natiivin ST Ia:n tai ST Ic:n järjestystä. Koska kuitenkin, vastaavasti kaavan I ja III mukaisien, suositeltavan neljäntoista, ja suositeltavamman kahdeksantoista aminohappojäännöksen järjestyksen antigeeninen ja biologinen aktiivisuus voi olla jokseenkin yhtä hyvä tai parempi kuin vastaavat natiivin ST:n aktiivisuudet, niin sellaiset synteettiset polypeptidit, joiden käsittämien aminohappojärjestysten pituus on suurempi kuin noin kaavan III kahdeksantoista aminohappojäännöstä, jolloin ne ovat ST Ia:n ja ST Ic:n koko järjestyksen mukaiset, eivät ole välttämättömiä, eivätkä ne ole toivottuja. Kuitenkin kaavojen I ja III mukaisten polypeptidien aminopäähän voi hyödyllisellä tavalla olla sitoutuneina ylimääräisiä aminohappojäännöksiä.

Täten ylimääräisten Cys-jäännösten sisällyttäminen polypeptidin aminopäähän saattaa olla toivottavaa, jolloin näitä jäännöksiä voidaan käyttää synteettisen polypeptidin kiinnittämiseen toiseen molekyyliin, kuten kantajaan tai sitovaan ryhmään. Tällaisissa olosuhteissa käytettynä on sopivaa käyttää sellaista rikkiatomin muodostamaa suojaavaa ryhmää, joka ei ole tavanomainen kiinteän faasin suojaava ryhmä, ellei lisätty aminopään Cys muodosta kystiinin disulfidisidosta järjestyksen sisäisen Cys-jäännöksen kanssa. Eräs tapa Cys:n rikkiatomin suojaamiseen synteetin aikana, ja suojauksen selektiiviseen poistamiseen, on Cys:in isotiourea-analogin käyttö, mistä analogista pilkkoamisen tuloksena muodostuu Cys-jäännös.

Toisessa suositeltavassa toteutusmuodossa lukuisia 14-meerisiä tai 18-meerisiä synteettisiä ST-polypeptidejä voidaan sitoa yhteen pää-loppupää-tavalla, jolloin syntyy tämän keksinnön mukainen multimeerinen ST:n toteutusmuoto. Tämä multimeeri käsittää vähintään kaksi antigeenista ST-polypeptidiä ja mieluummin kaksi tai kolme tämänkaltaista toistuvaa yksikköä, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa amidisidoksella, joka on muodostunut

toisen polypeptidin aminopään aminoryhmän ja toisen polypeptidin karboksipään karboksyyli-ryhmän väliin. Esimerkkinä mainittu sellainen pää-loppupää-tyylinen multimeerinen ST, joka käsittää 36 aminohappojäännöstä, ja jonka toistuvina yksikköinä on kahden ST Ib-polypeptidin aminohappojäännösten järjestys, esitetään jäljempänä yksityiskohtaisesti.

ST:n kunkin ylimääräisen toistuvan yksikön järjestys voi olla edellä esitetyn kaavan I mukainen. Multimeeriset synteettiset ST-molekyylit, jotka käsittävät lukuisia synteettisen ST:n muodostamia, pää-loppupää-sitoutuneita toistuvia yksiköitä, voidaan valmistaa kiinteän faasin synteesimenetelmällä, joka on jäljempänä esitetty osassa II. Johtuen suurten polypeptidimolekyylien syntetisointiin liittyvistä vaikeuksista on suositeltavaa, että tällaiset pää-loppupää-tyyppiset multimeerit käsittävät noin 2:sta noin 3:een toistuvaa ST-yksikköä.

Toisessa edelleen suositeltavammassa toteutusmuodossa R_m^{13} -ryhmä voi olla synteettinen polypeptidi, jonka aminohappojäännösten järjestys vastaa proteiinia tai polypeptidiä, joka on muu kuin ST. Esimerkiksi jonkin toksiinin määräävää aminohappojäännösten järjestystä, kuten E.coli:n LT B-alayksikön määräävää järjestystä voidaan käyttää tuottamaan yhdistetty immunogeeni tai antigeeni kumpaakin toksiinia vastaan. Käyttökelpoisten aminohappojäännösten järjestysten, jotka vastaavat LT B-alayksikön määräävää osaa, on todettu esiintyvän asemissa 37-62 $\overline{[LT B-(37,62)]}$ ja asemissa 27-36 $\overline{[LT B-(27-36)]}$ LT B:n aminopäästä laskien, jonka LT B:n täydellinen aminohappojäännösten järjestys on esitetty julkaisussa Dallas et al., Nature, 288:499-501 (1982). Nämä aminohappojäännösten järjestykset on esitetty seuraavassa, vasemmalta oikealle ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten:

LT B-(36-62) MetValIluIluThrPheMetSerGly
GluThrPheGlnValGluValProGlySerGlnHisIluAspSerGlnLys, ja

LT B-(27-36) TyrThrGluSerMetAlaGlyLysArgGlu

Kummankin edellä esitetyn polypeptidin karboksipään jäännöksen karboksiryhmä voi olla sitoutuneena ST:n aminopään jäännöksen amiiniin niiden välisellä amidisidoksella. Tämänkaltaisen sitoutuminen on toinen esimerkki pää-loppupää-sitoutumisesta, joka on käyttökelpoinen joissakin ST:n multimeerisissä toteutusmuodoissa, kuten edellä on esitetty. Polypeptidit LT B-(27-36) ja LT B-(37-62) voivat myös olla sitoutuneina toisiinsa pää-loppupää-tavalla, jolloin ST:n aminopäähän saadaan R_m^{13} , jolla on koko LT B-alayksikön järjestys asemasta 27 asemaan 62 saakka.

Erityisen sopivaa on hapettamattoman ensimmäisen ST-polypeptidin syntetisoiminen, jossa ST-polypeptidissä on edellä esitetty LT B-polypeptidi, joka on sitoutunut aminopään ST-jäännökseen, edellä esitettyä kiinteään faasin tekniikkaa käyttäen. Tämän jälkeen ensimmäinen polypeptidi hapetetaan, jolloin saadaan aminopäästään R_m^{13} -ryhmällä substituoitu ST. Tämänkaltaisiin ST-molekyyleihin viitataan tämän jälkeen symbolilla LT B-(27-36)--ST tai LT B-(37-62)--ST osoittamaan jomman kumman LT B-alayksikön kaltaisen polypeptidin läsnäoloa, ST:hen sitoutuneena.

Kumpikin edellä mainituista polypeptideistä LT B-(27-36)--ST ja LT B-(37-62)--ST oli erikseen liittyneinä, glutaraldehydiä käyttäen, samansuuruiseen tetanustoksoidin määrään, jäljempänä osassa VIA esitetyn tavan kaltaisesti. 400 mikrogrammasta puhdistettua konjugaattia valmistetut, täydellisessä Freund'in apuaineessa olevat rokotteet injektointiin erillisiin jäniksiin, mitä 14 vuorokautta myöhemmin seurasivat saman immunogeenimäärän muodostamat lisäannokset epätäydellisessä Freund'in apuaineessa, ja seitsemän vuorokautta tämän jälkeen seurasivat alumassa olevan immunogeenin saman suuruisten annosten muodostamat lisäannokset. Seitsemän vuorokautta tämän jälkeen (28. päivänä) jänisten veri otettiin talteen ja ST:n sekä B-alayksikön vasta-aineet otettiin talteen. Näiden vasta-aineiden tiitterit natiivia B-alayksikköä ja synteettistä ST:tä vastaan tuottivat arvot 10 ja 160-320, vastaavasti, polypeptidin

LT B-(27-36)--ST immunogeenille, ja arvot 160 ja 1280, vastaa-
vasti, polypeptidin LT B-(37-62)--ST immunogeenille. Täten
kummankin kytketyn polypeptidin konjugaatit ovat immunogeeni-
sia sekä antigeenisia (taulukko 2).

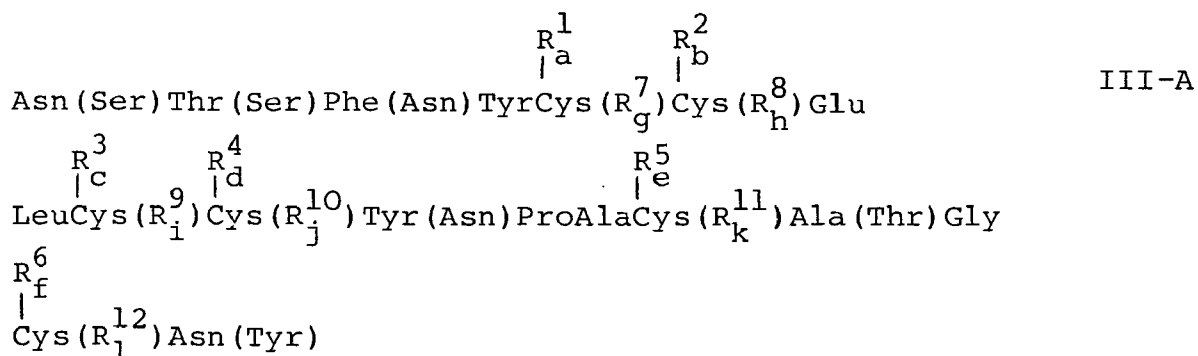
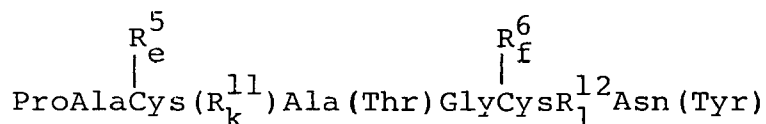
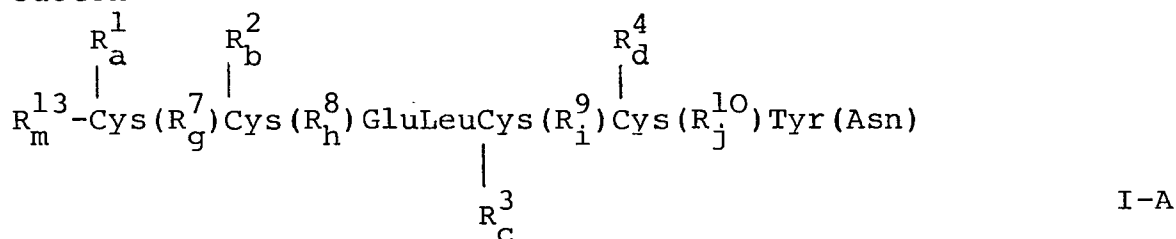
Lisätyn Cys-jäännöksen lisäksi R_m^{13} -ryhmäkin voi olla yhdistävä
ryhmä. Tällaisten sitovien ryhmien joukkoon kuuluvat synteet-
tisen polypeptidin ja seuraavien yhdisteiden reaktiotuotteet:
(i) omega-amino-monokarboksyylihapot, jotka käsittävät noin
3:sta noin 6:een hiiliatomia, joista hapoista mainittakoon
beeta-alaniini ja 6-aminoheksaanihappo, (ii) noin 3:sta noin
8:aan hiiliatomia käsittävät dikarboksyylihappo tai happoklori-
di tai happoanhydridi, kuten maleiinihappo, fumaarihappo,
sukkiinihapon anhydridi, ftaalianhydridi, ja muut vastaavat,
(iii) suojattu, merkaptania sisältävä karboksyylihappo,
jonka happoketju käsittää 2:sta noin 4:ään hiiliatomia, joista
hapoista mainittakoon isotiourea, tioglykoli- tai tiopropioni-
hapon johdannainen, (iv) noin 2:sta noin 8:aan hiiliatomia kä-
sittävä dialdehydi, kuten glutaraldehydi tai p-ftaldehydi,
ja muut vastaavat.

Täten vapaita amino-, karboksyyli-, merkapto- ja aldehydoryh-
miä käsittäviä sitovia ryhmiä voidaan saada aikaan käytettä-
viksi synteettisen polypeptidin sitomiseen toiseen molekyyliin,
kuten kantajaan.

R_m^{13} saattaa myös olla sen 1:stä noin 20:een hiiliatomia käsit-
tävän monokarboksyylihapon asyyliosaa, joka happo muodostaa
amidisidoksen synteettisen polypeptidin aminopään jäännöksen
amiinin kanssa. Esimerkkeinä tällaisista monokarboksyylihappo-
jen ryhmistä mainittakoon etikka-, propioni-, heksaani-, lauriini-,
myristiini-, steariini-, oleiinihappo, ja muut vastaavat.
Pitkäketjuisen rasvahapon, kuten stearoyylihapon muodostama
 R_m^{13} -ryhmä voidaan käyttökelpoisesti sitoa synteettiseen ST:hen
passiivisia hemagglutinaatiokokeita ajatellen, kun taas lyhyt-
ketjuiset R_m^{13} -ryhmät, kuten asetyyli, ST:hen sidottuna, tuottavat

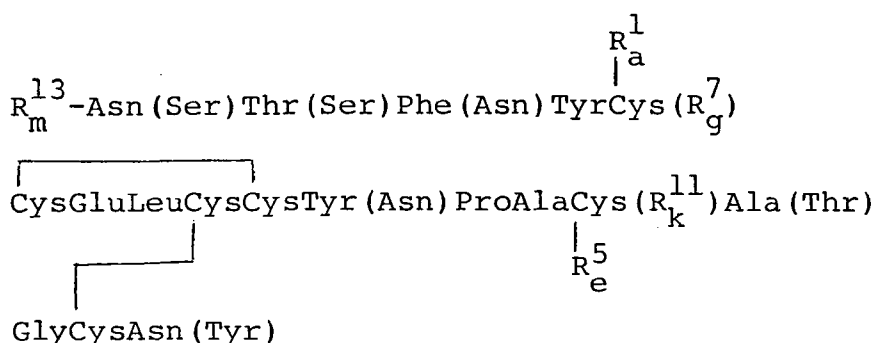
antigeenistä aktiivisuutta, joka on hieman pienentynyt derivoimattomaan, 18 jäännöksen polypeptidiin verrattuna.

Täten kaavojen I ja III mukaiset, R_m^{13} -ryhmän käsittävät synteettiset ST-polypeptidit voidaan esittää alla olevien kaavojen I-A ja III-A aminohappojäännösten järjestyksillä, vasemmalta oikealle, ja suunnassa aminopäästä karboksyylipäähän edeten:



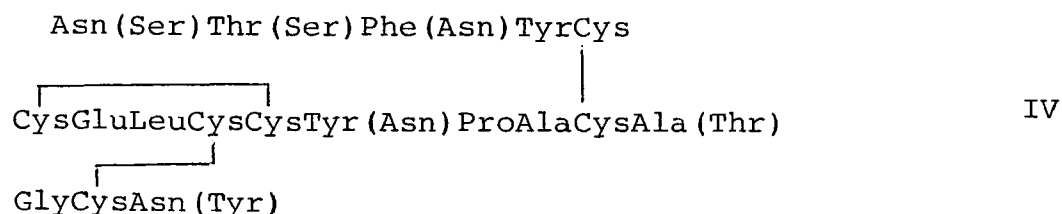
missä kukin sulussa esitetty spesifinen aminohappojäännös on vaihtoehtoinen välittömästi edeltävälle aminohappojäännökselle, ja R_{a-f}^{1-6} , R_{g-l}^{7-12} ja R_m^{13} -ryhmät ovat kuten edellä on esitetty.

Tämän keksinnön toteutusmuoto, joka käsittää 18:n jäännöksen synteettisen ST:n aminopään jäännökseen sitoutuneen R_m^{13} -ryhmän, joka ST käsittää myös kaksi molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä kystiinin disulfidisidosta, on esitetty, vasemmalta oikealle, ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten, kaavassa:



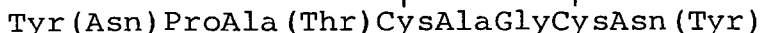
missä Cys-jäännösten väliset viivat esittävät molekyylin sisäisiä, polypeptidin sisäisiä kystiinin disulfididisidoksia, ja kukin suluissa oleva kuudesta spesifisestä aminohappojäännöksestä on vaihtoehtoinen välittömästi edeltävälle aminohappojäännökselle, ja ryhmät R_a^1 , R_e^5 , R_g^7 , R_k^{11} , ja R_m^{13} ovat kuten edellä on esitetty.

Suosittelavin, 18:n jäännöksen muodostama (18-meeri) synteettinen ST, jossa on kolme molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä kystiinin disulfididisidosta, esitetään seuraavan kaavan IV aminohappojäännösten järjestyksenä, vasemmalta oikealle, ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten:



missä Cys-jäännösten välissä olevat viivat tarkoittavat molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä kystiinin disulfididisidosta, ja kukin kuudesta spesifisestä suluissa olevasta aminohappojäännöksestä on vaihtoehtoinen välittömästi edeltävälle aminohappojäännökselle.

Edellä mainittu, kaavan IV mukainen synteettinen polypeptidi esitetään seuraavassa myös siten, että se käsittää aminopään jäännökseen sitoutuneen R_m^{13} -ryhmän, vasemmalta oikealle, ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten:



II. Synteettisen ST:n valmistaminen

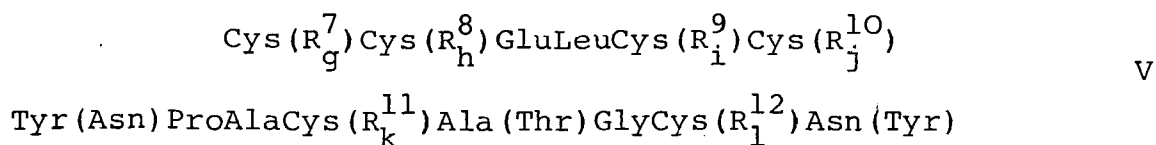
18:n jäännöksen muodostama, ihmistä vaivaava ST-polypeptidi (ST Ib) hapettamattomassa muodossaan syntetisoitiin hyvin tunnetulla kiinteän faasin menetelmällä, käyttäen laitetta Beckman Model 990B Peptide Synthesizer, Beckman Instruments Co., Berkeley, CA. Katso Houghten et al., Int. J. Pept.Prot.Res., 16:311-320 (1980) ja Merrifield, J.Am.Chem.Soc., 85:2149-2154 (1963), jotka julkaisut on täten yhdistetty viittauksella oheiseen tekstiin.

Lyhyesti esitettynä kutakin synteesiä varten käytettiin 1,00 g (0,2-0,6 milliekvivalenttia/gramma) bentshydryyliamiinihartsia, jolloin alkuperäinen suojattu aminohappojäännös oli alfa-O-bentsyyli-N-Boc-asparatiinihappo. Tavanomaisia sivuketjuja suojaavia ryhmiä käytettiin lopuille aminohappojäännöksille, kuten seuraavassa on esitetty: O-(p-bromibentsyloksikarbonyyli):ä tyrosiinille, O-bentsyyliä treoniinille, seriinille ja glutaamihapolle, ja S-metoksibentsyyliä kysteiniinille. Suojatut aminohapot kiteytettiin uudestaan sopivasta liuottimesta siten, että ohutkerroskromatografiassa saatiin ainoastaan yksi täplä. Tyypillisesti kytkemiset suoritettiin siten, että sekä suojattua aminohappoa että disykloheksyylikarbodiimidia käytettiin kymmenkertaista molaarista ylimäärää alkuperäisen aminohapon milliekvivalenttien lukumäärään verrattuna. Kummankin reagenssin kahden moolin ylimäärää voidaan myös käyttää. Asparagiinin ollessa kyseessä N-hydroksibentsotriatsolin samanlainen moolinen määrä lisättiin suojattuun aminohappoon, ja dimetyyliformamidia käytettiin liuottimena. Kaikki kytketymisreaktiot olivat yli 99 %:sen täydellisiä, pikriinihapolla kokeiltuna, katso julkaisua Gisin, Anal.Chem.Act., 58:248-249 (1972).

Osa tuloksena olevasta suojatusta polypeptidi-polymeeristä (1 g) käsiteltiin 2 millilitralla anisolia, ja 20 millilitraa vedetöntä vetyfluoridia tiivistettiin reaktioastiaan hiilihappojään lämpötilassa. Tuloksena olevaa seosta sekoitettiin 4°C:ssa 1,0 tunnin ajan suojaavien ryhmien irrottamiseksi ja polypeptidin irrottamiseksi hartsista. Sen jälkeen kun vetyfluoridi oli haihdutettu 4°C:n lämpötilassa N₂-virtauksella, niin jäännös uutettiin vedettömällä dietyylieetterillä kolmasti anisolin poistamiseksi, ja jäännös kuivattiin vakuu-
missa.

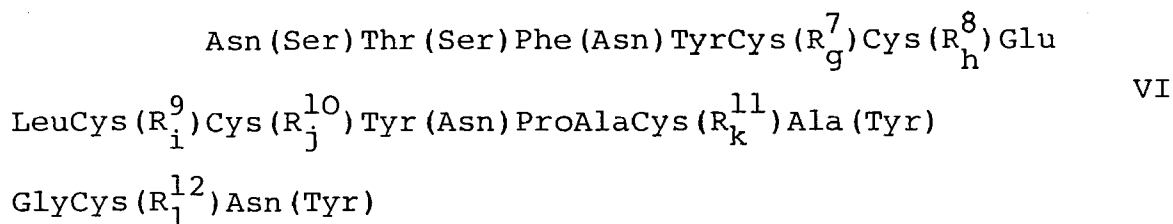
Vakuuissa kuivattu materiaali uutettiin ensin 5 %:lla etikkahapon vesiliuoksella (3 kertaa, kulloinkin 50 millilitralla), mitä seurasivat uutot 50 % etikkahapon vesiliuosta käyttäen (4 kertaa 50 millilitraa). Ensimmäinen uutto poisti molekyyli-
painoltaan alhaiset polypeptidit ja tyrosiinin, jota oli käytetty joissakin valmisteissa suojaamaan Cys:n merkaptoryhmiä. Toinen uutto erotti vapaat polypeptidit hartsista. Sen jälkeen kun materiaali oli laimennettu vedellä etikkahapon pitoisuuteen 10-20 %, niin tuloksena oleva liuos lyofilisoitiin, jolloin monomeerinen, hapettamaton, ensimmäinen polypeptidi oli saatu aikaan.

Tyypillinen 14:n jäännöksen ensimmäinen monomeerinen polypeptidi, joka näin on tuotettu, voidaan esittää aminohappojään-
nösten järjestyksenä, vasemmalta oikealle ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten, mikä esitetään seuraavassa kaavassa V:



missä kukin sulussa olevista kolmesta spesifisestä aminohappojäännöksestä on vaihtoehtoinen välittömästi edeltävälle aminohappojäännökselle, ja R_{g-1}^{7-12} on kuten edellä on määritelty.

Tyypillinen 18 aminohappojäännöstä käsittävä synteettinen ensimmäinen monomeerinen polypeptidi, joka näin on tuotettu, voidaan esittää aminohappojäännösten järjestyksenä, vasemmalta oikealle ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten, mikä esitetään seuraavassa kaavassa VI:



missä kukin kuusi suluissa olevaa spesifistä aminohappojäännöstä on vaihtoehtoinen välittömästi edeltävälle aminohappojäännökselle, ja R_{g-1}^{7-12} ovat kuten edellä on määritelty.

Ensimmäinen, monomeerinen polypeptidi, jonka aminohappojärjestys vastaa kaavassa I tai III esitettyä järjestystä, voidaan myös valmistaa, joissa vähintään kaksi luvuista a-f ja g-l on nolliä, joten vähintään kaksi Cys (CysH)-jäännöstä on läsnä, kuten aikaisemmin on esitetty. Tällaiset polypeptidit voivat myös sisältää aikaisemmin esitetyn R_m^{13} -ryhmän.

Ensimmäistä monomeerista polypeptidiä voidaan käyttää hapetusvaiheessa sellaisena puhtausasteena, joka saatiin edellä olevan lyofilisoinnin jälkeen tai sen puhtautta voidaan lisätä ajamalla se kromatografiakolonniin läpi, jotka kolonnit sisältävät Sephadex G-10 tai G-50-hartseja (Pharmacia, Piscataway, N.J.) ja/tai DEAE-Sephacel:ia (Pharmacia), Staples:in et al., supra, menetelmää seuraten. Kummassakin tapauksessa on tärkeätä, että näin valmistettu ensimmäinen monomeerinen polypeptidi suojataan ennenaikaiselta hapettumiselta. Näin ollen sen jälkeen kun ensimmäinen monomeerinen polypeptidi on irrotettu hartsikantajastaan ja kun suojaavat ryhmät on poistettu funktionaalisia ryhmiä käsittävistä aminohappojäännöksistä, niin polypeptidin manipuloiminen suoritetaan olosuhteissa, jotka eivät ole hapettavat.

Sen jälkeen kun Cys-sulfhydryyliryhmät on hapetettu muodostamaan molekyylin sisäisiä kystiinin disulfididisidoksia, mikä jäljempänä esitetään, niin vapaita sulfhydryyliryhmiä ei jäänyt jäljelle. Vapaiden sulfhydryyliryhmien, Cys-merkaptoryhmien, puuttuminen tai läsnäolo määritettiin menetelmällä, joka on esitetty julkaisussa Ellman, Arch.Biochem.Biophys., 82:70-77 (1959).

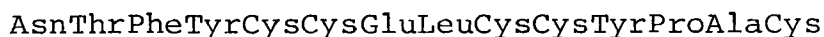
Raaka, hapetettu monomeerinen polypeptidituote puhdistettiin geelisuodatuksella hartsia Sephadex G-10 (Pharmacia) käyttäen, jota seurasi ioninvaihtokromatografia hartsilla DEAE-Sephacel (Pharmacia). Aminohappoanalyysi, geeli- ja paperielektroforeesi sekä muut kromatografiaan perustuvat tiedot osoittivat homogeeneisen tuotteen olemassaolon. Koko saanto oli noin 25 % teoreettisesta. 5:een erilliseen otteeseen valmistettujen synteettisten ST-valmisteiden biologinen potentiaali ja antigeenisuus tutkittiin. Kaikki tuottivat jokseenkin saman reaktion, kuten edellä on esitetty, esitetyillä valmisteilla testattaessa.

Polymeeriset ST-multimeerit, joiden lukuisat toistuvat ST-yksiköt ovat sitoutuneet toisiinsa molekyylin sisäisillä, polypeptidien välisillä kystiinin disulfididisidoksilla, valmistettiin monomeerisista polypeptidituotteista, jotka edellä valmistettiin, mitä seurasi jäljempänä esitettävä hapettamistapahtuma.

Ensimmäinen ST:n multimeerinen dimeeri (ST/ST), joka on sitoutunut yhteen pää-loppupää-tavalla, valmistettiin edellä esitetyllä kiinteän faasin menetelmällä. Tällöin ensimmäinen ST/ST-multimeeri, jonka kullakin toistuvalla yksiköllä oli ST Ib:n 18-meerinen järjestys, valmistettiin kolmenkymmenenkuuden asianmukaisesti suojatun aminohappojäännöksen sarjamaisella lisäyksellä, edellä 18-meeriselle ST-polypeptidille esitetyn menetelmän mukaisesti, jonka jälkeen samaa järjestystä toistettiin seuraaville 18:lle jäännökselle, kunnes 36-meerinen ensimmäinen polypeptidi oli valmistettu.

Monomeerisen ST:n hapetustoimenpide

Ensimmäinen polypeptidi, jolla oli ST Ib:n 18:n jäännöksen järjestys, valmistettiin edellä esitetyn mukaisesti, ja sillä oli aminohappojäännösten järjestys, vasemmalta oikealle ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten, joka on esitetty seuraavassa kaavassa VII:



VII

AlaGlyCysAsn

Tätä ensimmäistä polypeptidiä (50 milligrammaa) lisättiin varovasti sekoittaen 0,1 molaariseen ammoniumkarbonaatin vesiliuokseen (pH-arvo 7,8-8,3), jolloin lopulliseksi pitoisuudeksi saatiin 1 milligramma suojaamatonta ensimmäistä polypeptidiä millilitrassa liuosta. 5-15 minuuttia kestävän, huoneen lämpötilassa tapahtuvan hellävaraisen jatkuvan sekoittamisen jälkeen saatiin ensimmäisen polypeptidin kirkas liuos.

Huoneen lämpötilassa suoritettua varovaista sekoittamista jatkettiin yhteensä 8 tunnin ajan, jonka kuluessa ilman molekulaarinen happi (O_2) joutui kosketuksiin liuoksen kanssa, ja toimi hapettavana aineena, sekä hapetti kuusi Cys-jäännöstä, jolloin muodostui kolme molekyylin sisäistä, polypeptidin sisäistä kystiinin disulfididisidosta. Vapaiden sulfhydryyliryhmien poistaminen suoritettiin Ellman-reagenssilla [Ellman, Arch. Biochem. Biophys., 82:70-77 (1959)], ja sen todettiin olevan 15, 40, 60 ja 90 prosenttisesti täydellinen 0,5:n, 1,5:n, 2,5:n ja 8,0:n tunnin kuluttua, vastaavasti.

Tuloksena oleva hapettunut polypeptidi otettiin talteen lyofilisoimalla. Sitä voitiin käyttää raaka-assa muodossa, mutta se puhdistettiin kolonnikromatografisesti.

Raaka materiaali ajettiin ensin Sephadex G-50 (Pharmacia) kolonnin (1,5 x 80 senttimetriä) läpi, joka kolonni oli tasapainoitettu 0,1 molaarisella ammoniumasetaatilla. 3,5 millilitran/20 minuuttia fraktioita kerättiin, jolloin materiaalin todettiin

olevan fraktioissa 12-15 ja 22-28. Näiden fraktioiden sisältö otettiin talteen lyofilisoimalla ja niistä saatiin 10 ja 36 milligrammaa, vastaavasti. Fraktioissa 22-28 ollut materiaali oli monomeerista synteettistä ST:tä, minkä osoitti sen eluotuminen, joka tapahtui identtisisessä vaiheessa, kuin mitä biologisen ST:n kromatografiassa oli todettu. Tällä erottamisella saatiin myös polymeeristä synteettistä ST:tä, jonka valmistaminen esitetään jäljempänä tarkemmin.

Seuraavassa tarkastelussa käsitellään monomeerista ST:tä, ja sitä seuraavassa tarkastelussa käsitellään multimeeristen synteettisten ST-molekyylien valmistusta, alaotsikolla "Multimeerisen ST:n valmistaminen".

Osittain puhdistettua monomeerista synteettistä ST:tä voitaisiin jälleen käyttää sellaisenaan, mutta se puhdistettiin edelleen kromatografisesti kolonnia DEAE-Bio Gel A (Bio Rad, San Raphael, CA), (1,0 x 25 senttimetriä) käyttäen. Eluutio suoritettiin portaittaista gradienttia käyttäen, jolloin materiaalin pääasiallinen määrä eluotui 50 ja 100 millimolaa-risen natriumkloridin välissä. Tämä materiaali otettiin talteen lyofilisoimalla.

Lyofilisoitu materiaali liuotettiin uudestaan veteen ja siitä poistettiin suola kolonnia Sephadex G-25 (Pharmacia) käyttäen. Tuloksena oleva materiaali otettiin talteen lyofilisoimalla, ja saantona oli 28 milligrammaa puhdasta, synteettistä ST:tä, mikä edustaa 56 prosenttia saantoa raa'an, ensimmäisen polypeptidin painoon perustuen. Näin valmistetun synteettisen ST:n aminohappoanalyysi antoi seuraavat arvot, 18-jäännöksiseen polypeptidiin perustuen (teoreettinen arvo on suluissa):

asparatiinihappo	1,93	(2,0)
treoniini	1,98	(2,0)
glutamiinihappo	0,97	(1,0)
proliini	1,05	(1,0)
glysiini	1,00	(1,0)
alaniini	2,00	(2,0)

leusiini	1,05	(1,0)
tyrosiini	1,89	(2,0)
fenyylialaniini	0,96	(1,0)
kysteiini (kysteiinihappona)	5,80	(6,0)

Tämän synteettisen ST:n biologinen aktiivisuus määritettiin imevän hiiren kokeella, joka on esitetty julkaisussa Giannella, Infect. Immunity, 14:95-99 (1976), ja sen todettiin olevan jokseenkin sama kuin biologisella ST:llä, kuten kuvassa 1 on esitetty. Synteettisen ja biologisen ST-molekyylin välinen, ligatoidussa suolisilmukassa tapahtuvan erittymisresponssin huomattava samankaltaisuus on esitetty kuvassa 2.

Synteettisen ST:n huomattavasti tärkeämpää antigeenisyyttä verrattiin biologisen ST:n antigeenisyyteen biologisen ST:n vasta-aineisiin kohdistuvan reaktiivisuuden avulla, ELISA-tekniikalla, joka on esitetty julkaisussa Klipstein et al., Infect. Immunol., 37:550-557 (1982). Tulokset on esitetty kuvassa 3, joka osoittaa, että tämän valmisteen synteettisen ST:n antigeenisuus oli noin 70 % biologisen ST:n antigeenisyydestä. Kuitenkin kuvassa 4 esitetään, että erittymisvaikutusten seroneutraloituminen hyperimmuunilla seerumilla oli jokseenkin identtistä.

Molekyylin sisäisten disulfididisidosten sijoittuminen monomeerisessä ST:ssä

Kolmen molekyylin sisäisen, polypeptidin sisäisen disulfididisoksen todettiin muodostuvan erilaisilla nopeuksilla. Tämän löydön avulla niiden Cys-jäännösten parien sijainti voitiin tunnistaa, jotka parit muodostavat disulfididisoksen.

Täten edellä mainitun ensimmäisen polypeptidin lisävalmisteet hapetettiin samankaltaisissa olosuhteissa, ja vapaat sulfhydryyliryhmät alkyloitiin jodoetikkahapolla tai jodoasetamidilla lukuisaan otteeseen hapetusreaktion aikana. Tuloksena olevien osittain hapettuneiden - osittain alkyloitujen polypeptidien

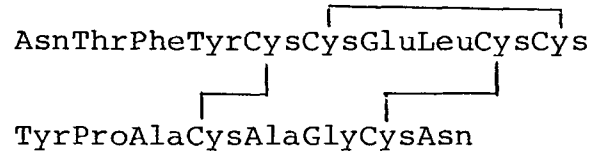
järjestys määritettiin laitteella Beckman Model 890 Sequencer (Beckman Instruments Co.) sen seikan määrittämiseksi, että mitkä Cys-jäännökset alkyloituivat missäkin vaiheessa hapetusreaktion aikana. Tietyissä asemissa olevien alkyloituneiden Cys-jäännösten suhde osittain alkyloidussa - osittain hapettuneessa ST:ssä kokonaan alkyloituneeseen - hapettumattomaan ST:hen verrattuna heijastaa disulfidisidosten sijaintia ja muodostumisnopeutta.

Alkyloivia aineita käytettiin kymmenkertainen molaarinen ylimäärä Cys-jäännöksen mooleihin verrattuna. Hapetus-alkylointi-reaktion seosta sekoitettiin kymmenen minuutin jakson ajan alkyloivan aineen lisäyksen jälkeen, mitä seurasi ditiotreitolin kymmenkertaisen ylimäärän lisääminen alkyloivaan aineeseen verrattuna, sekä edelleen yhden tunnin pituinen sekoitusvaihe alkyloivan aineen kulumiseksi.

Monomeerisessä synteettisessä ST:ssä olevien molekyylin sisäisten, polypeptidin sisäisten kystiinin disulfidisidosten todettiin muodostuvan ensimmäisen ja viidennen, toisen ja neljännen, sekä kolmannen ja kuudennen Cys-jäännöksen väliin, aminopäästä lukien; nämä Cys-jäännökset vastaavat niitä ST Ib:n jäännöksiä, jotka on numeroitu 5:llä ja 10:llä, 6:lla ja 14:llä, sekä 9:llä ja 17:llä, vastaavasti, aminopäästä lukien. Nämä Cys-jäännökset vastaavat myös niitä Cys-jäännöksiä, jotka ovat sitoutuneet jäännöksiin R_a^1 ja R_e^5 , R_b^2 ja R_d^4 , ja R_c^3 ja R_f^6 , vastaavasti, joiden asemat ohessa valmistetun 18-jäännöksisen polypeptidin karboksipäästä lukien ovat analogisia kaavassa I esitetyn 14-jäännöksisen polypeptidin karboksipään asemille.

Muodostumisnopeuden havaittiin olevan seuraavan Cys-jäännösten järjestyksen mukainen: R_b^2 ja R_d^4 , mitä seurasivat Cys-jäännökset R_c^3 ja R_f^6 , jonka jälkeen seurasivat Cys-jäännökset R_a^1 ja R_e^5 . Käyttäen ST Ib:n aminopäästä lähtevää numerointia, disulfidisidosten muodostumisjärjestys oli numeroilla 6 ja 14 varustettujen Cys-jäännösten välissä, sitten 9 ja 17, mitä seurasivat numeroilla 5 ja 10 varustetut Cys-jäännökset.

Näin valmistetun monomeerisen, synteettisen ST:n primäärinen ja sekundäärinen rakenne oli siis, aminopäästä karboksyyli-päähän edeten:



missä Cys-jäännöksiä yhdistävät viivat esittävät molekyylin sisäisiä, polypeptidin sisäisiä kystiinin disulfidisidoksia, jotka ovat muodostuneet noiden jäännösten väliin.

Molekyylin sisäisen, polypeptidin sisäisen kystiinin disulfidididoksen muodostumisnopeus pH-arvon funktiona on esitetty seuraavassa, edellä mainittua ihmisen ST:n ensimmäistä polypeptidiä käyttäen, ja se hapettaen molekylläarisellä hapella, joka saatettiin kosketuksiin, varovaisesti sekoittaen, sellaisen liuoksen kanssa, joka liuos sisälsi 1 milligramman ensimmäistä polypeptidiä millilitraassa:

pH-arvo	Moolia muodostuneita sidoksia -S-S-/tunti
5,0	0,30
6,0	0,45
7,0	0,90
8,0	1,50
9,0	1,20
10,0	0,75

Sekoitusnopeus ja lämpötila vaikuttavat myös hapettumisnopeuteen. Jommankumman tai molempien kohottaminen saa nopeamman hapettumisnopeuden ja disulfidididosten muodostumisnopeuden aikaan.

Samoin suoritettiin tutkimus sen pH-arvon vaikutuksen määrittämiseksi, jossa arvossa ensimmäisen polypeptidin hapettaminen toteutettiin. Tässä käytettiin jälleen edellä olevaa 18-meeristä ensimmäistä polypeptidiä, ja se hapetettiin huoneen lämpötilassa, pitoisuudessa 1,0 milligrammaa millilitrassa,

ja niin kauan, että vapaita sulfhydryyliryhmiä ei enää Ellman-reagenssilla voitu osoittaa, kuten edellä on esitetty. Ensimmäiset polypeptidit liuotettiin vesiliuokseen, joka sisälsi 0,1 moolista ammoniakkia. Liukenemisen jälkeen liuosten pH-arvot alennettiin etikkahapon 50 % vesiliuosta käyttäen. Lyofilisoinnin jälkeen, mutta puhdistamatta, antigeenisyydet määritettiin biologisen ST:n antigeenisyyteen verrattuina, edellä esitettyä ELISA-tekniikkaa käyttäen. Tulokset on esitetty seuraavassa:

pH-arvo	Antigeenisuus (% biologisen ST:n antigeenisyydestä)
8,5	75 (39)
8,0	60 (32)
7,8	300 (159)
7,7	250 (132)
7,6	150 (79)
7,4	23 (12)
7,2	46 (24)

Monomeerisen synteettisen ja biologisen ST:n fysikaalisten ominaisuuksien vertailu

Ohutkerroskromatografia selluloosalla peitettyjä muovilevyjä (Eastman Kodak, Inc., Nutley, NJ) käyttäen, ja liuottimen ollessa butanoli:etikkahappo:vesiseos (tilavuussuhteessa 200:30:75, vastaavasti) tuotti edellä valmistetulle synteettiselle ST:lle, jolla on kolme polypeptidin sisäistä disulfidididosta, R_F -arvoksi 0,307. Staples et al. ovat esittäneet R_F -arvon 0,8-0,9 samaa liuotinjärjestelmää ja selluloosalla peitettyjä lasilevyjä käyttäen (Eastman).

Paperielektroforeesilla, pH:ssa 2,1, 500 voltilla 90 minuutin aikana, R_F -arvoksi edellä mainitulle synteettiselle ST:lle saatiin 0,80 lyysiiniin verrattuna. Staples et al., selluloosalla suoritettua ohutkerroselektroforeesia käyttäen, pH:ssa 1,9, esittivät biologisen ST:n liikkuvuuden olevan lähes sama glutaamihapon liikkuvuuteen verrattuna. Staples et al.:in olosuhteissa saadun glutaamihapon liikkuvuuden muuntaminen synteettiselle ST:lle käytetyissä olosuhteissa lyysiinille saaduksi

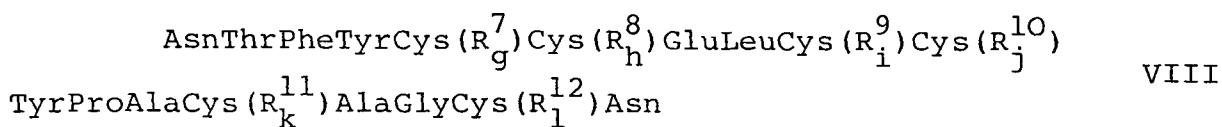
liikkuvuudeksi tuottaa biologiselle ST:lle suhteelliseksi R_F -arvoksi 0,50.

Optisen pyörivän dispersion määrityksistä, edellä mainittua synteettistä ST:tä ja sen biologista vastinetta käyttäen, saatavat alustavat tulokset osoittivat, että nuo kaksi molekyyliä ovat erilaiset.

Kaksi disulfididisidosta sisältävät monomeeriset, synteettiset ST-molekyylit

Ihmisen ST Ib-molekyylien kanssa analogisia, synteettisiä 18-jäännöksisiä polypeptidejä valmistettiin jokseenkin samalla tavalla, kuin mitä edellä on esitetty, paitsi että Cys-jäännösten parit olivat korvautuneet ensimmäisessä polypeptidissä ja tuloksena olevissa hapettuneissa monomeerisissä ST-molekyyleissä vaihtoehtoisilla R_{g-1}^{7-12} -ryhmillä, jotka eivät saa aikaan ionivarausta synteettiseen ST-polypeptidiin, kun tämä polypeptidi on liuotettuna vesiliuokseen fysiologisissa pH-arvoissa. Näin valmistettujen synteettisten ST-molekyylien antigeeninen ja biologinen aktiivisuus testattiin tämän jälkeen. Näissä määrityksissä käytetyt R_{g-1}^{7-12} -ryhmät olivat aminohappoa seriini (Ser).

Ensimmäisen polypeptidin, josta nämä synteettiset ST Ib-analogit valmistettiin, aminohappojärjestys, vasemmalta oikealle, ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten, on esitetty seuraavassa kaavassa VIII:



missä kukin ryhmistä R_{g-1}^{7-12} oli vaihtoehtoinen Ser-jäännös välittömästi edeltävälle Cys-jäännökselle.

Tämän immunologisten kokeiden ryhmää varten, kuten myös kaikkia muita tämänkaltaisia kokeita varten, hapteeniset synteettiset ST Ib- ja biologiset ST Ib-molekyylit kytkettiin ensin kantajana

toimivaan porsaan immunoglobuliini-G:hen (PIG), jokseenkin samoina määrinä, ja jokseenkin samoissa olosuhteissa, kuten jäljempänä osassa IV on esitetty. Näin tuotettuja immunogeeniä vastaan muodostui tämän jälkeen antiseerumeita. Näiden kahden antiseerumin kyky tunnistaa kumpikin ST-molekyyli mitattiin ja niitä vertailtiin edellä esitetyllä Klipstein:in et al. ELISA-tekniikalla, Klipstein et al., Infect. Immun., 37:550-557 (1982). Puhdistetun synteettisen ST:n ja biologisen ST:n tunnistaminen niiden omilla antiseerumeilla asetettiin 100 %:ksi, ja kummankin muun ST-molekyylin tunnistamisen määrä laskettiin tämän jälkeen edellä olevan tunnistamisen mukaisesti. Imevän hiiren koetta käytettiin biologisen aktiivisuuden määrittämiseen.

Täten näihin vertaileviin määrittäyksiin käytettiin sellaisia R_{g-1}^{7-12} -pareja, joissa neljän luvusta $g-1$ arvo oli nolla, kahden luvusta $g-1$ arvon ollessa yksi. Käytetyt vaihtoehtoisten R_{g-1}^{7-12} -ryhmien parit olivat niitä, joiden edeltävät Cys-jäännösten parit on esitetty 14-jäännöksisen polypeptidin kaavassa I sitoutuviksi ryhmiin R_a^1 ja R_e^5 , R_c^3 ja R_f^6 , ja R_b^2 ja R_d^4 . Nämä ryhmät vastaavat niitä Cys-jäännöksiä, jotka on numeroitu luvuilla 5 ja 10, 6 ja 14, ja 9 sekä 17, vastaavasti, ST Ib:n aminohappojärjestyksen aminopäästä lukien. Näin ollen ne R_{g-1}^{7-12} -ryhmät, joissa luvut $g-1$ olivat ykkösiä, olivat R_g^7 ja R_k^{11} , R_i^9 ja R_l^{12} , ja R_h^8 ja R_j^{10} , vastaavasti, kaavan VIII aminohappojärjestyksessä. Näiden vertailujen tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa 1, biologisen ST Ib-, edellä valmistetun synteettisen ST Ib- ja porsaen ST Ia-standardin kanssa.

Taulukko I

Antigeeniset ja biologiset suhteelliset aktiivisuudet

ST Testattu	Koe		
	Anti-Syn.-ST ¹ (prosenttia)	Anti-Biol.-ST ² (prosenttia)	Imevä hiiri (prosenttia)
R _g ⁷ +R _k ¹¹ Ser	45	62	66 (8,2 ng ³)
R _i ⁹ +R _l ¹² Ser	21	43	46 (12,0 ng ³)
R _h ⁸ +R _j ¹⁰ Ser	41	74	92 (6,0 ng ³)
Biologinen Ib	35	100	100 (5,7 ng ³)
Synteettinen Ib	100	263	120 (5,3 ng ³)
Porsaan Ia	3	450 ⁴	10 (55 ng ³)

¹Synteettistä ST:tä vastaan muodostuneen antiseerumin testatun ST:n prosenttinen tunnistaminen.

²Biologista ST:tä vastaan muodostuneen antiseerumin testatun ST:n prosenttinen tunnistaminen.

³Se nanogrammamäärä, joka tarvittiin tuottamaan suolistokokoruomissuhteeksi 0,083.

⁴Tämä arvo vaikuttaa olevan epänormaalin suuri, 1,5:stä noin 2:een kertaa tavallisesta.

Edellä olevan taulukon tulokset kuvaavat tämän keksinnön useita piirteitä. Ensinnäkin huomattavaa immunologista aktiivisuutta, eli antigeenisyyttä voidaan saada aikaan ilman kolmen disulfididoksen läsnäoloa ST-molekyylissä. Toinen, edelliseen liittyvä piirre on, että kaikkia Cys-jäännöksiä ei tarvita, ja jotkut voidaan korvata muilla aminohappojäännöksillä. Kolmanneksi, rokotetuissa eläimissä ripuliin johtavaa biologista aktiivisuutta voidaan vähentää, huomattavan antigeenisen aktiivisuuden pysyessä ennallaan.

Neljäs edellä olevien tulosten kuvaava tämän keksinnön piirre on, että biologinen ST Ib-molekyyli ja kolme disulfididisidosta käsittävä synteettinen ST Ib-molekyyli ovat immunologisesti erilaisia kokonaisuuksia, mikä alleviivaa edellä mainittuja, näiden kahden molekyylin kromatografisten, elektroforeettisten ja optisen pyörivän dispersion tunnusomaisten piirteiden eroja. Täten biologista ST:tä vastaan vaikuttavat vasta-aineet tunnistivat synteettisen ST:n 263 % paremmin kuin biologisen ST:n, jota vastaan ne olivat muodostuneet. Samoin synteettistä ST:tä vastaan muodostuneet vasta-aineet tunnistivat biologisen ST:n ainoastaan 35 % niin hyvin verrattuna siihen, miten ne tunnistivat synteettisen ST:n.

Synteettisen ja luonnollisen ST-molekyylin välinen ero alleviivautuu edelleen ST Ia:lla (porsaan), jonka synteettistä ST:tä vastaan toimivat vasta-aineet tuskin tunnistivat, mutta jonka biologista ST:tä vastaan muodostuneet vasta-aineet tunnistivat noin 10:stä noin 100:aan kertaa paremmin biologiseen ST:hen itseensä verrattuna, ottaen sen tosiseikan huomioon, että arvo 450 % saattaa olla epänormaalin suuri. Vaikka arvo 450 % olisikin esimerkiksi 5 kertaa liian suuri, niin kuitenkin biologista ST Ib:tä vastaan muodostuneet vasta-aineet tunnistivat porsaan ST Ia:n vähintään noin 20 kertaa paremmin, kuin mitä synteettistä ST Ib:tä vastaan muodostuneet vasta-aineet. Jos biologinen ja synteettinen ST Ib-molekyyli olisi sama, niin kumpaakin vastaan toimivien vasta-aineiden voisi odottaa tunnistavan porsaan ST Ia:n suurin piirtein samanlaisella tehokkuudella. Koska asianlaita ei missään tapauksessa ollut näin, niin biologisen ST Ib- ja synteettisen ST Ib-molekyylin on oltava erilaiset, vaikkakin molemmat käsittävät identtiset primääriset aminohappojen järjestykset, ja molemmat sisältävät kolme molekyylin sisäistä disulfididisidosta.

Monomeerisen ST:n muut valmistheet

Ensimmäiset lisäpolypeptidit ja ST-molekyylit on valmistettu (i) erilaisia hapettavia reittejä käyttäen, (ii) siten, että

niiden aminohappojärjestykset erosivat ST Ib:n järjestyksestä, (iii) eri R_{g-1}^{7-12} -ryhmiä korvaamalla, (iv) alkyloituja Cys- R_{a-f}^{1-6} -ryhmiä käyttämällä sekä (v) sitomalla R_m^{13} -ryhmiä 18-jäännöksisen ST Ib-molekyylin N-pään aminohappojäännökseen. Useiden näiden materiaalien antigeeninen ja/tai biologinen aktiivisuus on testattu edellä mainituilla ELISA- ja imevän hiiren tekniikalla, vastaavasti alla olevassa kohdassa (3) valmistettuja, synteettistä ST:tä vastaan vaikuttavia antiseerumeita käyttäen. Useiden näiden valmisteiden tulokset ja testit on lueteltu seuraavassa taulukossa 2.

Taulukko 2
Muut valmisteet

<u>Hapettamiset</u> ¹	ELISA ² (prosenttia)	Imevä ³ hiiri (prosenttia)
(1) Huoneen lämpötila; 1,0 mg/ml; 0,1 M NH_4HCO_3 ; pH 8,0; 6 tuntia	95	120 (5,3 ng)
(2) 4°C; 1,0 mg/ml; 0,1 M NH_4HCO_3 ; pH 8,0; 6 tuntia	87	80 (6,9 ng)
(3) Huoneen lämpötila; 1,0 mg/ml; 0,1 M NH_3 ; pH 10,3; 1,0 tuntia; lyofilisoitu; 4°C; 1,0 mg/ml; puskuroitu suolaliuos; pH 7,2; 8 tuntia	27	85 (6,5 ng)
(4) Huoneen lämpötila, 1,0 mg/ml; 0,1 M NH_3 ; pH 10,3; asetettu etik- kahapolla pH-arvoon 8,0 5 minuutin kuluttua; ekvivalentti $K_3Fe(CN)_6$; 3 tuntia	vähemmän kuin 2	N.D. ⁴
(5) Huoneen lämpötila; 2,0 mg/ml; 0,1 M NH_3 ; pH 10,3; 1 tunti; lyofilisoitu; 4°C; 2,0 mg/ml; puskuroitu suolaliuos; 8 tuntia	13	55 (10 ng)
(6) Huoneen lämpötila; 1,0 mg/ml; 1,0 mg/ml; permuurahaishappo	paljon vähem- män kuin 1	N.D.
(7) Huoneen lämpötila; 1,0 mg/ml; 0,1 M NH_3 ; pH 10,3; asetettu välit- tömästi etikkahappoa sisältävällä liuoksella pH-arvoon 8,0; 22 tuntia	53	N.D.

(8) Huoneen lämpötila; 1,0 mg/ml; 0,1 <u>M</u> NH_3 ; pH 10,3; 22 tuntia	26	N.D.
(9) Huoneen lämpötila; 1,0 mg/ml; 0,1 <u>M</u> NH_4HCO_3 ; pH 8,0; 8 tuntia; Sephadex ⁴ G-10 ja DEAE-Bio Geeli A; lyofilisoitu	100	N.D.
(10) Huoneen lämpötila; 1 mg/ml; 8 <u>M</u> urea; pH 8,0; 8 tuntia	7	N.D.

Alkylointi

(11) Hapetus kuten kohdassa (1); alkylointi keskimäärin 4 moolilla jodoetikkahappoa, sen jälkeen kun keskimäärin yksi disulfidisisidos on muodostunut.	12	N.D.
(12) Hapetus kuten kohdassa (1); alkylointi keskimäärin 2 moolilla jodoetikkahappoa, sen jälkeen kun keskimäärin kaksi disulfidisisidosta on muodostunut.	14	N.D.

Asyyli-ST (R_m^{13})

(13) Ensimmäisen polypeptidin 18 aminohappojäännöksen aminopäähän lisättiin N-asetyyliryhmä ennen peptidiä suojaavien ryhmien poista- mista, mitä seurasi suojauksen pois- taminen ja hapettaminen, kuten kohdassa (7).	53	N.D.
(14) LT B-(37-62)--ST; hapetettu kuten kohdassa (1).	147	N.D.
(15) LT B-(27-36)--ST; huoneen lämpötila; 0,1 mg/ml; 0,5 <u>M</u> NH_4HCO_3 ; pH 8,0; yli yön.	24	N.D.
(16) LT B-(27-36)--ST; huoneen lämpötila; 1,0 mg/ml; 0,5 <u>M</u> NH_4HCO_3 ; pH 8,0; yli yön.	121	N.D.
(17) LT B-(27-36)--ST; huoneen lämpötila; 5,0 mg/ml; 0,5 <u>M</u> NH_4HCO_3 ; pH 8,0; yli yön.	92	N.D.

Vaihtoehtoiset järjestykset

(18) ST Ib:n karboksipään 14 aminohappoa, hapetettu kuten kohdassa (9).	6 ⁵	N.D.
(19) ST Ib:n karboksipään 15 aminohappoa, hapetettu kuten kohdassa (9).	55	N.D.
(20) Kaavassa VIII ryhmiä R_h^8 ja R_i^9 edeltävät Cys-jäännökset on korvattu Ser:illä, hapetettu kuten kohdassa (9).	71	N.D.
(21) Kaavassa VIII ryhmiä R_i^9 ja R_k^{11} edeltävät Cys-jäännökset on korvattu Ser:illä, hapetettu kuten kohdassa (9).	152	N.D.
(22) Kaavassa VIII ryhmiä R_j^{10} ja R_k^{11} edeltävät Cys-jäännökset on korvattu Ser:illä, hapetettu kuten kohdassa (9).	27	N.D.

¹Kaavan VIII järjestyksestä vastaavaa, ensimmäistä polypeptidiä, missä luvut g-1 olivat nollia, käytettiin kuhunkin kohtaan (1)-(17). ST Ib:n karboksipään 14 aminohappoa ja 15 aminohappoa vastaavia ensimmäisiä polypeptidejä käytettiin kohtiin (18) ja (19), vastaavasti. Niitä ensimmäisiä polypeptidejä, jotka vastasivat kaavan VIII järjestykseen tehtyjä substituotteja, käytettiin kohdissa (20)-(22), jonka jälkeen ne hapetettiin. Reaktio-olosuhteet on ilmoitettu järjestyksessä lämpötila; ensimmäisen polypeptidin pitoisuus milligrammoina/millilitra; lisättyjen aineiden molaarinen pitoisuus; se pH-arvo, jossa hapettaminen aloitettiin; sekä hapetustoimenpiteen kesto. Kutakin liuosta sekoitettiin varovaisesti, jotta liuos saatiin kosketuksiin hapettavana aineena toimivan, ilmakehän molekulaarisen hapen kanssa, ellei toisin ole ilmoitettu. Valmisteet testattiin ilman lisäpuhdistusta.

²ELISA toteutettiin kuten taulukossa 1 on esitetty niillä anti-seerumeilla, jotka kohdassa (3) valmistettua ST:tä vastaan olivat muodostuneet, mikä toimi vertailuperusteena. Tämä ST-valmiste puhdistettiin ennen kytkemistä, kun taas valmiste (3) esittää puhdistamattoman tuotteen tuloksia.

³Imevän hiiren koe toteutettiin, kuten taulukossa 1, prosent-tisuuksien perustua biologisen ST:n arvolle, suluissa ole-vien arvojen ollessa niitä ST:n määriä nanogrammin, jotka tuottivat suolistokoko ruumissuhteeksi 0,083.

⁴N.D. = Ei määritetty.

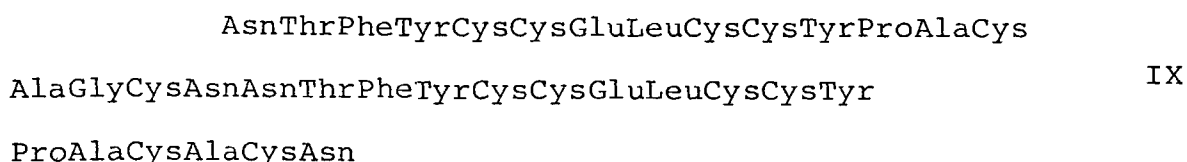
⁵Oletetaan, että saatu antigeenisyyssarvo on luonnottoman alhainen.

Edellä olevat tulokset kuvaavat sitä, että korkein antigeeni-nen aktiivisuus (ELISA) saavutetaan sellaisissa hapettamisen olosuhteissa, joissa ensimmäinen synteettinen polypeptidi on läsnä liuoksessa pitoisuutena, joka on pienempi kuin noin 2 milligrammaa millilitrassa, hapettavana aineena on ilman happi, pH-arvo on alle noin 10, ja erityisesti pH-arvo on noin 7,5:stä noin 8,0:aan, reaktion lämpötila on noin nollasta noin 25°C:een ja hapettumisreaktion kesto on vähemmän kuin noin 24 tuntia.

Multimeerisen ST:n valmistaminen

A. Multimeerinen synteettinen ST-dimeeri (ST/ST)

Ensimmäinen polypeptidi, jolla oli kahden ST Ib-molekyylin 36 jäännöksen järjestys, jotka kaksi molekyyliä olivat liitty-neet toisiinsa pää-loppupää-tavalla amidisidoksella, valmistet-tiin vaiheittaisella, kiinteän faasin synteetillä, joka on esitetty edellä. Tämän materiaalin aminohappojäännösten järjes-tys, vasemmalta oikealle, ja suunnassa aminopäästä karboksi-päähän edeten, on esitettynä seuraavassa kaavassa IX:



Tämän jälkeen tämä molekyyli liuotettiin, pitoisuuden ollessa 1 milligramma millilitrassa, 0,05 molaariseen ammoniumbikar-bonaattipuskuriin, jonka pH-arvo oli 8,0. Tuloksena olevaa

liuosta sekoitettiin varovasti hapettavana aineena toimivan ilmakehän molekulaarisen hapen läsnäollessa, kunnes vapaita sulfhydryyliryhmiä ei enää voitu todeta Ellman-reagenssilla, supra, eli yön yli. Näin valmistetut ST/ST-molekyylit erotettiin reaktioseoksen muusta materiaalista kolonnikromatografi-
sesti, ne pakastekuivattiin, ja käytettiin ilman lisäpuhdistusta. 36-meerisen ensimmäisen polypeptidin aminohappoanalyysi oli yhtäpitävä kaavassa IX esitetyn järjestyksen kanssa.

Ilman lisäpuhdistusta tuloksena olevan ST/ST:n antigeenisuus luonnollista monomeeristä ST:tä vastaan muodostuneita vasta-aineita kohtaan oli 233 prosenttia, luonnollisen ST Ib:n antigeenisyyteen verrattuna samoja vasta-aineita vastaan. Tämän ST/ST:n biologinen aktiivisuus oli vähemmän kuin yksi prosentti luonnollisen ST Ib:n samasta aktiivisuudesta imevän hiiren kokeessa, supra, aina kokeen rajoille saakka, mikä tässä oli 640 nanogrammaa.

Samalla tavalla voidaan valmistaa synteettinen trimeeri (ST/ST/ST), tetrameeri (ST/ST/ST/ST), ja pitemmät pää-loppupää-multimeerit. Synteettiset dimeeri- ja trimeeri-ST-molekyylit ovat erityisen suositeltavia niistä vaikeuksista johtuen, jotka liittyvät sellaisen synteettisen polypeptidin tuottamiseen, joka polypeptidi käsittää enemmän kuin yhteensä noin 60 aminohappojäännöstä.

Tulokset synteettistä dimeeriä (ST/ST) rokotevalmisteessa käyttäen on jäljempänä esitetty yksityiskohtaisemmin osassa V.

B. Multimeerinen synteettinen ST-polymeeri

Edellä esitetyn kaltaisesti valmistettua 18-meeristä ensimmäistä synteettistä ST Ib-polypeptidiä käytettiin havainnollisuuden vuoksi niiden synteettisten ST-polymeerien valmistukseen, joiden polymeerien lukuisat synteettisen ST:n muodostamat toistuvat yksiköt ovat sitoutuneet toisiinsa molekyylin sisäisillä, polypeptidien välisillä kystiinin disulfididisidoksilla.

Havainnollisessa valmisteessa polymeerinen synteettinen ST (johon jäljempänä joskus viitataan nimellä P-ST) valmistettiin liuottamalla edellä valmistettua, ensimmäistä synteettistä ST-polypeptidiä (18-meeriä) 0,1 molaariseen ammoniumbikarbonaattipuskuriin, jonka pH-arvo oli 8,0, sellaisen liuoksen aikaansaamiseksi, jonka liuoksen pitoisuus on noin 1 milligramma ensimmäistä synteettistä ST-polypeptidiä millilitrassa. Tällaisen liuoksen 10:stä 100:aan millilitran tilavuuksia on käytetty. Näin valmistettua liuosta sekoitettiin varoen huoneen lämpötilassa avoimessa astiassa, Cys-merkaptaanien hapettumisen aikaansaamiseksi. Reaktioalustan analysoiminen noin 16-24 tuntia kestäneen hapettumisjakson jälkeen Ellman-reagenssia käyttäen, supra, osoitti, että vapaita sulfhydryyliryhmiä ei ollut läsnä.

Hapettunut reaktioalusta lyofilisoitiin, ja tuloksena oleva, kuiva materiaali suspendoitiin uudestaan 0,1 molaariseen ammoniumbikarbonaattipuskuriin, (pH 8,0-8,5), ja se ajettiin Sephadex G-50-kromatografiakolonnin läpi, joka kolonni oli tasapainotettu erotusta varten samalla puskurilla. Polymeerisen synteettisen ST:n (P-ST) tyyppillinen erottuminen monomeerisestä synteettisestä ST:stä (M-ST) on esitetty kuvan 17 käyrässä, mainitunlaista kolonnia käyttäen.

Käyrän oordinaatta on optisen tiheyden yksiköissä, jotka on luettu 278 nanometrissä. Abskissalla esitetään eluaatin kulloinkin 4,5 millilitran numeroidut fraktiot, jotka on kerätty kolonnista. Numeroilla 5-9 varustettujen fraktioiden eluaatti otettiin talteen P-ST:n sisältävänä, kun taas numeroilla 10-17 varustetut fraktiot otettiin talteen, koska nämä fraktiot sisälsivät synteettisen monomeerisen ST:n (M-ST).

Näin saadun P-ST:n fraktionointi sellaista kolonnia käyttäen, jonka kolonnin erottava hartsi oli tyyppiä Bio Rad P-30 (Bio Rad, San Raphael, CA) osoitti, että suurimman osan, Sephadex G-50-kolonnilla eristettyjen P-ST:n keskimääräinen molekyylipaino

oli vähintään noin 40 000 daltonia (40 kd P-ST). 40 kd P-ST:n lisäfraktionointi Bio Gel A-1,5 m-hartsia (Bio Rad) käyttäen osoitti, että tämän materiaalin suurimman osan keskimääräinen molekyylipaino oli noin 400 000 daltonia, jonkin osan materiaalista molekyylipainon ollessa suurempi kuin noin 1 500 000 daltonia (1500 kd P-ST). Edelleen suoritettut molekyylipainon lisäfraktionoinnit Bio Gel A-5 m-hartsia (Bio Rad) sisältävää kolonnia käyttäen hajottivat 1500 kd P-ST:n fraktioon, joka käsitti sellaista P-ST:tä, jonka molekyylipaino oli suurempi kuin noin 15 000 000 daltonia (15 000 kd P-ST) sekä toiseen fraktioon, jonka keskimääräinen molekyylipaino oli noin 4 000 000 daltonia (4000 kd P-ST).

Edellä esitetyt molekyylipainot ovat arviointeja, jotka perustuvat P-ST:n oletettuun pyöreään muotoon sekä tietoon kolonnin tyhjästä tilavuudesta ja ekskluusion rajoista, mutta sellaisia sisäisiä standardeja käyttämättä, joilla standardeilla on tunnettu molekyylipaino. Kukin edellä saaduista fraktioista lyofilisoitiin sen jälkeen, kun ne olivat eluoituneet kolonnista.

Jäljempänä esitetyt tulokset (osat V ja VI) P-ST:tä käyttäen ovat lyofilisoiduille, Sephadex G-50-puhdistetuille valmisteille, jotka käsittävät pääasiassa polymeeriä, jonka keskimääräinen molekyylipaino on vähintään noin 40 000 daltonia; eli 40 kd P-ST:n. Tutkimustyötä tehdään parhaillaan sellaisten P-ST:n fraktioiden antigeenisyyden, immunogeenisyyden ja biologisen aktiivisuuden selvittämiseksi, joiden fraktioiden molekyylipainot vaihtelevat.

Tyypillisten 40 kd P-ST-valmisteiden antigeenisyys luonnollista ST Ib:tä vastaan toimivia vasta-aineita kohtaan on 900 ja 1500 prosentin välillä luonnollisen materiaalin (ST Ib) antigeenisyydestä, ja niiden biologinen aktiivisuus imevän hiiren kokeessa, supra, on noin 20 prosenttia tai vähemmän luonnollisen ST Ib:n aktiivisuudesta.

Yleinen synteettinen menetelmä

Yleiset synteettiset toimenpiteet monomeerisen tai multimeerisen synteettisen ST-molekyylin valmistamiseksi, jolla molekyylillä on vähintään noin 10 prosenttia biologisen ST:n antigeenisyydestä, edellä oleviin ja lukuisiin muihin määrityksiin perustuen, ovat seuraavat:

(1) Monomeerinen, ensimmäinen synteettinen polypeptidi valmistetaan olosuhteissa, joissa hapettaja puuttuu jokseenkin täysin. Ensimmäinen synteettinen polypeptidi käsittää kaavan I, kaavan III, kaavan V, kaavan VI tai kaavan IX aminohappojäännösten järjestyksen, vähintään kaksi Cys-jäännöstä, joiden R_{a-f}^{1-6} -ryhmät ovat vetyä; eli kaksi CysH-jäännöstä, ja se on vapaa molekyylin sisäisistä kystiinin disulfidisidoksista, ja se saattaa sisältää R_m^{13} -ryhmän, jossa "m":llä on arvo yksi.

(2) Näin valmistettu ensimmäinen polypeptidi on käytettävissä, ja se liuotetaan tai dispergoidaan vesiseokseen pitoisuutena, joka on alhaisempi kuin noin 5 milligrammaa millilitrassa, mieluummin pitoisuutena, joka on alhaisempi kuin noin 2 milligrammaa millilitrassa, ja mieluiten pitoisuutena, joka on noin 1 milligrammasta millilitrassa pitoisuuteen 0,1 milligrammaa millilitrassa. Sen seoksen, johon ensimmäinen polypeptidi liuotetaan tai dispergoidaan, pH-arvo on mieluummin alkalinen, ja pienempi kuin noin 10,5, ja mieluiten pH-arvo on noin 7,5:stä noin 10,5:een.

(3) Tämän jälkeen ensimmäistä polypeptidiä sisältävä seos saatetaan kosketuksiin hapettajana toimivan ilman molekulaarisen hapen kanssa. Hapettamisen aikana liuoksen pH on mieluummin noin 7,0:sta noin 9,5:een, ja mieluiten noin 7,5:stä noin 9:ään, ja kaikkein mieluiten noin 7,5:stä noin 8,0:aan. Liuos saatetaan mieluummin kosketuksiin hapettajan kanssa varovaisella sekoittamisella ilmalle avoimessa astiassa.

(4) Seoksen ja ilman välistä kosketusta ylläpidetään noin 1:stä noin 24:ään tuntia kestävän jakson ajan, ja mieluummin noin 2:sta noin 8:aan tuntia, vähintään yhden molekyylin sisäisen, polypeptidin sisäisen tai polypeptidien välisen kystiinin disulfididisidoksen vähintään kahdesta läsnäolevasta Cys (CysH)-jäännöksestä. Monomeerisissä synteettisissä ST:ssä ja pää-loppupää-tyyppisissä multimeereissa tämä vähintään yksi kystiinin disulfididisidos on molekyylin sisäinen, polypeptidin sisäinen sidos, kun taas polymeerisessä synteettisessä ST:ssä (P-ST) tämä vähintään yksi kystiinin disulfididisidos on molekyylin sisäinen, polypeptidien välinen sidos. On suositeltavaa, että kukin P-ST:n toistuvista ST-yksiköistä muodostaa keskimäärin noin kaksi polypeptidien välistä kystiinin disulfididisidosta siten, että useampia kuin kaksi toistuvaa ST-yksikköä käsittäviä P-ST-molekyyliä muodostuu.

Suosittelavassa monomeerisen synteettisen ST:n toteutusmuodossa disulfididisidokset muodostuvat niiden Cys-jäännösten väliin, jotka jäännökset edeltävät kaavojen I, III, V tai VI pareja R_g^7 ja R_k^{11} , R_h^8 ja R_j^{10} , ja R_i^9 ja R_l^{12} , jotka vastaavat niitä jäännösten asemia, jotka on varustettu numeroilla 5 ja 10, 6 ja 14 sekä 9 ja 17, ST Ib-molekyylin aminopäästä lukien, vastaavasti. Suositeltavamassa toteutusmuodossa molekulaa-risen hapen ja liuoksen välistä kosketusta pidetään yllä ajanjakson ajan, joka on riittävä kahden disulfididisidoksen muodostumiseksi, mieluummin edellä mainittujen Cys-jäännösten parien väliin, ja mieluiten ajanjakson ajan, joka on riittävä kolmen disulfididisidoksen muodostumiseksi, edelleen mieluummin mainittujen Cys-jäännösten parien väliin.

Hapettaminen suoritetaan mieluummin lämpötilassa, joka on noin 0°C :sta noin 25°C :hen.

(5) Sen jälkeen kun hapetusreaktio on kulunut loppuun, niin tavallisesti synteettinen ST otetaan talteen lyofilisoimalla, ja se puhdistetaan kolonnikromatografisesti.

III. Monomeerisen synteettisen ST:n käyttötavat

Edellä esitetyn kaltaisesti valmistettu monomeerinen synteettinen ST sidottiin kantajamolekyylisiin tai sitä käytettiin yksinään ELISA-mittauksissa, tutkimuksissa, joita suoritettiin Dr. Frederick A. Klipstein'in johdolla, laitoksesta University of Rochester Medical Center, Rochester, New York. Kokeellisten määritysten tulokset, sekä toimenpiteet näiden määrityksien suorittamiseksi on esitetty seuraavassa, ja jäljempänä osassa IV. Mikäli toisin ei mainita, niin osissa III ja IV esitetyt tutkimukset toteutettiin tämän keksinnön mukaisella monomeerisellä synteettisellä ST:llä (M-ST).

A. Ominaisuudet

Ihmisen E.coli-LT⁻/ST⁺-kannasta 18D (O42:H47) homogeeniseksi puhdistetun ST Ib:n arvioitu molekyylipaino on 1972, ja se käsittää kymmenen erilaista aminohappoa, jotka ovat järjestäytyneet 18 aminohapon järjestykseksi (Staples et al., supra), jonka primäärin rakenteen Chan et al., supra, osoittivat olevan AsnThrPheTyrCysCysGluLeuCysCysTyrProAlaCysAlaGlyCysAsn. Sellainen synteettinen molekyylä, jolla oli tämä primäärinen rakenne, valmistettiin (osa II), ja tämän polypeptidin biologisia ominaisuuksia verrattiin sen puhtaan ST:n ominaisuuksiin, joka ST oli saatu kannan 18 D bakteerikasvatuksesta (biologinen ST).

Kyky indusoida nesteen erittymistä

Synteettisen ja biologisen ST:n kyky indusoida nesteen erittymistä imevän hiiren kokeessa (kuva 1) ja rotan ligatoiduissa suolisilmukoissa (kuva 2) oli jokseenkin yhtä voimakas. Kahden toksinin pienimmissä vaikuttavissa annostuksissa havaitut pienet erot syntyivät kokeellisesta vaihtelusta, ja itse asiassa useat peräkkäin valmistetut synteettisen ST-valmisteet saivat aikaan identtisen reaktion natiiviin tai biologiseen ST:hen verrattuna imevän hiiren kokeessa. 30 minuuttia kestävä altistaminen 100°C:lle ei vaikuttanut kummankaan toksinin voimakkuuteen kummassakaan eläinkoejärjestelmässä.

Aikaisemmat havainnot ovat osoittaneet, että biologisen ST:n disulfidisiltojen hajottaminen pelkistävien reagenssien, kuten 2-merkaptoetanolin tai ditiotreitolin, käsittelyllä tuhosi sen biologisen aktiivisuuden, Staples et al., supra. Synteettisen ST:n 60 minuuttia kestävä altistaminen 5×10^{-4} -molaariselle ditiotreitolille tuhosi myös sen erittämisaktiivisuuden imevän hiiren kokeessa.

Immunologinen suhde

Synteettisen ja biologisen ST:n antigeenisyydet olivat samantlaiset, kun kummatkin testattiin entsyymisidotulla immunosorbertin kokeella (ELISA), biologista ST:tä vastaan toimivia hyperimmuuneja antiseerumeita käyttäen. Niitä pitoisuuksia, joilla optiseksi tiheydeksi saatiin 0,600 aallonpituudella 410 nanometriä, verrattaessa synteettisen ST:n antigeenisyyden havaittiin olevan 70 % biologisen ST:n antigeenisyydestä (kuva 3), mutta toksiinien antigeenisyydet olivat identtiset, kun molemmat testattiin synteettistä ST:tä vastaan toimivia hyperimmuuneja ja antiseerumeita käyttäen. Nämä tulokset parantuivat oleellisesti myöhempien valmisteiden kohdalla, kuten edellä olevassa taulukossa 1 on esitetty, synteettisen ST:n ollessa noin 3-kertaa paremman kuin biologisen ST Ib:n tässä samassa ELISA-kokeessa.

Joko synteettistä tai biologista ST:tä vastaan vaikuttavien, hyperimmuunien antiseerumeiden toksiinien erittymistehoon kohdistuvan neutraloivan vaikutuksen arvioimiseksi imevän hiiren kokeessa, kulloisenakin päivänä kolmelle hiirelle annettiin 100 mikrolitraa suoliston sisäisesti, joka annos sisälsi 2 hiiriyksikköä (MU), eli kaksi kertaa pienin vaikuttava annos (katso Materiaalit ja menetelmät, osa IVA) kutakin toksiinia, joita oli inkuboitu toivotussa antiseerumin laimennoksessa 3 tunnin ajan 37°C :ssa (kuva 4). 1 millilitran antiseerumia neutraloimien hiiriyksikköiden lukumäärä saatiin kertomalla se tulokseksi toivottu antiseerumin laimennos, joka vaadittiin neutraloimaan (eli tuottamaan suolistoruumis-suhteeksi

vähintään 0,083) erittymisteho, 10-kertainen laimennostekijä, ja tekijä 2 keskenään, jolla viimeksi mainitulla tekijällä hiiriyksiköt sovitettiin käytettyyn kahteen yksikköön.

Kumpaakin toksiinivalmistetta vastaan vaikuttavat hyperimmuunit antiseerumit seroneutraloivat erittymisvaikutuksen synteettisen ja biologisen ST:n imevän hiiren kokeessa arviolta samalla tavalla: yksi millilitra biologista ST:tä vastaan vaikuttavaa, hyperimmuunia jäniksen antiseerumia neutraloi 160 MU synteettistä ja 190 MU biologista ST:tä, kun taas yksi millilitra synteettistä ST:tä vastaan vaikuttavaa, vuohen hyperimmuunia antiseerumia neutraloi 220 MU synteettistä ja 240 MU biologista ST:tä.

Rottien immunointi

Synteettistä ST:tä käyttäen suoritettu immunointi tuotti serumien antitoksiinititthereiden suhteeksi 1:32 (neljä kertaa vertailua suurempi) ja mukosiaalisten IgA-tiitthereiden suhteeksi 1:64 (viisi kertaa vertailua suurempi). Nesteen erittyminen pieneni huomattavasti, mikä oli verrattavissa siihen määrään, joka aikaisemmin oli todettu puolipuhalla biologisella ST:llä immunoiduissa rotissa [Klipstein, et al., Infect. Immun., 34:637-639 (1981)] sekä rotissa, joita uhattiin joko synteettisellä tai biologisella ST:llä, sekä elävällä ST:tä tuottavalla kannalla, (taulukko 3), seuraavassa.

Taulukko 3

Uhan tulokset immunoiduissa rotissa

Uhka^a

<u>ST-immunogeeni</u>	<u>ST(B)-toksiini</u>	<u>ST(S)-toksiini</u>	<u>LT⁻/ST⁺</u>
Synteettinen (S)	54 $\pm$ 2	66 $\pm$ 2	55 $\pm$ 1
Biologinen (B) ^b	83 $\pm$ 9	ND ^c	69 $\pm$ 2

^aKeskiarvo $\pm$ keskiarvon standardipoikkeama, prosenttia alentuneesta erityyksestä immunoiduissa rotissa verrattuna samalla tavalla uhattuihin immunoimattomiin rottiin.

^bTiedot otettu julkaisusta Klipstein et al., Infect. Immun., 34:637-639 (1981).

^cEi määritetty.

Edellä esitetyt tulokset osoittavat, että synteettisesti tuotetulla ST-toksiinilla, jonka rakenne perustuu ihmisen ST:n rakenteeseen, suoritettulla immunoinnilla saadaan aikaan suoja ihmisestä peräisin olevien, ST:tä tuottavien, enterotoksigeenisten E.coli-kantojen aiheuttamaa uhkaa vastaan.

Tässä osassa (III A) esitettyjen tutkimusten lisäyksityiskohdista on löydettävissä julkaisusta Klipstein et al., Infect. Immun., 39:117-121 (1983), joka täten on liitetty oheiseen hakemukseen viittauksella.

B. ST-LT-konjugaatit

Tässä kappaleessa esitetyt tulokset käsittelevät niiden konjugaattien koostumusta ja ominaisuuksia, jotka konjugaatit on saatu muodostamalla ristisidoksia useissa olosuhteissa synteettisen ST:n (osa II) ja joko LT-holotoksiinin tai sen ei-toksisen komponentin B-alayksikön välille, jotka molemmat toimivat kantajana, joka huolehtii toksiinin sitomisesta mukosaalisilla pinnoilla oleviin spesifisiin reseptoreihin. B-alayksikköön ristisidottua synteettistä ST:tä sisältävän rokotteen teho saamaan spesifiset, seerumin ja mukosaalisen antitoksiinin kutakin komponenttina olevaa toksiinia vastaan kohdistuvat reaktiot aikaan on myös osoitettu, mikä täten immunoiduissa rotissa tuottaa vahvan suojan kumman tahansa toksiinimuodon uhkaa vastaan, tai joko ST:tä tai LT:tä tuottavan heterologisen, elävän ETEC:n uhkaa vastaan.

ST:n konjugoiminen LT:hen

Synteettinen ST konjugoitiin LT-holotoksiiniin, ST:n ja LT:n välisen alkuperäisen moolisuhteen ollessa 100:1, sellaisia 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidin (EDAC) ja koko konjugaattiproteiinin välisiä suhteita käyttäen, jotka suhteet vaihtelivat arvojen 0,5:1 ja 40:1 välillä (kuva 5). ST:n suurimman määrän liittäminen LT:hen tapahtui EDAC:in ja konjugaatin välisen suhteen ollessa 1:1; kuitenkin tässä suhteessa jäljelle jäi sen verran LT:n jäännöstoksisuutta,

joka ei ollut hyväksyttävissä. EDAC:in ja konjugaattiproteiinin välisen suhteen kohottaminen johti LT:n jäännöstoksisuuden asteittaiseen pienenemiseen, mutta tähän liittyi vastaavaa molempien konjugaatissa olevien toksiinien antigeenisyyden pienenemistä.

EDAC:in ja konjugaatin välinen suhde 20:1 johti konjugaattiin, jossa LT:n toksisuus oli pienentynyt hyväksyttävään asteeseen (0,3 %), mutta molempien komponentteina olevien toksiinien antigeenisuus pieneni vähemmäksi kuin 25 %:ksi tässä suhteessa, mikä osoitti sen, että tämä konjugaatti olisi tehoton antigeeni. Nämä havainnot johtivat LT:n korvaamiseen ei-toksisella B-alayksiköllä, jolloin LT:n jäännöstoksisuuden aiheuttamat ongelmat voitiin kiertää.

ST:n konjugoiminen B-alayksikköön

Synteettinen ST konjugoitiin B-alayksikköön ST:n ja B-alayksikön välisen alkuperäisen moolisuhteen ollessa 100:1, sellaisia EDAC:in ja konjugaattiproteiinin välisiä suhteita käyttäen, jotka vaihtelivat arvojen 0,5:1 ja 40:1 välissä. ST:n liittymisen ja antigeenisyyden muuttumisen ilmeneminen oli samankaltaista, kuin mitä havaittiin ST:tä LT:hen kytkettäessä, paitsi että ST:n suurin määrä sitoutui EDAC:in ja konjugaatin välisen suhteen ollessa 2:1. Tässä suhteessa saadun konjugaatin toksisuus todettiin samaksi kuin läsnäolevan ST:n toksisuus; se pieneni 0,3 %:a vaimentamattoman toksiinin toksisuudesta.

Tästä syystä EDAC:in ja konjugaatin välistä suhdetta 2:1 käytettiin tutkimuksissa, joissa käytettiin radioaktiivisella aineella merkittyä ST:tä ST:n ja B-alayksikön välisen alkuperäisen moolisuhteen vaikutuksen konjugaattiin liittyvän ST:n määrään määrittämiseksi. Kymmenen nanomoolia ST:tä (5 nanomoolia kylmää, merkitsemätöntä ST:tä plus 5 nanomoolia radioaktiivisella aineella merkittyä ST:tä) sekoitettiin 2:sta 0,1:een nanomoolin B-alayksikköä kanssa, jolloin ST:n ja

B-alayksikön alkuperäiseksi moolisuhteeksi saatiin arvosta 5:1 arvoon 100:1 (kuva 6). ST:n ja B-alayksikön välisen alkuperäisen suhteen kasvattaminen johti asteittain suureneviin, B-alayksikköön liittyneisiin ST:n määriin. Vaikka ST:n ja B-alayksikön alkuperäinen suhde 25:1 tuotti sellaisen lopullisen konjugaatin, joka sisälsi enemmän kuin 90 % ST:tä molaarisuuteen perustuen, niin ST:n osuus painoon perustuen oli ainoastaan 25 %; jälkimmäinen arvo kasvoi, kun suurempia alkuperäisiä moolisuhteita käytettiin.

Konjugaattien antigeenisuus

EDAC:in pitoisuuden vaikutus lopullisessa konjugaatissa olevien yksittäisten toksiinien koostumukseen ja antigeenisyyteen saatiin selville konjugoimalla ST:n ja B-alayksikön moolisuhteen ollessa 50:1, niitä EDAC:in ja konjugaatin välisiä suhteita käyttäen, jotka suhteet vaihtelivat arvojen 1:1 ja 2:1 välillä (kuva 7). ST:n suurin konjugoituminen tapahtui EDAC:in ja konjugaatin välisen suhteen ollessa 2:1, kuitenkin arvoa 1,5:1 suuremmat suhteet johtivat ST:n antigeenisyyden huomattavaan putoamiseen, ja B-alayksikön antigeenisyyden kohtuulliseen alenemiseen. ST-antigeeniyksiköiden suurin lukumäärä (saatu kertomalla läsnäolevan toksiinin prosenttinen määrä toksiinin antigeenisyyden prosenttisen osuuden kanssa) saavutettiin EDAC:in ja konjugaatin välisen suhteen ollessa 1,5:1.

Tästä syystä EDAC:in ja konjugaatin välistä suhdetta 1,5:1 käytettiin tutkimuksissa, joissa selvitettiin ST:n ja B-alayksikön välisen alkuperäisen moolisuhteen vaikutusta lopullisen konjugaatin koostumukseen ja ominaisuuksiin. ST:n ja B-alayksikön välisen alkuperäisen moolisuhteen nostaminen arvosta 50:1 arvoon 100:1 johti asteittain suurenevaan ST:n osuuteen lopullisessa konjugaatissa (kuva 8).

Koska alkuperäisen moolisuhteen muutokset saavutettiin pitämällä ST:n määrää vakiona (300 nanomoolia) ja vähentämällä lisätyn B-alayksikön määrää (6:sta 3:een nanomoolia), niin

EDAC:in ja ST:n välinen suhde pieneni, kun taas EDAC:in ja B-alayksikön välinen suhde kasvoi, alkuperäisten moolisuhteiden kasvaessa. Tämä muutos oli selityksenä sille tosiseikalle, että ST-antigeenisuus kasvoi hieman, kun taas B-alayksikön antigeenisuus putosi kohtuullisesti. Näiden kahden tekijän (koostumus ja antigeenisuus) lopullinen vaikutus oli, että alkuperäisen moolisuhteen kasvattaminen johti asteittain suureneviin ST-antigeeniyksiköiden määriin, B-alayksiköiden antigeeniyksiköiden vastaavasti pienentyessä lopullisessa konjugaatissa.

Immunoinnissa käytettävän rokotteen ominaisuudet

Aikaisemmin on osoitettu, että B-alayksikkö on heikompi antigeeni, kuin LT-holotoksiini, molaarisuuksiin perustuen [Klipstein et al., Infect. Immun., 31:144-150 (1981)], ja alustavat tutkimukset osoittavat, että se on heikompi antigeeni antigeeniyksiköidenkin suhteen, kuin sekä LT-holotoksiini että synteettinen ST. Tämä johti sellaisen rokotteen valikointiin, joka rokote sisältää enemmän B-alayksikön kuin ST:n antigeenisyyttä.

Antigeeni tuotettiin konjugoimalla ST:tä ja B-alayksikköä, niiden välisen alkuperäisen moolisuhteen ollessa 50:1, ja EDAC:in ja konjugaatin välistä suhdetta 1,5:1 käyttäen. Konjugaatti sisälsi 36 % (painosta) ST:tä, johon oli jäänyt 85 % antigeenisyydestä, ja 0,13 % pysyvistä toksisuudesta, ja 64 % (painosta) B-alayksikköä, johon oli jäänyt 89 % sen antigeenisyydestä. Suoraan testattuna (eli näytteinä, joita ei oltu sovitettu sisältämään 100 %:a kutakin toksiinia) rokote sisälsi 37 ST:n ja 59 B-alayksikön antigeeniyksikköä 100 mikrogrammassa, ja sen jäännöstoksisuus oli 0,06 %.

Immunoinnin tulokset

Edellä mainitulla rokotteella immunoiduille rotilla annettiin 1000 mikrogramman primäärinen immunointi ruuansulatuskanavan sisäistä (i.p.) reittiä, jota seurasi kaksi 3000 mikrogramman

suun kautta (p.o.) annettua lisäannosta. Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että tällä tavalla LT:llä immunoiduissa rotissa antitoksiinin responssin sekä suojauksen aste korreloivat koko p.o.-annoksen kanssa [Klipstein et al., Infect. Immunol., 31:144-150 (1981); Klipstein et al., Infect. Immunol., 37:1086-1092 (1982); Klipstein et al., Infect. Immunol., 31:252-260 (1981)]. Tämä immunointitapa johti 2200 ST:n ja 3450 B-alayksikön antigeeniyksikköön.

ST:tä vastaan muodostuneet seerumin IgA-antitoksiinititterit kasvoivat nelinkertaisiksi, ja vastaavat B-alayksikköä vastaan muodostuneet tiitterit kasvoivat viisinkertaisiksi immunoimattomien kontrollirottien arvoihin verrattuna. Sekä ST:tä että B-alayksikköä vastaan muodostuneet mukosaaliset, erittymisen IgA-antitoksiinititterit olivat 7 kertaa suuremmat immunoiduissa rotissa kuin vertailurotissa. Immunoidut rotat olivat merkittävällä tavalla suojatut LT:n tai joko synteettisen tai biologisen ST:n uhkaa vastaan, sekä niiden heterologisten elävien organismien uhkaa vastaan, jotka organismit tuottavat näitä toksineja joko erikseen tai yhdessä, kuten seuraavassa taulukossa 4 on esitetty.

Taulukko 4

Uhan tulokset rotissa, jotka on immunoitu ristisidoksisella ST-B-alayksikön rokotteella

Erityksen aleneminen prosentteina, kun uhkana oli:^a

LT-toksiini	LT ⁺ /ST ⁻	LT ⁺ /ST ⁺	ST(B) toksiini ^b	ST(S) toksiini ^b	LT ⁻ /ST ⁺
94 _{±3}	61 _{±2}	68 _{±2}	97 _{±3}	78 _{±1}	76 _{±2}
0,5 ng ^c	5 ng ^c	5 ng ^c	10 ^{8,d}	10 ^{8,d}	10 ^{8,d}

^aArvot ovat keskiarvoja + keskiarvon standardipoikkeamia.

Enemmän kuin 50 % alentunut erityis edustaa merkittävää (P pienempi kuin 0,001) eroa immunoitujen ja immunoimattomien rottien välillä.

^bST(B) tarkoittaa biologista ST:tä ja ST(S) tarkoittaa synteettistä ST:tä.

^cUhkaavan toksiinin määrä nanogrammoina (ng).

^dUhkaavien organismien lukumäärä.

Ne edellä esitetyt havainnot, että synteettisesti tuotettua, puhdistettua ST:tä voidaan käyttää aikaansaamaan tehokas, ei-toksinen antigeeni, kun se kiinnitetään ristisidoksin LT-toksiinin B-alayksikköön, poistavat turvallisen, käyttökelpoisen rokotteen kehittämisen pääasialliset esteet, joka rokote aikaansaa suojan niitä ETEC-kantoja vastaan, jotka tuottavat joko ST- tai LT-muotoista toksiinia. Aikaisemmat tulokset osoittivat, että puolipuhtaan biologisen ST-valmisteen kiinnittäminen ristisidoksin LT:hen tuotti antigeenin, jossa ST saavutti antigeenisyyttä molekyylipainoltaan suureen LT-molekyyliin tapahtuvan kytkemisen funktiona, ja jossa, konjugointiolosuhteiden ollessa sopivat, suurin osa komponentteina olevien toksiinien antigeenisyydestä säilytettiin, kun taas niiden toksiset ominaisuudet pienenivät huomattavasti [Klipstein et al., Infect. Immunol., 37:550-557 (1981)].

Vaikka biologista ST:tä sisältävä rokote tuottikin huomattavan suojan immunoiduissa eläimissä niiden ETEC-kantojen uhkaa vastaan, jotka kannat tuottivat kumpaa toksiinimuotoa tahansa, niin puolipuhtaan ST-toksiinikomponentin heterogeeninen koostumus esti selvästi sen ihmisiin kohdistuvat sovellutukset. Ne monimutkaiset ja aikaa vievät vaiheet, jotka liittyvät biologisen ST:n jatkokäsittelyyn täysin puhtaan tuotteen saamiseksi, tekevät tämän materiaalin suurimittakaavaisen, kuitenkin teollista mittakaavaa huomattavasti pienemmän tuotannon vaikeaksi. Edellä esitetyt havainnot osoittavat, että synteettisesti tuotetulla ST:llä, jota voidaan helposti tuottaa suuria määriä, saadaan yhtä tehokas rokote aikaan.

Synteettisestä ST:stä peräisin olevien konjugaattien ne reaktio-olosuhteet, jotka tuottavat ST:n suurimman mahdollisen liittymisen kantajaan, sekä jäännösantigeenisyyden että toksiisuuden suhteen optimaaliset ominaisuudet, eroavat niistä olo-

suhteista, jotka aikaisemmin on todettu konjugoitaessa puoli-
puhdasta biologista ST:tä LT:hen. Molemmissa olosuhteissa (1)
konjugoivana reagenssina toimivan karbodi-imidin kriittinen
määrä oli tarpeen ST:n suurimman mahdollisen määrän liittämiseksi
kantajaan, (2) lopullisessa konjugaatissa läsnäolevan ST:n
osuus riippui siitä alkuperäisestä moolisuhteesta, jossa ST:tä
sekoitettiin LT:hen, ja (3) karbodi-imidin ja kumman tahansa
konjugaatissa olevan toksiinin välisen suhteen kohottaminen
johti sekä ristisidotun toksiinin antigeenisyyden että toksi-
suuden portaittaiseen alenemiseen. Puolipuhdaan biologisen
ST:n tapauksessa ne konjugointiolosuhteet identifioitiin, jotka
olosuhteet tuottivat suurimman mahdollisen ST:n määrän liitty-
misen LT:hen, ja jotka samalla säilyttivät suurimman osan mo-
lempien ristisidottujen toksiinien antigeenisyydestä, mutta
alensivat huomattavasti näiden toksiinien toksisuutta.

Näin ei kuitenkaan tapahtunut, kun synteettistä ST:tä konjugoi-
ttiin LT:hen. Synteettisen ST:n suurin mahdollinen kytkeytyminen
LT:hen tapahtui huomattavasti alhaisemmalla karbodi-imidin ja
konjugaatin välisellä suhteella, joissa olosuhteissa tämän kon-
jugaatin LT-jäännöstoksisuus oli niin korkea, ettei sitä voida
sallia. LT:n toksisuuden alentaminen hyväksyttävälle tasolle
saavutettiin ainoastaan sellaisilla karbodi-imidin ja toksiinin
välisillä suhteilla, joissa kummankin ristisidotun toksiinin
antigeenisyydestä menetettiin suuri osa. Nämä havainnot johtivat
tämän vaikeuden kiertämiseen korvaamalla kantajana toimiva LT-
holotoksiini ei-toksisella B-alayksiköllä.

Lopullisessa konjugaatissa, jotka on saatu kiinnittämällä syn-
teettistä ST:tä B-alayksikköön, läsnäolevien kummankin kompo-
nenttitoksiinin antigeenisyyden osaa (antigeeniyksiköissä il-
moitettuna) voidaan vaihdella muuntamalla konjugointireaktioiden
olosuhteita. Täten karbodi-imidin asianmukaisen pitoisuuden
läsnäollessa ST:n ja B-alayksikön välinen, alhainen alkuperäinen
moolisuhde tuotti konjugaatin, jolla oli pääasiallisesti ST-
antigeenisyyttä, kun taas korkea alkuperäinen moolisuhde tuotti
konjugaatin, jossa B-alayksikön antigeenisuus on suurin.

Alustavat havainnot antoivat olettaa, että synteettinen ST on tehokkaampi antigeeni kuin B-alayksikkö. Tämä johti ristisidoksen, karkeasti ottaen yhden kolmasosan ST:n ja kaksi kolmasosaa B-alayksikön antigeenista aktiivisuutta käsittävän antigeenin valintaan rottien immunoinnilla suoritettavaa arviointia varten. Suurina p.o.-annoksina annettuna tämä rokote tuotti vähintään nelinkertaisen seerumin ja mukosaalisen antitoksiinin responssin molempia komponentteina olevia toksiineja vastaan, joten se takasi merkittävän suojan joko ST- tai LT-toksiinin aiheuttamaa uhkaa, sekä niitä heterologisia eläviä bakteereita vastaan, jotka tuottavat jompaa kumpaa toksiinimuotoa.

Koska kaikki ETEC-kannat aiheuttavat ripulia LT- tai ST-toksiinin vaikutuksen seurauksena, joko yksinään tai yhdessä, niin riittävän vahvan antitoksiiniresponssin syntyminen näitä kumpaa-kin toksiinia vastaan saa yhtä tehokkaan suojan aikaan kaikkia ETEC-kantoja vastaan, somaattisesta serotyypistä, spesifisestä fimbriaalisesta antigeenista tai tuotetusta toksiinityypistä riippumatta. Edellä olevassa tutkimuksessa asianlaidan osoitettiin olevan tämä niiden rottien joukossa, jotka oli immunoitu ristisidotulla ST-B-alayksikkörokotteella.

Yksinomaan ruuansulatuskanavan ulkopuolisesti annetulla LT:llä suoritettu immunointi tuotti ainoastaan seerumin IgG-antitoksiiniresponssin, joka sai aikaan ainoastaan väliaikaisen suojan rotissa, kun taas p.o. lisäännoksilla suoritettu immunointi tuotti laajan suojan, mukosaalisen, erittymiseen liittyvän Ig-antitoksiinin muodostumisesta johtuen. [Klipstein et al., Infect. Immun., 37:1086-1092 (1982) ja Klipstein et al., Infect. Immun., 27:81-86 (1982)].

Mukosaaliseen erittymiseen liittyvien IgA-antitoksiinititerien arvot sekä ST:n että B-alayksikön vaikutusta vastaan rotissa, jotka oli immunoitu suun kautta ristisidoksisella rokotteella edellä olevassa tutkimuksessa, ylittivät ne aikaisemmin todetut arvot, jotka ovat välttämättömät kattavan suojan tuottamiseksi

ainoastaan LT:llä immunoiduissa rotissa. Tämä osoittaa sen, että ristisidoksisia rokotteita tulisi antaa ainoastaan p.o.-reittiä. Edellä esitetyt tiedot ovat riittämättömiä sen seikan toteamiseksi, onko ruuansulatuskanavan kautta tapahtuva primäärinen immunointi edellytys myöhemmin suoritettavalle tehokkaalle p.o.-immunoinnille, koska asianlaidan on todettu olevan näin rotissa, jotka oli immunoitu LT:llä [Klipstein et al., Infect. Immun., 31:144-150 (1981); Klipstein et al., Infect. Immun., 37:1086-1092 (1982); ja Klipstein et al., Infect. Immun., 27:81-86 (1980)]⁷, sekä rotissa ja koirissa, jotka oli immunoitu koleratoksoidilla [Pierce et al., Infect. Immun., 21:185-193 (1978); Pierce et al., J. Infect. Dis., 135:888-896 (1977)]⁷.

Lisäyksityiskohtia tässä osassa (III B) esitetystä tutkimuksesta on löydettävissä julkaisusta Klipstein et al., J. Infect. Dis., 147:318-326 (1983)⁷, jonka sisältö täten yhdistetään tähän julkaisuun viittauksella.

C. Synteettisellä ST:llä suoritettavat immunoinnit rotissa;
ST:n ja B-alayksikön immunogeenisyys

Rotat immunoitiin asteittaisilla antigeenin yksikköannoksilla, joko porsaen immunoglobuliiniin G (PIG; Materiaalit ja menetelmät, osa C) kytkettyä B-alayksikköä tai synteettistä ST:tä käyttäen, kuten kuvassa 9 on esitetty. Ne rotat, joille annettiin vaihtelevia annoksia i.p. primääriä immunointia, saivat myös kaikki 1000 antigeeniyksikön muodostamat kaksi p.o. lisäimmunointia, ja ne rotat, jotka saivat p.o. vaihtelevia lisäännoksia, saivat kaikki 200 antigeeniyksikön muodostamat primäärit immunoinnit i.p. ST:llä immunoidut rotat altistettiin ihmisestä peräisin olevan LT⁻/ST⁺-kannan Tx 452 uhalle, ja ne rotat, jotka oli immunoitu B-alayksiköllä, altistettiin ihmisestä peräisin olevan LT⁺/ST⁻-kannan PB 258 uhalle.

Kumman tahansa antigeenin joko i.p. primäärisen immunoinnin tai p.o. lisäännosten antigeeniyksiköiden kasvattaminen sai aikaan antitoksiinitiittereiden samanlaiset lisääntymiset, sekä samankaltaisen lisääntymisen sen suojan laajuudessa, joka suoja

saavutettiin vastaavien organismien aiheuttamaa uhkaa vastaan. Seerumin IgA-antitoksiinititiittereiden arvot kasvoivat suhteellisesti, mutta olivat järjestelmällisesti yhden tai kaksi kertaa pienemmät, kuin mukosaalisen IgA-antitoksiinititiittereiden arvot.

Kumpaakin antigeenia vaadittiin annoksina 100 antigeeniyksikköä i.p.primääriseen immunointiin ja yhteensä 2000 antigeeniyksikköä p.o. lisäannoksiin (eli kumpaakin kaksi 100 antigeeniyksikön lisäannosta) mukosaalisten IgA-antitoksiinititiittereiden vähintään 4-kertaisen lisääntymisen saavuttamiseksi ja merkittävän suojan saavuttamiseksi (eli enemmän kuin 50 % pienentynyt erittyminen) vastaavien, LT:tä tai ST:tä tuottavien kantojen uhkaa vastaan.

Suoja LT⁺/ST⁺-kantaa vastaan

ST:n tai B-alayksikön sen pienimmän antigeeniyksikköjen annoksen määrittämiseksi, joka annos vaaditaan vahvan suojan saavuttamiseksi sekä LT:tä että ST:tä tuottavaa kantaa vastaan, rotat immunoitiin erikseen kummallakin toksiinilla, käyttäen 200 antigeeniyksikön muodostamaa i.p. primääristä immunointia, mitä seurasi vaihtelevien antigeeniyksikköjen annosten muodostamat lisäannokset p.o., ja molemmat altistettiin vastaavien, LT:tä tai ST:tä tuottavien kantojen uhalle, sekä ihmisestä peräisin olevan LT⁺/ST⁺-kannan H 10407 uhalle (kuva 10).

Vahva suoja LT⁺/ST⁺-kantaa vastaan saavutettiin ainoastaan yhteensä 2000 antigeeniyksikön muodostamalla p.o. lisäannoksilla. Kummassakin tapauksessa suojan suuruus LT⁺/ST⁺-kantaa vastaan oli vähemmän kuin sellaista kantaa vastaan, joka kanta tuotti pelkästään yhtä homologista toksiinia.

Rokotteen konjugointiolosuhteet

Edellä esitetyt havainnot osoittavat, että optimaalisen rokotteen tulisi sisältää kummankin toksiinikomponentin yhtäsuuret antigeeniset osuudet. Edellä olevassa osassa B osoitettiin, että pidettäessä karbodi-imidin ja koko konjugaatin välinen

painosuhte vakioarvossa 1,5:1, niin B-alayksikköön sekoitettavan ST:n ja B-alayksikön välisen alkuperäisen moolisuhteen kohottaminen johtaa lopulliseen konjugaattiin, jossa on asteittain enemmän ST:n ja vähemmän B-alayksikön antigeenisyyttä.

Kun ST:n ja B-alayksikön välistä alkuperäistä moolisuhdetta vaihdeltiin arvojen noin 60:1 ja noin 75:1 välillä, niin todettiin, että suhde noin 70:1 johti sellaisen konjugaatin muodostumiseen, joka käsitti 50 paino-% kumpaakin toksiinikomponenttia ja sisälsi 460 ST:n ja 440 B-alayksikön antigeeniyksikköä milligrammassa (kuva 11). Kaikki tässä kappaleessa tarkasteltavat seuraavat konjugaatit valmistettiin tällä tavalla. Viidessä perättäisessä erässä keskimääräinen antigeeniyksiköiden määrä milligrammaa kohden oli 474 ST:lle ja 460 B-alayksikölle, yllä olevia suhteita käyttäen.

Rokotteen ominaisuudet

(i) Immunogeenisyys

Sen seikan varmistamiseksi, että rokotemuotoon ristisidottujen toksiinikomponenttien immunogeenisyys on sama kuin yksittäisten komponenttienkin, rotat immunoitiin i.p. 200 ST-antigeeniyksikön primäärillä immunoinnilla, mitä seurasi ST:n asteittaiset p.o. lisäannokset, jotka annettiin joko rokotteen muodossa tai kytkettynä immunologisesti epäspesifiseen kantajaan FIG. Tulokset on esitetty kuvassa 12. Kuten kuvasta 12 voidaan nähdä, anti-toksiiniresponsi ja suojan suuruus ihmisestä peräisin olevaa LT^-/ST^+ -kantaa vastaan olivat jokseenkin identtiset rotissa, jotka oli immunoitu kummalla tahansa ST-konjugaatin muodolla.

(ii) Toksisuus

Imevissä hiirissä suoritettut kokeet, joissa käytettiin asteittaisia määriä (prosenttinen pitoisuus) joko pelkkää ST:tä tai rokotetta, osoittivat, että rokote sisälsi 0,14 hiiriyksikköä ST-aktiivisuutta mikrogrammaa kohden, joka edusti 0,08 % pelkän ST:n muodostaman 175 hiiriyksikön arvosta mikrogrammaa kohden (kuva 13). Kun joko pelkän ST:n tai rokotteen asteittaisia määriä testattiin rotan ligatoidussa suolisilmukassa, niin

rokotteen ED_{50} -arvo, 2,6 mikrogrammaa, oli 0,08 % pelkän ST:n vastaavasta arvosta 2,0 nanogrammaa (kuva 14). Pelkän B-alayksikön ED_{50} -arvo oli 95 nanogrammaa ligatoiduissa suolisilmukoissa, joka on 0,2 % LT-holotoksiinin vastaavasta arvosta 0,19 nanogrammaa. Se, johtuiko tämä erittämisaktiivisuus B-alayksiköstä itsestään, vai LT:n aiheuttaman, vähäisen mutta huomattoman kontaminoinnin ilmenemisestä, on epäselvää.

Sen seikan selvittämiseksi, myötävaikuttiko B-alayksikkökomponentti rokotteen aiheuttamaan erittämisen jäännösaktiivisuuteen rotan ligatoidun suolisilmukan kokeessa, rokotteen asteittaiset annokset testattiin B-alayksikön (tai LT-kontaminantin) lämmöllä aikaansaadun inaktiivoinnin jälkeen, joka inaktiivointi suoritettiin $65^{\circ}C$:ssa 1 tunnin pituisen ajan. Erittämisen responssi lämmitettyyn ja lämmittämättömään rokotteeseen oli sama, eli B-alayksiköllä ei ole merkitystä tässä responssissa. Nämä havainnot osoittavat, että kutakin komponenttitoksiinia 1000 antigeeniyksikköä sisältävä rokoteannos käsittäisi vaimentamattoman ST:n 1,7 mikrogramman ekvivalenttimäärän.

(iii) Suoja ihmisestä ja porsaasta peräisin olevia kantoja
vastaan

Rotat immunoitiin primäärillä i.p. immunoinnilla, kumpaakin komponenttitoksiinia 200 antigeeniyksikköä sisältävällä rokotteella, ja kahdella p.o. lisäannoksella, joissa kummassakin oli 1000 antigeeniyksikköä kumpaakin toksinikomponenttia. Tämä kohotti molempien toksinikomponenttien aiheuttamien seerumin IgA-antitoksiinititiittereiden muodostumisen 3-kertaiseksi ja ST:n aiheuttamien mukosaalisten IgA-antitoksiinititiittereiden muodostumisen 5-kertaiseksi ja B-alayksikön aiheuttamien vastaavien tiittereiden muodostumisen 6-kertaiseksi. Immunoidut rotat olivat merkittävästi suojatut (P pienempi kuin 0,001) niitä eläviä, ihmisestä tai porsaasta peräisin olevia kantoja vastaan, jotka kannat tuottavat LT- tai ST-toksiinia, erikseen tai yhdessä kuten seuraavassa taulukossa 5 esitetään.

Taulukko 5

Uhan tulokset rotissa, jotka oli immunoitu ristisidoksisella rokotteella

Lähde	Toksisuus	Kanta	Serotyyppi	% alentunut erityys
Ihminen	LT ⁺ /ST ⁻	PB 257	O15:H ⁻	74 $\pm$ 1
Porsas	LT ⁺ /ST ⁻	P 263	O8:H19	72 $\pm$ 3
Ihminen	LT ⁺ /ST ⁺	H 10407	O78:H11	61 $\pm$ 1
Porsas	LT ⁺ /ST ⁺	P 1362	O149:H? ^b	73 $\pm$ 2
Ihminen	LT ⁻ /ST ⁺	Tx 452	O78:H12	79 $\pm$ 2
Porsas	LT ⁻ /ST ⁺	P 987	O9:H ⁻	81 $\pm$ 2

^aKeskiarvo $\pm$ keskiarvon standardipoikkeama, alentunut erityys prosentteina immunoiduissa rotissa, verrattuna vastaaville uhille alttiiksi saatettuihin immunoimattomiin eläimiin. 50 % suuremmat arvot edustavat merkittävää (P pienempi kuin 0,001) eroa ryhmien välillä.

^bTämän serotyypin täydellinen identifiointi on epävarmaa.

Rottien lisäryhmälle annettiin ruuansulatuskanavan ulkopuolisesti primäärinen immunointi ihonalaisesti (s.c.), käyttäen alumaa apuaineena, tavalla joka on esitetty edellä LT-immunoinnille [Klipstein et al., Infect. Immun., 37:1086-1092 (1982)]. Koska tämän tavan on todettu vaativan kaksinkertaisen annoksen i.p.-reittiin verrattuna tehokkaan primäärisen LT-immunoinnin aikaansaamiseksi, niin s.c. annetun rokotteen annostus kohotettiin kaksinkertaiseksi 400 antigeeniyksikköön; p.o.-annostus oli muuttumaton, eli 1000 antigeeniyksikköä. Tämä sai molempien toksinikomponenttien aiheuttamien mukosaalisten IgA-antitoksiinititeittareiden vähintään 5-kertaisen muodostumisen aikaan, sekä tuotti merkittävän suojan uhkaa vastaan, erittymisen ollessa pienentynyt 77 $\pm$ 3 %:a ihmisestä peräisin olevaa LT⁺/ST⁻-kantaa vastaan, ja 71 $\pm$ 2 %:a ihmisestä peräisin olevaa LT⁻/ST⁺-kantaa vastaan.

Edellä olevat tulokset osoittavat, että tällä tavalla arvioitaessa, Klipstein et al., Infect. Immun., 31:144-150 (1981) synteetisestisesti tuotetun ST:n antigeenisuus on jokseenkin sama kuin B-alayksikön. Olennaista tässä vertailussa oli konjugoidun toksiininn annostuksen ilmoittaminen antigeeniyksiköillä, pikemminkin kuin painoon perustuen.

Tämä tieto johti niiden konjugointiolosuhteiden muuntamiseen, joita olosuhteita aiemmin oli käytetty yhdistettäessä synteettistä ST:tä B-alayksikköön ristisidoksin, edellä oleva kappale B, sellaisen rokotteen tuottamiseksi, joka sisältää ST:tä ja B-alayksikköä samanlaisissa antigeenisissä suhteissa. Rokotemuodossa olevan synteettisen ST-komponentin antigeenisyyden osoitettiin olevan identtinen tämän toksiininn antigeenisyyden kanssa, kun toksiininn annettiin kytkettynä epäspesifiseen immunoglobuliinikantajaan. Rottien immunointi rokotteella, jota annettiin sellaisina antigeenin yksikköannoksina, jotka oli todettu tehokkaiksi kummallekin erikseen annettavalle komponenttitoksiinille, sai aikaan voimakkaan antitoksiiniresponssin kummallekin komponenttitoksiinille, sekä tuotti merkittävän suojan LT:tä tai ST:tä yhdessä tai erikseen tuottavia, eläviä ETEC-kantoja vastaan. Ne havainnot, jotka on saatu immunoitaessa kummallakin erikseen annetuilla toksiinikomponentilla, osoittivat, että rokotteella saatava suoja LT^+/ST^+ -kantaa vastaan aiheutui molemmista toksiinikomponenteista.

Frantz ja Robertson ovat esittäneet, että porsaan ST:n antiseerumit reagoivat sellaisen ST:n kanssa, joka on peräisin porsaan, härän ja ihmisen ETEC-kannoista [Infect. Immun., 33:193-198 (1981)]. Edellä esitetyt tulokset osoittavat, että kattava suoja saavutetaan immunoitaessa kummalla tahansa toksiinilla sen alkuperästä huolimatta. Täten immunointi sellaisella ristisidotulla rokotteella, joka sisältää porsaan LT:stä peräisin olevaa B-alayksikköä sekä ihmisen ST:n rakenteeseen perustuvaa synteettistä ST:tä, tuotti yhtä voimakkaan suojan ihmisen ja porsaan LT:tä ja ST:tä tuottavia kantoja vastaan.

Edellä olevassa tutkimuksessa immunointi annettiin ruuansulatuskanavan ulkopuolisena primäärinä immunointina, mitä seurasivat p.o. lisäannokset, koska aikaisemmin rottaeläinmallissa todettiin että (1) ruuansulatuskanavan ulkopuolisesti tapahtuva esikäsitteily on edellytyksenä erittäin tehokkaalle p.o. lisäannosimmunoinnille, (2) ainoastaan p.o.-immunointi sai aikaan mukosaaalisia IgA-antitoksiinititiitereitä, ja (3) laajaa suojaa saadaan aikaan ainoastaan annettaessa riittäviä p.o.-annostuksia kohottamaan mukosaalisten IgA-tiittereiden muodostumisen vähintään 4-kertaiseksi. Immunointi ristisidoksisella rōkotteella tätä tapaa käyttäen aiheutti näiden molempien komponenttitoksiinien mukosaalisten IgA-antitoksiinititiittereiden suuruusluokan kasvamisen. Ihonalainen reitti (s.c.) ja aluma-apuaine osoittautuivat olevan yhtä tehokkaita immunoinnissa.

Tässä kappaleessa (III C) esitettyjen tutkimusten lisäyksityiskohtia on löydettävissä julkaisusta Klipstein et al., Infect. Immun., 40:924-929 (1983), jonka sisältö täten liitetään oheiseen hakemukseen viitteellä.

D. Synteettisellä ST:llä suoritettu immunointi rotissa ja jäniksissä

Edellä esitetyt tulokset (osa III C) saatiin rotissa i.p. immunointeja käyttäen, mitä seurasivat p.o. lisäannokset. Seuraavassa esitetyt tulokset saatiin sekä rotissa, että jäniksissä käytettäessä suun kautta tapahtuvaa antamista sekä primääriin että lisäannoksella suoritettuihin immunointeihin.

Jäljempänä esitetyt tulokset osoittavat, että suun kautta tapahtuva immunointi on yhtä tehokasta, kuin i.p. reittiä tapahtuvakin. Lisäksi havaitaan, että rokote ei aiheuttanut ripulia missään eläimessä p.o. reittiä annettaessa, eikä se aiheuttanut nesteen erittymistä tiputettuna jäniksen ligatoituihin suolisilmukoihin.

Rottakokeet(i) i.p./p.o. immunointi

Rotat saivat primäärin immunoinnin 200 AU:lla (antigeeniyksiköllä, katso Materiaalit ja menetelmät, osa IV D) rokotteessa, joka annettiin i.p. Freund'in täydellisen apuaineen (FCA) kanssa, mitä seurasi kulloinkin kaksi 1000 AU:n lisäannosta. Tämä annostus valittiin, koska sen on osoitettu (osa C; edellä) olevan pienin mahdollinen määrä, joka on välttämätön merkittävän suojan (P pienempi kuin 0,001) aikaansaamiseksi niitä elävien kantojen uhkia vastaan, jotka kannat tuottavat jompaa kumpaa toksiinimuotoa. Tämä immunointi sai aikaan 4-kertaisen kasvun seerumissa, ja vähintään 6-kertaisen kasvun rokotteen kummankin toksiinikomponentin mukosaalisten antitoksiinitite-
reiden muodostumisessa (taulukko 6, jäljempänä), ja se tuotti suojakertoimen (PI) arvoksi 3,4 LT:n aiheuttamaa uhkaa vastaan, ja 4,0 ST:n aiheuttamaa uhkaa vastaan (kuva 15).

Taulukko 6

Antitoksiiniresponsi ja suojauksen aste immunoiduissa rotissa

Immunointi- reitti	<u>B^a:n antitoksiini</u>		<u>ST:n antitoksiini</u>		<u>PI</u>	
	<u>Seerumi</u>	<u>Mukosaali</u>	<u>Seerumi</u>	<u>Mukosaali</u>	<u>vs LT</u>	<u>vs ST</u>
i.p./p.o.	4	6	4	7	3,4	4,0

^aArvot ovat tiitterin geometrinen keskiarvojen käänteislukujen kasvuja, immunoituja eläimiä kontrollieläimiin verrattaessa.

^bPI = suojaindeksi.

(ii) Muita immunointiyrityksiä

Muiden ruuansulatuskanavan ulkopuolisten reittien, apuaineiden ja p.o. jakamisjärjestelmien tehokkuuden selvittämiseksi, kulloinkin neljän rotan muodostamille lisäryhmille annettiin primääri immunointi rokotteen 400 AU:lla ihonalaisesti (s.c.), alumaa apuaineena käyttäen, ja joka oli valmistettu tavalla, joka on aikaisemmin esitetty julkaisussa [Klipstein et al., Infect. Immun., 37:1086-1092 (1982)]; tätä seurasivat kaksi p.o. lisäannosta, joista kumpikin oli 1000 AU:n suuruinen, ja jotka annet-

tiin joko 2 tuntia p.o. simetidiinin jälkeen tai pH-riippuvaisten mikropisaroiden muodossa, ilman simetidiini-esikäsitteilyä. Kun uhkaaminen suoritettiin LT^-/ST^+ -kannalla Tx 452, niin kummallakin näistä vaihtoehtoista immunointitavoista saatiin sama merkittävästi (P pienempi kuin 0,001) pienentynyt erittymisaste, kuin mikä saatiin käyttämällä FCA:ta i.p. reittiä, mitä seurasivat simetidiinin jälkeen annetut p.o. lisäännokset. Nämä tulokset on esitetty taulukossa 7, seuraavassa.

Taulukko 7

Rokotteen vaihtoehtoisten reittien, apuaineiden ja jakamisjärjestelmien tehokkuus rotissa

Primäärinen	Lisäännos	Suoja
<u>Reitti/Apuaine</u>	<u>Reitti/Suoja</u>	<u>vs LT^-/ST^+^a</u>
i.p./FCA	p.o./simetidiini	79 $\pm$ 2
s.c./aluma	p.o./simetidiini	71 $\pm$ 2
s.c./aluma	p.o./mikropisarat	67 $\pm$ 2

^a Keskiarvo $\pm$ keskiarvon standardipoikkeama, alentunut erityisprosentteina immunoiduissa eläimissä, verrattuna vastaavan uhan alaisiin immunoimattomiin vertailueläimiin. 50 % suuremmat arvot edustavat merkittävää (P pienempi kuin 0,001) eroa kahden ryhmän välillä.

Jäniskokeet

(i) i.m./p.o. immunointi

Neljälle jänikselle annettiin primääri immunointi 500 AU:lla rokotteessa, joka annettiin lihakseen (i.m., FCA:n kanssa, mitä seurasi kaksi kulloinkin 1000 AU:n suuruista p.o. lisäännosta. Tämä sai aikaan 5-kertaisen lisääntymisen rokotteen kummankin komponentin aiheuttaman seerumin, ja 4-kertaisen lisääntymisen mukosiaalisten antitoksiinititeittiereiden muodostumisessa. PI-arvot olivat suurempia kuin 9 sekä LT:n että ST:n uhkaa vastaan. Nämä tiedot on esitetty kuvassa 16, sekä seuraavassa taulukossa 8.

Taulukko 8

Antitoksiiniresponsi ja suojausaste immunoiduissa rotissa

Immunoinnin reitti	B ^a :n antitoksiini		ST:n antitoksiini		PI	
	Seerumi	Mukosaali	Seerumi	Mukosaali	vs LT	vs ST
i.m. ^c /p.o.	5	4	6	4	9,3	10,0
p.o./p.o.	3	5	2	4	8,6	8,1

^aArvot ovat tiitterin geometrinen keskiarvojen käänteislukujen kasvuja, immunoituja eläimiä kontrollieläimiin verrattaessa.

^bPI = suojausindeksi.

^ci.m. = lihaksen sisäinen.

(ii) p.o./p.o. immunointi

Neljälle jänikselle annettiin immunointi 1000 AU:lla rokottees-
sa, jota annettiin p.o. kolmeen otteeseen. Tämä sai aikaan 4-
kertaisen kasvun mukosaalisten, mutta ei seerumin, antitoksiini-
tiittereiden muodostumisessa, ja aiheutti vahvan suojan, PI-
arvojen ollessa yli 8, kummankin toksiinimuodon aiheuttamaa
uhkaa vastaan. Nämä tulokset on myös esitetty edellä olevassa
taulukossa 8.

Rokotteen toksisuus

Aikaisemmat tulokset (osa III C) ovat osoittaneet, että rokot-
teessa olevan ST-komponentin toksisuus on pienentynyt 0,15
%:iin vaimentamattoman toksinin toksisuudesta. 1000 AU:n roko-
teannos sisältäisi täten vaimentamattoman ST:n 1,7 mikrogrammaa
vastaavan ekvivalenttimäärän (0,15 % kertaa 50 % ST-komponentin
2,2 milligrammasta). Tämän rokoteannoksen toksisuus, sekä suu-
rempien vaimentamattomien ST-määrien toksisuus arvioitiin immu-
noimattomissa eläimissä. (i) Kahdeksalle jänikselle ja 20
rotalle p.o. annetut 1000 AU:n rokoteannokset eivät tuottaneet
mitään negatiivisia vaikutuksia, kuten ripulia, ja tämän rokote-
annoksen tiputtaminen kahden jäniksen neljään ligatoituun suoli-
silmukkaan ei tuottanut minkäänlaista nestereaktiota. (ii) Vai-
mentamattoman ST:n 250 mikrogramman p.o. antaminen kahdelle

jänikselle ja rotalle ei aiheuttanut ripulia. Vaimentamattoman ST:n 25 mikrogramman tiputtaminen ei aiheuttanut minkäänlais-ta nesteen erittymistä neljän jäniksen ligatoiduissa suolisilmu-koissa; 50 mikrogramman annos vaadittiin tuottamaan positiivi-seksi neste:pituussuhteeksi $1,1 \pm 0,3$ (keskiarvo $\pm$ standardi-poikkeama).

Edellä olevan tutkimuksen tulokset osoittivat tämän keksinnön mukaisesta synteettisestä ST:stä valmistetulla rokotteella suoritettujen immunointien tehokkuuden kokeellisessa eläin-mallissa, eli jäniksissä, sekä lisäksi rotissa. Molemmissa eläinmalleissa saavutettu suoja osoitettiin ligatoitua suoli-silmukkatekniikkaa käyttäen. Tämän tekniikan soveltuvuus sel-laisissa olosuhteissa suoritettuun suojaamiseen, joissa oloissa koko ehyen suoliston pintaan E.coli:n enterotoksiiniset kannat ovat akuutisti muodostaneet pesäkkeitä, on osoitettu LT:llä immunoiduilla rotilla [Klipstein et al., Infect. Immun., 28:163-170 (1980)].

Primäärisen, ruuansulatuskanavan ulkopuolisen immunoinnin jäl-keen annettu sama rokoteannos (1000 AU) p.o. johti huomatta-vasti voimakkaampaan suojauksen asteeseen, kuin mitä PI-arvot osoittivat, sekä jäniksissä että rotissa. Tämä ero voi osittain johtua jäniksiin annettujen immunointien pitemmistä väleistä (14 vuorokautta, vastaava aika rotilla oli 4 vuorokautta), sekä toksiiniuhan herkkyyden eroista. Se osoittaa myös toden-näköisesti sen, että jänikset reagoivat helpommin rokotteella suoritettuun immunointiin kuin rotat. Tämä annos oli se pienim-mäksi todettu annos, joka vaadittiin merkittävän suojan aikaan-saamiseksi rotissa eläviä enterotoksigeenisia kantoja vastaan (osa C, supra).

Se seikka, että tämä annostus oli myös tehokas voimakkaan suojan aikaansaamisessa suuremmisakin koe-eläimissä, osoittaa rokot-teen hyödyllisyyttä eläintaloudessa sekä ihmisissä. Tämä on nähtävissä myös Svennerholmin et al. havainnoista, joissa

todettiin, että koleratoksiinin B-alayksikön 500 mikrogramman immunointiannostus p.o. on riittävä aiheuttamaan merkittävää suoliston IgA-antitoksiinin responssia vapaaehtoisissa ihmisissä kokeiltuna [Lancet, 1:305-308 (1982)].

Edellä esitetyn tutkimuksen tulokset osoittavat, että pelkästään synteettisellä ST-B-rokotteella jäniksissä p.o. suoritettu immunointi johti samaan voimakkaaseen suojan asteeseen, kuin mikä saavutettiin p.o. lisäännosimmunoinneilla, joita seurasi ruuan-sulatuskanavan ulkopuolinen primäärinen immunointi.

Tässä kappaleessa (III D) esitettyjen tutkimusten lisäyksityiskohtia on löydetävissä julkaisusta Klipstein et al., *Infect. Immun.*, 40:888-893 (1983), jonka sisältö liitetään oheiseen tekstiin viittauksella.

E. Yleisreaktiivisuus Klebsiella - ST-enterotoksiinilla

Lastentarhalapsien joukossa esiintyvän ripuliepidemian aiheuttajaksi on todettu Klebsiella pneumoniae. Useiden Klebsiella-kantojen enterotoksigeenisuus on todettu soluttomilla viljelysuodoksilla suoritetuilla kokeilla jäniksen suolisilmukassa, Y1-lisämunaissolussa tai kiinanhamsterin munarauhaskudoksen viljelykokeilla lämpölabiilia toksinia (LT) käytettäessä, sekä imevän hiiren kokeessa, edellä, lämpöstabiilia toksinia (ST) käytettäessä. Näissä kokeissa tunnistettuja Klebsiellan LT- ja ST-enterotoksiineja ei ole puhdistettu, ja niiden sekä E.coli:n tuottamien samankaltaisten toksiinien välisiä eroja ei tunneta.

Julkaisussa Klipstein et al., *J. Infect. Dis.*, 42:838-841 (1983) viitataan Klebsiella-ST-toksiinia puhdistettaessa sen ilmeiseen homogeenisyyteen, ja immunologisen samankaltaisuutensa puolesta E.coli:n ST:hen. Tämän julkaisun sisältö liitetään oheiseen hakemukseen viittauksella.

Luonnolliset enterotoksiinit saatiin Klebsiella-kannoista TS 9 (serotyyppi 19), ne eristettiin puertoricolaisen trooppista

rasvaripulia sairastavan potilaan ohutsuolesta, jonka viljelysuodoksien oli jo aikaisemmin osoitettu tuottavan positiivisen responssin imevän hiiren kokeessa, ja niitä saatiin myös E.coli:n kannasta 18 D (O42:H47), joka on ainoastaan ST:tä tuottava kanta, joka eristettiin akuuttia ripulia sairastavan lapsen ulosteesta. Toksiinit puhdistettiin menetelmällä, joka on esitetty julkaisussa Staples et al., J. Biol. Chem., 255:4716-4721 (1980), ihmisestä peräisin olevan E.coli-kannan 18 D ST:n puhdistamiseksi.

Puhdistukseen käytettyjen kolmen kromatografisen peräkkäisen erotustoimenpiteen jälkeen tuloksena oleva toksiini oli puhdistunut 148-kertaiseksi alunperin saatuun materiaaliin verrattuna, ja puhdistetulla materiaalilla suoritettu ohutkerroskromatografia antoi ainoastaan yhden vyöhykkeen. Puhdistettu Klebsiella-ST oli E.coli-ST:n kanssa yhtä tehokasta imevän hiiren kokeessa, tässä kokeessa esiintyvien kokeellisten vaihtelujen puitteissa. Lisäksi Klebsiella-ST:n käsittely 5×10^{-4} molaarisella ditio-treitolilla 60 minuutin ajan tuhosi sen eritysaktiivisuuden imevän hiiren kokeessa, mikä tapahtui myös E.coli-ST:llä. Edellä olevassa kappaleessa III A, jäljempänä olevassa kappaleessa IV A ja julkaisussa Klipstein et al., Infect. Immun. 39:117-121 (1983) esitettyä kaksoiskerros-ELISA-tekniikkaa käyttäen Klebsiella-ST:n antigeenisuus todettiin olevan 69 %. E.coli-ST:n antigeenisyydestä.

E.coli-ST:n ja Klebsiella-ST:n välisistä funktionaalisista yhtäläisyyksistä johtuen oli mielenkiintoista todeta, tarjoaisiko E.coli-ST:tä vastaan tehokas rokote myös suojan Klebsiella-ST:tä vastaan. Näissä immunoinneissa käytettiin edellä kappaleessa III D kuvattua rokotetta, joka sisälsi E.coli-LT:n B-alayksikön ja synteettisen ST:n välistä konjugaattia.

150-175 gramman painoisille Sprague-Dawley-rotille annettiin primääri immunointi rokotteella, joka sisälsi 200 antigeeniyksikköä sekä ST:tä että LT:n B-alayksikköä vatsaontelon sisäisesti,

Frend:in täydellisen apuaineen kanssa. Tätä seurasivat neljän vuorokauden välein kaksi suun kautta annettua lisäannosimmunointia kulloinkin 1000 antigeeniyksiköllä, jotka annettiin kaksi tuntia suun kautta annetun simeedeinin (TAGAMET[®], saatavana lähteestä Smith Kline and French Laboratories, Carolina, Puerto Rico) jälkeen, jonka simeedeinin annostus oli 50 milligrammaa ruumiin painokiloa kohden vatsanesteiden erittymisen poistamiseksi.

Neljästä kuuteen vuorokautta lopullisten lisäannoksilla suoritettujen immunointien jälkeen immunoimattomat ja immunoidut rotat altistettiin ST-toksiinin uhalle tiputtamalla tätä toksiinia 18 tunnin ajan ligatoituihin suolisilmukoihin, kuten edellä olevassa kappaleessa III D, kappaleessa IV D sekä julkaisussa Klipstein et al., Infect. Immun., 40:888-893 (1983) on esitetty. Kunkin päivän neste-erityksen arvo (esitetty keskiarvona $\pm$ keskiarvon standardipoikkeama) saatiin neljän tai viiden immunoidun rotan ja viiden vertailurotan uhan avulla. Suojaindeksi (PI) määritettiin jakamalla se immunoiduissa eläimissä oleva toksiiniannostus, joka tuotti saman erittymisen kuin 50 %:sesti tehokas annos (ED_{50}) immunoimattomissa rotissa, immunoimattomien eläinten arvolla.

Tämän määrittelyn tulokset on esitetty graafisesti kuvassa 18, jossa immunoiduissa rotissa E.coli:n ST:llä aikaansaadun uhan tiedot ovat samat kuin ne, jotka on esitetty kuvassa 15 olevien käyrien alaosassa, kun taas Klebsiella-ST:llä aikaansaatuun uhkaan viittaavat tiedot ovat tässä tutkimuksessa tuotettuja. Kuten voidaan nähdä, suojaindeksi PI E.coli:n ST:n aiheuttamaa uhkaa vastaan oli 4,0, kun taas PI Klebsiella-ST:n aiheuttamaa uhkaa vastaan oli 2,6. Kuvan 18 käyrässä esitetyt tulokset osoittavat, että tämän keksinnön mukaista konjugoitua synteettistä ST:tä sisältävä rokote aikaansaa myös jonkinlaista suojaa Klebsiella pneumoniae-bakteerin tuottamaa ST-enterotoksiinia vastaan.

IV. Materiaalit ja menetelmät monomeeriselle ST:lle

Osa A

Enterotoksiinin tuotanto

Tässä sekä kussakin seuraavassa kirjaimella varustetussa kappa-
leessa käytetyn synteettisen ST:n täydellinen synteessimenetelmä
ja puhdistaminen on esitetty yksityiskohtaisesti osassa II.

Biologinen ST puhdistettiin homogeeniseksi kannan 18D viljely-
suodoksesta Staples:in et al., supra, esittämien menetelmien
muunnoksella [Klipstein et al., Infect. Immun., 37:550-557 (1982)]⁷.
Toksiinimäärät perustuivat niiden proteiinipitoisuuteen, joka
määritettiin menetelmällä, joka on esitetty julkaisussa Lowry
et al., J.Biol.Chem., 193:265-275 (1951).

Erittämistehon koe

Asteittaisten toksiiniannostusten kyky aiheuttaa erityistä tes-
tattiin imevän hiiren kokeella ja rotan ligatoidun suolisilmukan
kokeella, julkaistua menetelmää käyttäen [Giannella, Infect.
Immun., 14:95-99 (1976) ja Klipstein et al., Infect. Immun.,
34:637-639 (1981)]⁷. Imevän hiiren kokeessa yksi hiiriyksikkö
(MU) määritellään sinä toksiinimääränä, joka tuottaa suolisto-
ruumiin painosuhteeksi vähintään 0,083.

Hyperimmuunin antiseerumin tuotanto

Hyperimmuunia antiseerumia muodostui vuohiin ja jäniksiin biolo-
gisen ST:n aiheuttamana, kuten aiemmin on esitetty [Klipstein
et al., Infect.Immun., 37:550-557 (1982)]⁷. Synteettistä ST:tä
kytkettiin porsaen immunoglobuliiniin G (PIG) sekoittamalla
ST:tä PIG:iin moolisuhteessa 100:1, käyttäen 1-etyyli-3-(3-
dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidin ja koko konjugaattiprotei-
nin välisenä painosuhteena arvoa 2:1, 0,1-molaarisessa fosfaat-
tipuskurissa, pH 7,0, 18 tunnin ajan, 4°C:ssa. Tämä konjugaatti
sisälsi 47 paino-% ST:tä ja 73 mooli-% ST:tä. Konjugoitu ST
säilytti 73 % antigeenisyydestään, mikä määritettiin entsyymiin
sidotun immunosorbentin kokeella (ELISA), biologista ST:tä
vastaan muodostunutta vuohen ja jäniksen hyperimmuunia antisee-
rumia käyttäen, aikaisemmin esitetyllä kaksoiskerrostekniikalla

/Klipstein et al., Infect.Immun., 37:550-557(1982)/. Konjugaatti sisälsi täten 343 antigeeniyksikköä (laskettu kertomalla läsnäolevan ST:n painoprosenttiosuus antigeenisyytensä prosenttisuudella) proteiinimilligrammaa kohden. Eläimet immunoitiin lihaksen sisäisesti Freund:in täydellisellä apuaineella (FCA) primäärissä immunoinnissa, ja lisäännoksilla suoritettussa immunoinnissa Freund:in epätäydellisellä apuaineella, jota annettiin kuukausi myöhemmin. Vuohet saivat 1100, sitten 2300 ST-antigeeniyksikköä, ja jänikset saivat 300, sitten 500 ST-antigeeniyksikköä.

Rottien immunointi ja uhalle alistaminen

Emostaan vieroitetut Sprague-Dawley-rotat immunoitiin synteettisellä ST-PIG-konjugaatilla, vatsakalvon sisäisellä primäärillä immunoinnilla, 350 ST-antigeeniyksikköä käyttäen, jotka annettiin yhdessä Freund:in täydellisen apuaineen kanssa, mitä seurasivat neljän vuorokauden välein kaksi suun kautta annettua lisäännosten immunointia, jotka kummatkin lisäännokset sisälsivät 700 ST-antigeeniyksikköä, jotka annettiin kaksi tuntia suun kautta annetun simetidiiniannoksen jälkeen, mitä simetidiiniä annettiin vatsan happoisuuden poistamiseksi. Viisi vuorokautta viimeisten lisäännosten jälkeen ne alistettiin uhalle tiputtamalla 18 tunnin ajan ainoaan ligatoituun suolisilmukkaan pitoisuuksia, jotka immunoimattomissa rotissa saavat aikaan suurimman mahdollisen erityksen: 5 nanogrammaa joko synteettistä tai biologista ST:tä, sekä 0,1 millilitraa kasvatusviljelmää, joka sisälsi 10^9 elävää, ST:tä tuottavan, ihmisestä peräisin olevan E.coli:n kannan Tx 453 (O78:H12) organismia millilitrassa. Viisi immunoimatonta ja kolme immunoitua rottaa uhattiin kullakin koe-materiaalilla. Arvot on ilmoitettu keskiarvoina $\pm$ keskiarvon standardipoikkeama, erityksen alenemisprosentteina immunoiduissa rotissa, verrattuna vastaaviin immunoimattomien kontrollirottien arvoihin; kussakin tapauksessa enemmän kuin 50 % alentunut erityys tarkoittaa merkittävää eroa (P pienempi kuin 0,001) noiden kahden ryhmän välillä, mikä määritettiin Student:in t -testillä kahdelle riippumattomalle keskiarvolle.

Antitoksiiniresponsi immunoinnille

Uhan hetkellä seerumi- ja mukosaaliniteet käsiteltiin, kuten aikaisemmin on esitetty [Klipstein et al., Infect. Immun., 37: 1086-1092 (1982)], ja ne testattiin kaksoiskerros-ELISA-tekniikalla, jossa synteettisen ST:n aiheuttamaa vuohen hyperimmuunia antiseerumia käytettiin kiinteänä faasina, ja synteettistä ST:tä käytettiin antigeenina. Klipstein et al., Infect. Immun., 37:1086-1092 (1982) on todennut, että samalla tavalla immunoiduissa rotissa voidaan havaita ainoastaan immunoglobuliinin G (IgG) seerumin antitoksiinia sekä immunoglobuliinin A (IgA)-luokan mukosaalista antitoksiinia; täten synteettisen ST:n antitoksiini arvioitiin vain näille kahdelle immunoglobuliiniluokalle, jäniksen anti-rotta-IgG:tä käyttäen yhdessä vuohen anti-jänis-antiseerumin kanssa, jotka oli konjugoitu alkaliseen fosfataasiin seeruminäytteitä varten, sekä vuohen anti-rotta-eritys-IgA:ta yhdessä jäniksen anti-vuohi-anti-seerumin kanssa, jotka oli konjugoitu alkaliseen fosfataasiin (Miles Research Laboratories, Elkhart, Indiana) mukosaalisia näytteitä varten. Esitetyt arvot on saatu geometrinen keskiarvon tiitterillä 9 immunoidussa ja 5 immunoimattomassa vertailurotassa.

Osa B

Enterotoksiinivalmisteet

Puhdistettua holotoksiinia valmistettiin menetelmällä, joka on esitetty julkaisussa Clements and Finkelstein, Infect. Immun., 24:760-769 (1979), E.coli:n kannasta 711 (FlLT), joka on transformoitu K-12-johdannainen, joka kantaa porsaan kannasta P307 peräisin olevan Ent-plasmidin LT-geeniä (-geenejä). B-alayksikkö erotettiin LT-holotoksiinista kromatografisilla menetelmillä, jotka on esitetty julkaisussa Clements et al., Infect. Immun., 29:91-97 (1980). LT-toksiinin ja sen B-alayksikön homogeenisuus todettiin polyakryyliamidilla suoritettulla geelielektroforeesilla, kuten on esitetty edellä mainitussa Clements'in ja Finkelstein'in julkaisussa.

Ihmisen E.coli-kantaa 18D (O42:H47) kasvattamalla saatua biologista ST:tä puhdistettiin menetelmillä, jotka on esitetty edellä mainitussa Staples:in et al. julkaisussa, kuitenkin sellaista muunnelmaa käyttäen, että lopullinen homogeeniseksi puhdistaminen saavutettiin eluoimalla ohutkerroskromatografisesti, kuten on esitetty julkaisussa Klipstein et al., Infect. Immun., 37:550-557 (1982). Synteettistä ST:tä, joka koostuu siitä samasta 18 aminohapon järjestyksestä, minkä Chan et al., supra, esittivät puhtaalle, kantaa 18D kasvattamalla saadulle ST:lle, valmistettiin Beckman:in peptidisyntetisaattorin mallia 990 B (Beckman Instruments Co., Irvine, CA) käyttäen menetelmillä, jotka on esitetty osassa II. Synteettisen toksinin osoitettiin olevan jokseenkin identtistä viljelymenetelmällä saadun (biologisen) toksinin kanssa, erittämistehokkuuden suhteen imevän hiiren kokeessa, sekä antigeenisyyden suhteen, mikä määritettiin entsyymisidotun immunoabsorbenttin kokeella (ELISA) sekä eritysaktiivisuuden seroneutraloitumisella imevän hiiren kokeessa, käyttäen joko synteettisen tai biologisen toksinin aiheuttamaa hyperimmuunista antiserumia, kuten edellä olevassa osassa III on esitetty.

Käytetyn toksinin painona ilmoitettu määrä perustui proteiinipitoisuuksiin, jotka määritettiin Lowry:n et al., supra, menetelmällä. Mooliekvivalentit laskettiin LT:lle julkaistusta molekyylipainon arvosta 91 450 daltonia Clements et al., Infect. Immun., 29:91-97 (1980), polymeeriselle 5 B-alayksikölle julkaistusta arvosta 57 400 Gill et al., Infect. Immun., 33:677-682 (1981), sekä ST:lle Staples:in et al., supra, julkaisemasta arvosta 1972 daltonia.

ST:n merkitseminen radioaktiivisella jodilla

Synteettinen ST merkittiin radioaktiivisella jodilla kloramiini-T-menetelmällä, joka on esitetty julkaisussa Hunter, Proc. oc. Exp. Biol. Med., 133:989-992 (1970) käyttäen toimenpiteitä, jotka aikaisemmin on esitetty puhtaalle biologiselle ST:lle julkaisussa Klipstein et al., Infect. Immun., 37:550-557 (1982).

Radiomerkittytoksiini sisälsi 3×10^5 tuiketta minuutissa sekä 71 hiiriyksikköä mikrogrammassa (verrattuna merkitsemättömän toksiinin 175 hiiriyksikköön mikrogrammassa), mikä määritettiin imevän hiiren kokeella, jossa yksi hiiriyksikkö on määritetty siksi määräksi, joka tuottaa suoliston paino:ruumiin paino-suhteeksi vähintään arvon 0,083.

Konjugointi

ST konjugoitiin joko LT:hen tai B-alayksikköön lisäämällä 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidiä (EDAC) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) toksiinien seokseen, jotka olivat 0,1 molaarisessa fosfaattipuskurissa, pH 7,0, 18 tunnin ajan 4°C:ssa. Tämän jälkeen konjugaatti dialysoitiin huolellisesti vettä vastaan 48 tunnin ajan 4°C:ssa, käyttäen molekyylipainon cut-off-arvoltaan 12 000 olevia dialyysipusseja, jotka pidättivät kaiken LT:n (tai B-alayksikön) sekä konjugoidun ST:n mutta eivät konjugoimatonta ST:tä tai EDAC:ia. Toistetut määritykset osoittivat, että joko pelkän LT:n tai B-alayksikön dialyysivettä vastaan johtivat 10 % tappioon saostumisesta johtuen. Täten konjugoidun ST:n määrä perustui siihen dialyysiaineessa läsnäolevan Lowry-proteiinin vähäiseen kasvuun, mikä ylitti 90 % alunperin lisätyn joko LT:n tai B-alayksikön määrästä. Konjugoidun, radioaktiivisella jodilla merkityn ST:n määrä varmistettiin vertaamalla lopullisten konjugaattien radioaktiivisuutta alunperin lisätyn ST:n radioaktiivisuuteen, mitkä määritettiin automaattisella gammalaskurilla, jota myydään tavaramerkkinä PRIAS[®] PGD Packard Instrument Co., Downers Grove, IL.

Konjugaatin ominaisuudet

Mikäli toisin ei mainita, niin kunkin konjugaatin pitoisuus asetettiin vastaamaan 100 %:a kutakin toksiinia, jotka oli testattu sellaisilla kokeilla, joissa konjugoitujen toksiinien ominaisuuksia verrattiin vaimentamattomien toksiinien ominaisuuksiin. LT-toksisuutta verrattiin kokeiltaessa pelkän LT:n sekä konjugoidussa muodossa olevan LT:n perättäisiä 2-kertaisia laimennoksia Y1-lisämunuaissolun kokeessa Sack et al., Infect. Immun., 11:334-336 (1975). ST:n toksisuutta verrattiin

määrittämällä pelkän synteettisen ST:n tai konjugoidussa muodossa olevan ST:n peräkkäisten laimennosten pienin tehokas määrä imevän hiiren kokeessa Klipstein et al., Infect. Immun., 37:550-557 (1982).

Antigeenisuus määritettiin ELISA:n avulla. Tässä käytettiin joko kolera-LT:n tai sen B-alayksikön monospesifistä vuohen hyperimmuunia antiseerumia [Clements et al., Infect. Immun., 29:91-97 (1980)] jäniksen anti-vuohi-antiseerumin kanssa, jotka oli konjugoitu alkaliseen fosfataasiin (Miles Research Laboratories, Elkhart, Ind.). Kuten aikaisemmin on esitetty [Klipstein et al., Infect. Immun., 37:550-557 (1982)], vuohissa ja jäniksissä puhdasta biologista ST:tä vastaan muodostunutta hyperimmuunia antiseerumia käytettiin ST:lle kaksoiskerrosmenetelmässä, jäniksen anti-vuohi-antiseerumin kanssa, joka oli konjugoitu alkaliseen fosfataasiin; konjugaattien arvoja verrattiin synteettisen ST:n arvoihin tässä kokeessa. Lähtöarvona käytettiin 10 milligrammaa, ja konjugaateista sekä vastaavasta toksiinista tehtiin perättäiset 2-kertaiset laimennokset. Sitä pitoisuutta, jossa näiden valmisteiden absorbanssi aallonpituudella 410 nanometriä oli 0,600, käytettiin verrattaessa konjugoidun ja vaimentamattoman toksiinimuodon antigeenisyyksiä.

Immunointitoimenpiteet

Rotille annettiin primääri immunointi vatsakalvon sisäisesti (i.p.), Freund'in täydellistä apuainetta käyttäen, mitä seurasi kaksi suun kautta annettua (p.o.) lisäännosta 4 vuorokauden väliajoin. Suun kautta annettavat immunoinnit tehtiin vatsaan johtavan putken avulla, kaksi tuntia simetidiinin p.o. antamisen jälkeen (simetidiiniä myydään tavaramerkkinä TAGAMET[®], Smith Kline and French Laboratories, Carolina, Puerto Rico), ja sen annostus oli 50 milligrammaa/ruumiin painokiloa kohti, jotta vatsan eritystoiminta saatiin poistetuksi.

Uhkatoimenpiteet

Rotat altistettiin uhalle 1 viikon kuluttua viimeisten lisäännosten jälkeen tiputtamalla testattavaa materiaalia yhteen

10 senttimetrin mittaiseen ligatoituun etäissuolisilmukkaan 18 tunnin ajan, kuten aikaisemmin on esitetty [Klipstein et al., Infect. Immun., 31:144-140 (1981) ja 32:1100-1104 (1981)]. Aikaisemmissa tutkimuksissa on saatu selvitettyä tässä koejärjestelmässä saatavan merkittävän suojan ja sen merkittävän suojan, joka on saatu, kun suolistokontaminaatio uhkaa immunoitujen rottien vaurioitumatonta suolistoa, välinen korrelaatio [Klipstein et al., Infect. Immun., 28:163-170 (1980)]. Uhkaavina annoksina käytettiin niitä, jotka saivat aikaan suurimman mahdollisen erityksen immunoimattomissa eläimissä: 0,5 nanogrammaa LT:tä, 5 nanogrammaa joko synteettistä tai biologista ST:tä ja 0,1 millilitraa bakteerikasvatuksen alustaa, joka sisälsi 10^9 LT^+/ST^- -kannan PB-258 (O15:H⁻), LT^+/ST^+ -kannan H-10407 (O78:H11), ja LT^-/ST^+ -kannan Tx 452 (O78:H12) elävää organismia millilitraa kohden.

Kunakin päivänä saatu arvo määritettiin 3-5 immunoidusta rotasta, ja esitetyt arvot ovat immunoitujen rottien erityksen alene-
misasteen keskiarvoja $\pm$ keskiarvon standardipoikkeama (SEM), verrattuna 5:n vastaavasti uhatun immunoimattoman rotan arvoihin. 50 % pienentynyt erityks oli merkittävä kullekin uhkaavalle materiaalille, P-arvon ollessa vähemmän kuin 0,001, mikä määritettiin Studentin t -testillä kahdelle riippumattomalle keskiarvolle.

Antitoksiiniresponsi

Rokotteessa olevan synteettisen ST:n sekä B-alayksikön muodostamien komponenttien seerumin ja mukosaalisen antitoksiinitite-
rin arvot määritettiin immunoitujen rottien seerumi- ja mukosaalihuhteluista ELISA:lla, käyttäen tekniikkaa, joka on esitetty aikaisemmissa tutkimuksissa, jotka osoittivat, että rottien, jotka oli immunoitu LT:llä ruuansulatuskanavan ulkopuolisesti/suun kautta tapahtuvalla immunoinnilla, antitoksiiniresponsi rajoittuu siihen responsiin, joka liittyy seerumin IgG:hen ja mukosaaliseen IgA:han [Klipstein et al., Infect. Immun., 37:1086-1092 (1982)]. Tästä syystä ainoastaan näiden

immunoglobuliiniluokkien antitoksiinit testattiin tässä tutkimuksessa. B-alayksikön antitoksiinille B-alayksikköä käytettiin kiinteänä faasina; synteettisen ST:n alayksikölle vuohessa kehittyntä, synteettisen ST:n herättämää hyperimmuunia antiseerumia käytettiin kiinteänä faasina ja synteettistä ST:tä käytettiin antigeenina kaksoiskerrostekniikassa. Seeruminäytteisiin lisättiin jäniksen anti-rotta-IgG:tä ja vuohen anti-jänis-antiseerumia, jotka oli konjugoitu alkaliseen fosfataasiin; mukosaalisissa huuhteluissa käytettiin vuohen anti-rotta-eritys-IgA:ta ja jäniksen anti-vuohi-antiseerumia, konjugoituna alkaliseen fosfataasiin (Miles Research Laboratories, Elkhart, Ind.). Esitetyt arvot ovat viiden immunoidun rotan näytteistä saadun geometrisen keskiarvotiitterin käänteislukujen kasvuja verrattuna viiden immunoimattoman vertailurotan vastaaviin arvoihin. Antitoksiinititiittereiden arvot vertailueläimissä olivat 1:2 joko ST:tä tai B-alayksikköä vastaan kaikissa näytteissä, paitsi että seerumitiitteri ST:tä vastaan oli 1:4.

Osa C

Rokotteen valmistaminen

Puhdistettua LT-holotoksiinia valmistettiin E.coli:n kannasta 711 (FILT), joka on transformoitu K-12-johdannainen, ja joka kantaa porsaansa kannasta P307 peräisin olevan Ent-plasmidin LT-geeniä (-geenejä), ja se erotettiin alayksiköikseen kromatografisilla menetelmillä, kuten edellä kappaleessa B on esitetty. LT-holotoksiinin ja sen B-alayksikön homogeenisyys varmistettiin polyakryyliamidilla suoritettulla geelielektroforeesilla, kuten kappaleessa B on esitetty. Synteettistä ST:tä, joka käsittää sen saman 18 aminohapon rakenteen, jonka Chan et al., supra, edellä ovat esittäneet puhtaalle ST:lle, jota oli saatu puhdistamalla kannan 18D viljelmistä, valmistettiin, kuten edellä olevassa osassa II on esitetty.

Käytettyjen toksiinien määrät perustuivat niiden proteiinipitoisuuksiin, jotka määritettiin edellä mainitulla Lowry:n et al. menetelmällä; niiden mooliekvivalentit laskettiin julkaisuista

molekyyllipainojen arvoista, joka viiden B-alayksikön polymeeriselle muodolle oli 57 400 daltonia ja 1972 daltonia ST:lle, kuten edellä olevassa osassa B on esitetty.

ST konjugoitiin B-alayksikköön lisäämällä 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidiä (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), karbodi-imidin ja koko proteiinin painosuhteen ollessa 1,5:1, toksiinien vaihtelevien moolisuhteiden seokseen, joka oli 0,1 M fosfaattipuskurissa, pH 7,0, 18 tunnin ajan 4°C:ssa; tämän jälkeen konjugaatti dialysoitiin täydellisesti vettä vastaan, jonka jälkeen sitä käsiteltiin, kuten aikaisemmin edellä olevassa kappaleessa B on esitetty.

Rokotteen ominaisuudet

Rokotteen komponenttitoksiinien antigeenisuus määritettiin entsyymisidotun immunosorbentin kokeella (ELISA), kuten edellä osassa B on esitetty. B-alayksikölle käytettiin ihmisen LT:n B-alayksikön monospesifistä vuohen hyperimmuunia antiseerumia, jäniksen anti-vuohi-antiseerumin kanssa, kytkettynä alkaliseen fosfataasiin (Miles Research Laboratories, Elkhart. Ind.). ST:lle käytettiin vuohissa ja jäniksissä synteettisen ST:n herättämää hyperimmuunia antiseerumia (osa IV, A, edellä) kaksoiskerrosmenetelmässä, jäniksen anti-vuohi-antiseerumin kanssa, konjugoituna alkaliseen fosfataasiin. Konjugaateista ja vastaavista toksiineista valmistettiin peräkkäiset 2-kertaiset laimennokset, lähtömäärän ollessa 10 mikrogrammaa. Niitä pitoisuuksia, joissa konjugaatin ja toksiinin absorbanssi aallonpituudella 410 nanometriä oli 0,600, verrattiin, ja konjugaatin arvo ilmoitettiin prosentteina vaimentamattoman toksiinin arvosta. Prosentteina ilmoitettu antigeenisuus 1000:lla kerrottuna antoi rokotteessa olevien antigeeniyksiköiden määrän milligrammaa kohden.

Rokotteen jäännöstoksisuus määritettiin vertaamalla ST:n arvoja rokotteen (i) siihen pienimpään tehokkaaseen annostukseen imevän hiiren kokeessa, jossa yksi hiiriyksikkö on määritelty siksi

määräksi, joka tuottaa suoliston paino:ruumiin painosuhteeksi vähintään arvon 0,083, ja (ii) ED_{50} -arvoon (annostus, joka saa aikaan puolet suurimmasta mahdollisesta erityksestä) immunoimattomien rottien ligatoiduissa suolisilmukoissa.

ST:n konjugointi

Niissä tapauksissa, joissa rotat immunoitiin pelkästään synteettisellä ST:llä, toksiini oli kytketty porsaen immunoglobuliiniin G (PIG), toksiinin ja PIG:in moolisuhteen ollessa 100:1, ja karbodi-imidin sekä koko konjugaattiproteiinin painosuhteen ollessa 1:1. Tämä konjugaatti sisälsi 46 paino-% ST:tä ja siinä oli 470 ST-antigeeniyksikköä milligrammassa.

Immunointitoimenpiteet

Mikäli toisin ei mainita, rotille annettiin primääri immunointi vatsakalvon sisäisesti (i.p.), Freund'in täydellistä apuainetta käyttäen, mitä seurasivat kaksi suun kautta annettua (p.o.) lisäannosta 4 vuorokauden välein. Suun kautta annettu immunointi suoritettiin vatsaan johtavan letkun avulla, kaksi tuntia simetidiinin (myydään tavaramerkkinä TAGAMET[®], Smith Kline and French Laboratories, Carolina, Puerto Rico) p.o. antamisen jälkeen, jonka annostus oli 50 milligrammaa ruumiin painokiloa kohden, vatsaerityksen poistamiseksi.

Uhkaamistoimenpiteet

Rotat alistettiin uhalle 4-6 vuorokautta viimeisten lisäannosten jälkeen, tiputtamalla yhteen, 10 senttimetrin mittaiseen, etäissuolen ligatoituun silmukkaan 18 tunnin ajan 0,1 millilitraa sellaista kasvatusalustaa, joka sisälsi 10^9 elävää organismaa millilitrassa. Kunkin päivän arvo saatiin 3-5 immunoidusta rotasta, ja esitetyt arvot ovat erittymisen alenemisprosenttien keskiarvoja $\pm$ keskiarvon standardipoikkeama immunoiduissa ro-tissa, verrattuna viiden, samalla organismilla uhatun immunoimattoman rotan vastaaviin arvoihin. Yli 50 % alentunut erityys tarkoittaa voimakasta suojausta, koska se kussakin tapauksessa oli merkittävä, P-arvon ollessa alle 0,001, mikä määritettiin

Student:in t-testillä kahdelle riippumattomalle keskiarvolle.

Antitoksiiniresponssi

Seerumin ja mukosaalisen antitoksiinin tiittereiden arvot määritettiin ELISA-tekniikalla, kuten edellä osassa B on esitetty. B-alayksikön antitoksiinille B-alayksikköä käytettiin kiinteänä faasina; ST:n antitoksiinille käytettiin kiinteänä faasina synteettisen ST:n aikaansaamaa vuohen hyperimmuunia antiseerumia, ja synteettistä ST:tä käytettiin antigeenina kaksoiskerrostekniikassa. Koska aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että i.p./p.o.-tavalla suoritettu immunointi LT:llä tai aikaan ainoastaan seerumin IgG:n ja mukosaalisen IgA:n antitoksiinititititit /Klipstein et al., Infect. Immun., 37:1086-1092 (1982)7, niin vain näiden immunoglobuliiniluokkien antitoksiinit arvioitiin. Seeruminäytteisiin lisättiin jäniksen anti-rotta-IgG:tä ja vuohen anti-jänis-antiseerumia, konjugoituina alkaliseen fosfataasiin; mukosaalisissa huuhteluissa käytettiin vuohen anti-rotta-eritys-IgA:ta ja jäniksen anti-vuohi-antiseerumia, konjugoituina alkaliseen fosfataasiin (Miles Research Laboratories, Elkhart, Ind.). Esitetyt arvot ovat 5 immunoidusta rotasta saadun geometrisen keskiarvotiitterin käänteisluvun kasvuja viiden immunoimattoman vertailurotan vastaaviin arvoihin verrattuna.

Osa D

Rokotteen valmistaminen

Puhdistettua LT-holotoksiinia valmistettiin E.coli:n kannasta 711 (FILT), joka on transformoitu K-12-johdannainen, joka kantaa porsaansa kannasta P307 peräisin olevan Ent-plasmidin LT-geeniä (-geenejä), ja se erotettiin alayksiköikseen kromatografisilla menetelmillä, kuten edellä olevassa osassa B on esitetty. LT-holotoksiinin sekä sen B-alayksikön homogeenisyys varmennettiin samoin polyakryyliamidilla suoritettulla geelielektroforeesilla, kuten osassa B on esitetty. Synteettinen ST käsitti sen saman 18 aminohapon primäärisen rakenteen, kuin Chan:in et al., supra, kuvaama polypeptidikin, ja se sisälsi kolme molekyylin sisäistä

kystiinin disulfididisidosta. Tämä synteettinen ST oli sitä materiaalia, jonka spesifinen valmistaminen on esitetty edellä kappaleessa II. Käytetty konjugointimenetelmä oli sama, kuin edellä olevassa osassa III C esitettykin, paitsi että synteettisen ST:n ja B-alayksikön moolisuhde oli 70:1.

Rokotteen ominaisuudet

Rokotteen ominaisuudet määritettiin kuten osassa III C on esitetty. Niitä pitoisuuksia, joissa rokotteen ja vaimentamattomien ST:n sekä B-alayksikön absorbanssiksi aallonpituudella 410 nanometriä saatiin 0,600, verrattiin ja rokotteen kummankin komponentin arvo ilmoitettiin prosentteina siitä arvosta, joka saatiin saman toksiinin vaimentamattomalla muodolla. Prosenttinen antigeenisuus 1000:lla kerrottuna antoi antigeeniyksiköiden arvon (AU) rokotemilligrammaa kohden. Käytetty rokote sisälsi 450 AU:ta kumpaakin toksiinikomponenttia proteiinimilligrammaa kohden, ja ne immunointiannostukset, joita kuvattiin 1000 AU:lla, sisälsivät kummankin toksiinikomponentin tämän antigeenisuysmäärän 2,2 milligrammassa rokotetta.

Immunointitoimenpiteet

Mikäli toisin ei mainita, rotille annettiin primääri immunointi vatsakalvon sisäisesti (i.p.), Freund'in täydellistä apuainetta (FCA) käyttäen, mitä neljä vuorokautta myöhemmin seurasi kaksi p.o. lisäännosta, jotka annettiin neljän vuorokauden välein. Suun kautta tapahtuva immunointi annettiin vatsaan viedyn letkun avulla, kaksi tuntia simetidiinin (myydään tavaramerkkinä TAGAMET[®], Smith Kline and French Laboratories, Carolina, Puerto Rico) p.o. antamisen jälkeen, sen annoksen ollessa 50 mg ruumiin painokiloa kohden, vatsan erityksen poistamiseksi. Mikropisaramuodossa p.o. annettuna 1000 AU:ta rokotetta oli kapseloitu tunnettua tekniikkaa käyttäen, hydroksipropyyli-metyylisellulosaftalaatin (Compound HP-50, Sinetsu Chemical, Tokyo, Japan) toimiessa pH-herkkänä peitteenä.

Jäniksille annettiin primääri immunointi joko lihaksen sisäisesti (i.m.) FCA:ta käyttäen, tai p.o.-reittiä vatsaan johdetun

letkun avulla; kahden viikon kuluttua tätä seurasi kaksi p.o. lisäannosta, jotka annettiin kahden viikon välein. Kaikkia p.o.-reittiä suoritettuja immunoiteja edelsi 2 tuntia aikaisemmin simetidiinin 30 mg:n i.m. injektioinnit.

Antitoksiiniresponsi

Uhan aikana uhattujen silmukoiden seerumi- ja mukosaalihuuhuteltut jatkokäsiteltiin [Klipstein et al., Infect. Immun., 37:1086-1092 (1982)]7, ja antitoksiinititterit määritettiin ELISA:lla, käyttäen edellä osassa B esitettyjä tunnettuja menetelmiä. B-alayksikön antitoksiinin kiinteänä faasina käytettiin B-alayyksikköä; ST:n antitoksiinille kiinteänä faasina käytettiin synteettisen ST:n herättämää vuohen hyperimmuunua antiseerumia, ja synteettistä ST:tä käytettiin antigeeninä kaksoiskerrostekniikassa. Koska aikaisemmat tutkimukset, joissa käytettiin LT:tä antigenina, ovat osoittaneet, että immunointi i.p./p.o.-tavalla tuottaa vain seerumin immunoglobuliini G:n (IgG) ja mukosiaalisen IgA:n antitoksiinitittereitä [Klipstein et al., Infect. Immun., 37:1086-1092 (1982)]7, niin ainoastaan näiden immunoglobuliiniluokkien antitoksiinit arvioitiin. Esitettyt arvot ovat viidestä tai useammasta hiirestä saadun geometrinen keskiarvotiitterin käänteisluvun kasvuja viidestä immunoimattomasta vertailuhiirestä saatuun arvoon verrattuna, lukuunottamatta jänisseerumeita, joissa samasta eläimestä saatuja, immunointia edeltäviä ja immunoinnin jälkeisiä näyttöjä verrattiin.

Uhkaamistoimenpiteet

Immunoidut eläimet altistettiin uhalle neljästä seitsemään vuorokautta viimeisen lisäännoksella suoritettun immunoinnin jälkeen, tiputtamalla joko ST:n tai LT:n asteittaisia annoksia ligatoituun suolisilmukkaan 18 tunnin ajan, kuten aikaisemmin on esitetty Klipstein et al., Infect. Immun., 31:144-150 (1981); Sack, Infect. Immun., 8:641-648 (1973)7. Toksiini tiputettiin 0,5 millilitrassa tavallista suolaliuosta kunkin rotan yhteen silmukkaan, sekä 1,0 millilitrassa Tryptikaasi-soija-kasvatusalustaa (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD) jopa 10 silmukkaan kussakin jäniksessä. Neste-eritykselle kunakin

päivänä esitetyt arvot ovat keskiarvoja $\pm$ keskiarvon standardipoikkeama (SEM), jotka on saatu kolmesta viiteen vertailurotasta ja immunoidusta rotasta, sekä kuuden vertailujäniksen silmukoista ja neljästä kussakin immunointiryhmässä olevasta jäniksestä. Suojaindeksi PI määritettiin jakamalla se immunoiduissa eläimissä oleva toksinimäärä, joka sai aikaan saman erityksen kuin 50 % tehokas annos (ED_{50}) immunoimattomissa eläimissä, immunoimattomien eläimien vastaavalla arvolla.

Rotat altistettiin myös sille uhalle, jonka sai aikaan 0,1 millilitra kasvatusliuosta, joka sisälsi 10^9 LT^-/ST^+ -kannan Tx 451 (078:H12) elävää organismia millilitraa kohden. Tulokset on esitetty erityksen pienenemisprosentin keskiarvona $\pm$ SEM immunoiduissa rotissa verrattuna viiden samalla tavalla uhatun, immunoimattoman vertailueläimen vastaaviin arvoihin. Immunoidun ja vertailuryhmän erityksen tilastollinen eroavuus määritettiin Studentin t -testillä kahdelle riippumattomalle keskiarvolle.

V. Multimeerisen ST:n käyttö

Edellä esitetyllä tavalla valmistetut multimeeriset ST-molekyylit liitettiin kantajamolekyyliin määrityksissä, jotka myös suoritettiin em. Frederick A. Klipsteinin johdolla. Näiden määritysten tulokset on esitetty edellä.

A. Rokotteet, jotka sisältävät monomeerisia ja multimeerisia ST-molekyylejä

Kolme rokotetta valmistettiin. Ensimmäinen sisälsi monomeerista synteettistä ST:tä (johon joskus seuraavassa viitataan M-ST:llä), toinen sisälsi pää-loppupää-tyylistä multimeerista dimeeri-ST:tä, johon joskus viitataan ST/ST:llä, kun taas kolmas rokote sisälsi polymeerista ST:tä, jonka toistuvat yksiköt on sidottu toisiinsa molekyylin sisäisillä, polypeptidien välisillä kystiinin disulfididisidoksilla, ja johon joskus viitataan P-ST:llä. Kunkin edellä mainitun materiaalin synteesi on esitetty edellä olevassa osassa II. Kukin ST-molekyyleistä oli sidottu E.coli:n lämpölabiiliin toksiniin (LT) B-alayksikköön, kuten jäljempänä kappaleessa VI A esitetään.

Synteettisten ST-valmisteiden ominaisuudet

Testattaessa edellä esitettyä ELISA-tekniikkaa käyttäen, ja käyttäen M-ST-konjugaatin hyperimmuunia antiseerumia, niin konjugoimattoman ST/ST:n antigeenisuus oli 3,5-kertaa suurempi ja konjugoimattoman P-ST:n antigeenisuus oli 15-kertaa suurempi kuin konjugoimattoman M-ST:n antigeenisuus. Näissä määrittäyksissä saatujen antigeenisyyksien tulokset on esitetty kuvan 19 käyrissä.

Kun kunkin ST-valmisteen asteittaisia määriä testattiin imevän hiiren kokeessa, supra, niin yhden hiiriyksikön arvo M-ST:lle oli 5,7 nanogrammaa, 45 nanogrammaa ST/ST:lle ja 18,2 nanogrammaa P-ST:lle. Täten vapaalla ST/ST:llä oli 1,3 % M-ST:n eritystehosta, kun taas P-ST:llä oli 31 % M-ST:n eritystehosta.

Konjugointi B-alayksikön kanssa

Kukin kolmesta synteettisestä ST-valmisteesta liitettiin ristisidoksin LT-B-alayksikköön käyttäen vaihtelevia ST:n ja B-alayksikön välisiä alkuperäisiä moolisuhteita. Näin valmistettujen konjugaattien antigeenisyydet on esitetty kuvan 20 kolmessa käyrässä, toksiinin painoprosenttisuuden funktiona, sekä konjugaatissa olevien kahden toksiinin alkuperäisen moolisuhteen funktiona. On ymmärrettävä, että toksiinin "ristisitominen" kantajaan on eri asia kuin polypeptidin "ristisitoutuminen" polypeptidien välisillä kystiinin disulfididisidoksilla.

ST:n ja B-alayksikön yhtä suuret paino-osuudet sisältäviä konjugaatteja saatiin reaktioista, joissa ST:n ja B-alayksikön välinen alkuperäinen moolisuhde M-ST:lle oli 45:1 ja ST/ST:lle 40:1. Riittävän suuria P-ST:n ja B-alayksikön välisiä suhteita ei käytetty tällaisen konjugaatin saamiseksi.

Ristisitomisreaktio ei vaikuttanut toksiinien antigeenisyyteen, joten M-ST--B-alayksikkö-konjugaatissa, joka sisälsi kummankin toksiinikomponentin yhtä suuret paino-osuudet, oli kumpaakin komponenttia 500 antigeeniyksikköä. Toisin kuin hyperantigeenisten ST-valmisteiden (ST/ST ja P-ST) konjugaatit,

joissa oli suurinpiirtein yhtäsuuret osuudet kunkin toksiini-komponentin antigeeniyksiköitä, jotka konjugaatit sisälsivät ainoastaan 25 paino-% ST/ST:tä ja 9 paino-% P-ST:tä.

Koska B-alayksikön paino-osuus muuttui kääntäen suuremmaksi kuin vähentyneen ST:n paino, niin B-antigeeniyksiköiden määrä oli suurimmillaan niissä konjugaateissa, jotka sisälsivät pienimmän ST-määrän. Niistä konjugaateista, jotka sisälsivät yhtäsuuret osuudet kunkin toksiinikomponentin antigeeniyksiköitä, M-ST-rokotteessa oli 500 antigeeniyksikköä milligrammassa, ST/ST-rokote käsitti 725 antigeeniyksikköä milligrammassa, ja P-ST-rokotteessa oli 900 antigeeniyksikköä milligrammassa kutakin toksiinikomponenttia.

Kahdesta multimeerisestä ST-operaatiosta valmistettujen rokotteiden jäännöstoksisuus oli 10-kertaa vähemmän kuin M-ST:llä valmistetun rokotteen toksisuus. Tämä johtui pääasiassa siitä, että nämä rokotteet sisälsivät pienempiä ST-määriä.

Vaikka multimeeriset ST-valmisteet alunperin olivatkin vähemmän toksisia kuin M-ST, niin niiden toksisuudet vaimenivat myös vähemmän voimakkaasti ristisitovan konjugointireaktion vaikutuksesta. Täten kunkin ST-valmisteen toksisuutta verrattiin sen alkuperäiseen arvoon; ristisitova reaktio pienensi M-ST:n toksisuutta 727-kertaa pienemmäksi, P-ST:llä pieneminen oli 256-kertainen ja ST/ST:n toksisuus pieneni vain 44-kertaiseksi. Näiden rokotteiden lukuisia ominaisuuksia on esitetty seuraavassa taulukossa 9.

Taulukko 9

B-alayksikköä ja erilaisia synteettisiä ST-valmisteita käyttämällä saadun ristisidoksellisten rokotteiden ominaisuuksia

Konjugointi- reaktio		Rokote				1000 AU:ta rokotetta		
		paino-% ^c		AU/mg ^d		Määrä		Toks ^g
ST ^a	Molaari- nen ^b	ST	B	ST	B	Vac ^e	ST ^f	ST
ST:B								
M-ST	45:1 (0,5)	52	48	510	500	2,00	1040	900
ST/ST	20:1 (0,7)	25	75	849	737	1,38	345	97
P-ST	10:1 (0,9)	9	91	1300	917	1,11	100	108

^aKonjugaatissa olevat ST-valmisteet. M-ST = monomeerinen synteettinen ST; ST/ST = pää-loppupää-tyylinen dimeerinen synteettinen ST-multimeeri; ja P-ST = polymeerinen ST, joka käsittää polypeptidien välisiä kystiinin disulfididisidoksia.

^bST-valmisteen ja B-alayksikön välinen alkuperäinen moolisuhde. Suluissa olevat numerot osoittavat glutaraldehydin ja koko proteiinin välisen painosuhteen reaktiossa.

^cKunkin toksiinin suhteelliset paino-osuudet kussakin konjugaatissa.

^dKunkin toksiinin antigeeniyksiköiden määrä milligrammassa rokotekonjugaattia.

^eSe rokotekonjugaatin määrä milligrammoina, josta saadaan 1000 AU:ta kutakin toksiinikomponenttia.

^fSe ST-määrä mikrogrammoina, joka sisältyy 1000 AU:ta kutakin toksiinia saatavaan rokotekonjugaattiin.

^gVaimentamattoman ST:n eritystehon ekvivalenttimäärä nanogramminä, määritettynä imevän hiiren kokeessa rokotekonjugaatilla, joka sisältää 1000 AU:ta kutakin toksiinia.

Rottien immunointi ST--B-alayksikkö-rokotteilla

Rottaryhmät immunoitiin kahdella rokotteella: (i) M-ST ristisidottiin B-alayksikköön, niiden alkuperäisen moolisuhteen ollessa 70:1, karbodi-imidireaktiolla, kuten edellä on esitetty, sekä kuten osassa IV B on esitetty, sellaisen konjugaatin tuottamiseksi, joka sisälsi 51paino-% M-ST:tä ja 49 paino-% B-alayksikköä, ja jossa kumpaakin toksiinikomponenttia oli 450 antigeeniyksikköä milligrammassa; ja (ii) P-ST ristisidottiin B-alayksikköön, niiden välisen alkuperäisen moolisuhteen ollessa 10:1, glutaraldehydireaktiolla (esitetty osassa VI A), sellaisen konjugaatin tuottamiseksi, joka sisälsi 9 paino-% P-ST:tä ja 91 paino-% B-alayksikköä, ja joka sisälsi 1300 M-ST:n sekä 917 B-alayksikön antigeeniyksikköä milligrammassa. Käytetyt annostukset perustuivat M-ST:n antigeeniyksiköiden määrään milligrammassa kutakin rokotetta. Kaikille rotille annettiin ruuansulatuskanavan ulkopuolinen primäärinen immunointi 200 MST-antigeeniyksiköllä sekä vaihtelevia annostuksia suun kautta tapahtuvia (p.o.) lisäannosimmunointeja siten, että p.o. kokonaisannostukset vaihtelivat 500 ja 3000 M-ST-antigeeniyksikön välillä.

M-ST- ja P-ST-konjugaatteja sisältävien rokotteiden aiheuttamat responssit olivat identtiset, kun koko p.o. immunoinnin kokonaismäärä ilmoitettiin M-ST:n antigeeniyksikköinä, kuten kuvaa 21 A tarkastelemalla voidaan todeta. Kokonais-p.o.-immunointeina ilmaistuna, kukin rokote sai aikaan samankaltaisen, annoksesta riippuvan kasvun mukosaaalisessa IgA M-ST:n antitoksiinin responssissa, sekä samanlainen suojan aste eläviä E.coli:n LT⁻/ST⁺-kantoja vastaan todettiin.

Kuitenkin ero oli huomattava, kun p.o. annetut annostukset ilmoitettiin annetun ST:n painomäärään perustuen. Täten kuvan 21 B tarkastelu osoittaa, että P-ST oli selvästi tehokkaampaa; eli se konjugoidun P-ST:n p.o.-annostus, joka tarvittiin tuottamaan 50 % pienentynyt erityys uhan alaisissa rotissa, oli 70 mikrogrammaa, joka on 15 kertaa vähemmän kuin se konjugoidun M-ST:n

1050 mikrogramman määrä, joka vaaditaan saman tuloksen aikaansaamiseen.

Edellä esitetyt mainitut taulukossa 9 ja kuvassa 21 esitetyt tulokset havainnollistavat lukuisia tämän keksinnön piirteitä. Ensinnäkin kummankin multimeerisen ST-valmisteiden painoa kohden määritetty antigeenisuus oli parempi kuin monomeerisen ST:n. Lisäksi molemmat valmisteet ilmensivät alentunutta toksisuutta imevän hiiren kokeessa vapaina molekyyleinä ollessaan, sekä LT:n B-alayksikön kanssa muodostuneina konjugaatteina. Erittäin antigeenisestä P-ST-valmisteesta saatiin rokote, jonka antigeeninen teho oli suurempi, mutta jonka toksisuus oli jokseenkin identtinen ST/ST:stä valmistettuun rokotteeseen verrattuna. P-ST--B-alayksikön muodostaman rokotteiden molempien toksiinikomponenttien (ST ja B-alayksikkö) antigeeninen teho oli lähes kaksinkertainen, mutta sen ST:n jäännöstoksisuus oli vain noin yksi kymmenesosa M-ST--B-alayksikön muodostaman rokotteiden vastaaviin arvoihin verrattuna. Edelleen se P-ST:n määrä (380 mikrogrammaa), joka tarvittiin tuottamaan kumpaakin toksiinikomponenttia 1000 antigeeniyksikköä sisältävä rokote, oli noin neljäsosa siitä M-ST:n määrästä (1490 mikrogrammaa), joka tarvittiin vastaavan rokotteiden valmistamiseen.

On myös tärkeätä huomauttaa, että multimeeristen ST-valmisteiden ELISA-tekniikalla määritetty antigeenisuus korreloi immunogeenisyytensä kanssa, mikä immunogeenisyys määritettiin niiden kyvyllä tuottaa antitoksiiniresponssi, sekä aikaansaada suoja uhkaa vastaan immunoiduissa koe-eläimissä. Koska konjugaateissa olevan ST:n antigeenisuus on sekä mainitussa konjugaatissa olevan ST:n osuuden, että sen asteen funktio, jossa asteessa sen antigeenisyyttä uhrattiin ristisitovassa konjugointireaktiossa, niin konjugaattiannoksen ilmoittamisella painoon perustuen ei saada merkityksellistä tietoa, mikäli antigeenisyyttä ei olla suoraan mitattu. Kun ST:n antigeenisuus on määritetty konjugaatin suoralla kokeella ELISA-tekniikka käyttäen, ja ilmoitettu antigeeniyksiköissä, niin tällöin joko B-alayksikköön tai immunologisesti

epäspesifiseen proteiinikantajaan konjugoidulla M-ST:llä suoritettu immunointi tuottaa mukosiaalisten antitoksiinitasojen annoksesta riippuvan responssin, sekä annoksesta riippuvaisen suojan asteen elävien, toksiinia tuottavien kantojen uhkaa vastaan Klipstein et al., Infect. Immun., 40:924-929 (1983).

Edelleen edellä olevat havainnot osoittavat, että joko M-ST-tai P-ST-rokotteella suoritettu immunointi sai aikaan identtisen responssin, kun annostukset oli ilmoitettu M-ST:n antigeeniyksiköissä. Nämä havainnot vahvistivat myös antigeenisyyden ja immunogeenisyyden välisen korrelaation siten, että P-ST oli 15 kertaa antigeenisempi kuin M-ST, ELISA:lla määritettynä, sekä painoon nähden 15 kertaa immunogeenisempi kuin M-ST immunoituissa rotissa.

Edellä esitettyihin tutkimuksiin liittyi myös kaksi sellaista modifikaatiota, joita aikaisemmin julkaistuissa raporteissa ei ole esitetty. Ensimmäinen on se, että B-alayksikkö saatiin suoraan E.coli:n kannasta K-12, jota oli muokattu yhdistelmägeenitekniikalla tuottamaan ainoastaan ihmisen B-alayksikköä, eli tätä alayksikköä ei saatu porsaan LT-holotoksiinista hajotamistoimenpiteillä, kuten aikaisemmin on tehty. Toinen modifikaatio oli se, että ristisitovana reagenssina toimiva glutaraldehydi korvasi karbodiimidin.

Glutaraldehydillä suoritettulla kytkemisellä on lukuisia etuja karbodiimidikytkentöihin verrattuna. Ensinnäkin se saa aikaan ST:n tehokkaan ristisitoutumisen B-alayksikköön vaikuttamatta kummankaan toksiinin antigeenisyyteen. Toiseksi se tuottaa ST:n tehokkaamman kytkeytymisen B-alayksikköön, joten ST:n ja B-alayksikön yhtäsuuret antigeeniset osuudet sisältäviä rokotteita voidaan saada aikaan käyttämällä ST:n ja B-alayksikön välisiä pienempiä alkuperäisiä moolisuhteita, jolloin rokotteen valmistamiseen tarvittavan ST:n määrä alenee merkittävästi. Kolmanneksi päin vastoin kuin karbodiimidien kohdalla, olemassa on huomattavaa kokemusta, joka osoittaa glutaraldehydikonjugaat-

tien antamisen ihmisille turvallisiksi. /Kätkö, Cockcroft et al., J. Allerg. Clin. Immunol., 60:56-62 (1977); Levine et al., Infect. Immun., 21:158-162 (1978); ja Relyveld, Prog. Clin. Biol. Res., 47:51-76 (1980).7

B. Muita rokotteita, jotka sisältävät monomeerisia ja poly-meerisia ST-molekyylejä

Muita konjugaatteja, joita kaksi M-ST ja P-ST vedellä mainituista, kolmesta synteettisestä ST-valmisteesta muodostavat, valmistettiin LT:n B-alayksikön kanssa. ST:n ja B-alayksikön välisten erilaisten alkuperäisten, monomeerisen synteettisen ST:n (M-ST) molekyylipainoon perustuvien moolisuhteiden vaikutusta tutkittiin, kuten myös erilaisia kytkemisreagensseja. Tässä tutkimuksessa käytetyt kytkemisreagenssit olivat 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)-karbodi-imidi (EDAC), dimetyyli-suberimidaatti (DMS) ja glutaraldehydi (GA).

Joidenkin näiden tutkimusten tuloksia on esitetty kuvan 22 käyrissä, joko DMS:llä tai EDAC:lla kytketylle P-ST:lle. Tulokset, jotka on saatu GA:ta käyttäen, on esitetty kuvan 20 oikeassa palstassa (palsta C). Kuten voidaan nähdä, sekä DMS:llä että GA:lla saadaan suurempia ST:n antigeenisyyksiä (antigeeniyksiköitä milligrammassa), P-ST:n ja B-alayksikön alhaisemmilla alkuperäisillä moolisuhteilla, kuin mitä EDAC:tä käyttämällä saavutetaan. Tiettyjen konjugaattien tiedot on esitetty seuraavassa taulukossa 10.

Taulukko 10

B-alayksiköstä ja eri ST-valmisteista, erilaisilla kytkemisreagensseilla valmistettujen rokotteiden ominaisuuksia

Konjugointi- reaktio		Rokote			1000 AU:n rokote				Tox ^h
		Molaarinen ^c	Paino-% ^d		AU/mg ^e	Määrä			
ST ^a	Kytkejä ^b	ST:B	ST	B	ST	B	Vac ^f	ST ^g	ST
M-ST	EDAC (1,5)	70:1	51	49	492	467	2,20	1122	1276
P-ST	EDAC (1,5)	30:1	36	64	651	687	1,51	540	332
M-ST	DMS (1,0)	50:1	46	54	455	508	2,20	1012	770
P-ST	DMS (1,0)	10:1	12	88	1620	780	1,33	160	172
M-ST	GA (0,5)	45:1	52	48	510	500	2,00	1040	900
P-ST	GA (0,6)	30:1	30	70	4130	679	0,25	75	92

^aKonjugaateissa käytetyt ST-valmisteet. M-ST = monomeerinen syntetttinen ST; ja P-ST = polymeerinen ST, joka käsittää polypeptidien välisiä kystiinin disulfididisidoksia.

^bKonjugaattien valmistuksessa käytetyt kytkemisreagenssit. EDAC = 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)-karbodi-imidi; DMS = dimetyyli-suberimidaatti; ja GA = glutaraldehydi. Suluissa olevat arvot ilmoittavat kytkemisreaktion alustassa läsnäolevan kytkemisreagenssin ja alkuperäisen kokonaisproteiinin välisen painosuhteen.

^cST-valmisteen ja B-alayksikön välinen alkuperäinen moolisuhde.

^dKussakin konjugaatissa olevan kunkin toksiinin suhteellinen paino.

^eKunkin toksiinin antigeeniyksiköt (AU) rokotekonjugaatin milligrammaa kohden.

^fSe rokotekonjugaatin määrä milligrammoina, joka tarvitaan tuottamaan 1000 AU:ta kutakin toksiinikomponenttia.

^g1000 AU:ta toksiinia tuottavaan rokotekonjugaattiin sisältyvä ST:n painomäärä milligrammoina.

^hVaimentamattoman ST:n eritystehon ekvivalenttimäärä nanogrammina sellaisessa rokotekonjugaatissa, joka sisältää 1000 AU:ta ST-toksiinia, imevän hiiren kokeessa määritettynä.

Edellä esitetyt tiedot osoittavat polymeerisen synteettisen ST:n (P-ST) ylivoimaisuuden monomeeriseen synteettiseen ST:hen (M-ST) verrattuna, painoon perustuen. Tämä ylivoimaisuus ei vaikuta riippuvan käytetystä kytkemisreagenssista, vaikkakin eri kytkemisreagensseilla tuntuu olevan jotakin vaikutusta. Täten vaikuttaa siltä, että glutaraldehydillä (GA) ja dimetyyli-suberimidaatilla (DMS) saadaan aikaan parempia, sekä P-ST:n että M-ST:n ja B-alayksikön välisiä konjugaatteja karbodi-imidiin (EDAC) verrattuna.

Edellä oleviin tutkimuksiin liittyviä kokeellisia yksityiskohtia on löydettävissä jäljempänä kappaleessa VI B, jo edellä esitettyjen tietojen lisäksi.

C. Konjugoimattoman polymeerisen ST:n immunogeenisyys

Kunkin edellä kuvatun ST-valmisteiden on osoitettu olevan antigeeninen, ja kukin on määritelty siten, että niillä on vähintään 10 % natiivin, biologisen ST:n antigeenisyydestä painoon perustuen. Nämä antigeenisyydet on havainnollistettu ELISA-määrittäyksin. Lisäksi edellä mainittujen ST-valmisteiden on osoitettu olevan immunogeenisiä sekä rotissa että jäniksissä, kun valmisteet ovat olleet kytkettyinä proteiinikantajaan, kuten LT:n B-alayksikköön tai porsaen immunoglobuliiniin G. Kuitenkin sikäli kuin asiaa tunnetaan, monomeeriset ST (M-ST)-valmisteet ovat haptteenisiä, eivätkä ne ole immunogeenisiä yksin ilman kytkettyä kantajaa käytettävässä.

Immunointi konjugaatin muotoisella ST:llä, jossa konjugaatissa kantajaproteiini ei ole aktiivista immunogeenia, on voimavarojen tuhlausta, koska osa konjugaatista ei ole immunologisesti aktiivista. ST--B-alayksikön muodostamien konjugaattien B-alayksikkö-osa on luonnollisestikin osittain immunogeeninen, ja se saa vasta-aineiden tuotannon aikaan. Kuitenkaan holotoksiinin

tai B-yksikön riittäviä määriä ei ole helposti saatavilla taloudellisesti kannattavan rokotteen aikaansaamiseksi, ja yhdistelmägeenitekniikan avulla tuotettaessa tämänkaltaiset kantajaproteiinin valmistheet saattavat myös sisältää epätoivotuja proteiiniepäpuhtauksia.

Tästä syystä olisi erittäin edullista, mikäli täysin synteettinen immunogeeni voitaisiin valmistaa sellaista rokotetta varten, jossa rokotteessa jokseenkin koko konjugaatti olisi immunologisesti aktiivista. Johtuen korkeasta keskimääräisestä molekyyli-painostaan, liukoisuudesta, antigeenisyydestään sekä menestyksellisestä käytöstään konjugaatin kytkettynä immunogeenina, polymeerinen ST-valmiste P-ST, vaikuttaisi olevan tällainen immunologisesti aktiivinen kantaja sille synteettiselle polypeptidille, jonka aminohappojäännösten järjestys vastaa LT:n B-alayksikön immunogeenistä sekä antigeenistä määräävää aluetta, kuten sitä edellä olevassa taulukossa 2 esitettyä järjestystä. Tästä johtuen suoritetettujen immunogeenisyystutkimusten ensimmäisessä vaiheessa käytettiin konjugoimatonta P-ST-valmistetta, mitä seurasi tällaisen P-ST--LT-B:n muodostaman polypeptidi-konjugaatin tuottaminen.

Jänikset immunoitiin konjugoimattomalla P-ST:llä, mitä seurasi kaksi P-ST:n lisäännosta. ELISA-määritykset paljastivat, että näistä immunoinneista saatujen seerumeiden antigeenina toimivaa synteettistä monomeeristä ST:tä (M-ST) vastaan vaikuttavien tiittereiden arvot olivat korkeat.

Seerumin tiitteriarvo 1:2500 tuotti todellakin puolet M-ST-antigeenin suurimmasta mahdollisesta kylläisyysasteesta. Saadut tiitteriarvot ovat riittäviä osoittamaan, että kantajaa ei tarvita immunoitaessa ja suojatessa konjugoimattoman P-ST:n aiheuttamaa uhkaa vastaan. Nämä tiitteriarvot ovat myös riittäviä antamaan aiheutta epäillä, että P-ST:tä itseään voidaan käyttää kantajana immunogeenisen, synteettisen LT:n B-alayksikkö-polypeptidin konjugointiin täysin synteettisen immunogeenin

tuottamiseksi, joka immunogeeni on jokseenkin kokonaan immuno-geenisesti aktiivista, ja joka tuottaa suojan sekä ST:tä että LT:tä tuottavia patogeeneja vastaan. Uskotaan, ettei M-ST, samalla tavalla kuin näissä tutkimuksissa annettuna, eli kanta-jaan konjugoimatta, saa aikaan jokseenkaan minkäänlaisia anti-ST:n vasta-aineita.

Ne menetelmät, joilla nämä tulokset on saatu, on esitetty jäljempänä kappaleessa VI C.

VI. Multimeerisen ST:n materiaalit ja menetelmät

A. Rokotteet, jotka sisältävät M-ST-, ST/ST- ja P-ST-enterotoksiinivalmisteita

Kolmea synteettisesti valmistettua ST-valmistetta käytettiin. Näissä valmisteissa käytetty monomeerinen synteettinen ST (M-ST) on sitä materiaalia, joka käsittää sen saman 18 aminohappojäännöksen järjestyksen, joka on kuvattu luonnolliselle, ihmisen ST Ib:lle julkaisussa Chan et al., J. Biol. Chem., 256:7744-7746 (1981), jonka biologiset ja antigeeniset ominaisuudet ovat jokseenkin samat kuin natiivin ST:nkin. M-ST:n valmistaminen ja ominaisuudet on esitetty edellä osissa II ja III. Käytetty ST/ST-valmiste on 36 aminohappoa sisältävä polypeptidi, joka on ihmisen ST Ib:n 18 aminohappojäännöksen pää-loppupää-tyyppinen dimeeri, jonka valmistaminen esitettiin edellä osassa II. Polymeerinen ST (P-ST) on materiaalia, jonka lukuisat toistuvat ST-yksiköt ovat sitoutuneet toisiinsa molekyylin sisäisin, polypeptidien välisin kystiinin disulfididisidoksin. Myös P-ST:n valmistaminen on esitetty edellä olevassa kappaleessa II. ST/ST- ja P-ST-valmisteet puhdistettiin ajamalla ne Sephadex G-50-geeliä sisältävän kromatografiakolonnin läpi, lyofilisoitiin, ja käytettiin ilman lisäpuhdistamista.

B-alayksikkö saatiin E.coli:n kannan pDF 87 viljelmistä, joka kanta on transformoitu K-12-johdannainen, joka kantaa ihmisen E.coli:n kannan H 10407 B-alayksikön plasmidia [Clement et al., Infect. Immun., 40:653-658 (1983)], ja se puhdistettiin kroma-

tografisin menetelmin, jotka on esitetty julkaisussa Clements et al., Infect. Immun., 29:91-97 (1980). Käytettyjen toksiinien määrä perustui niiden proteiinipitoisuuteen, joka oli määritetty menetelmällä, joka on esitetty julkaisussa Lowry et al., J. Biol. Chem. 193:265-275 (1951); molaariset ekvivalentit laskettiin natiivin B-alayksikön julkaistuista arvoista (57 400 daltonia viidelle polymeeriselle alayksikölle) sekä natiivin ST:n julkaistuista arvoista (1972 daltonia), kuten edellä sekä seuraavissa julkaisuissa Gill et al., Infect. Immun. 33:677-682 (1981) ja Staples et al., J.Biol.Chem., 255:4716-4721 (1980) on esitetty, vastaavasti.

Konjugointiolosuhteet

Kolme erilaista synteettistä ST-valmistetta ristisidottiin LT:n B-alayksikköön sekoittamalla näitä toksineja vaihtelevissa alkuperäisissä moolisuhteissa, I-luokan Sigma-glutaraldehydin (GA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) läsnäollessa. Toksiiniseoksen GA:n ja kokonaisproteiinin välistä suhdetta vaihdeltiin kussakin reaktiossa siten, että GA:n ja B-alayksikön välistä suhdetta pidettiin vakiona, moolisuhteena 700:1. Tämän GA:n pitoisuuden on todettu saavan aikaan tehokkaan ristisitoutumisen B-alayksikön antigeenisyyden vaimentumatta. Kaksi tuntia kestäneen, huoneen lämpötilassa tapahtuneen reaktion jälkeen konjugaatit dialysoitiin täydellisesti TEAN-puskuria (Tris, EDTA, natriumatsidi, natriumkloridi) vastaan 4°C:ssa, minkä jälkeen ne käsiteltiin kuten edellä sekä seuraavassa julkaisussa Klipstein et al., J. Infect. Dis., 147:318-326 (1983) on esitetty.

Konjugaattien ominaisuudet

Synteettisten ST-valmisteiden, jotka olivat joko yksin tai konjugoidussa muodossa, antigeenisyydet määritettiin kaksoiskerros-, entsyymiin sidotun immunosorbentin kokeella (ELISA), käyttäen vuohen ja jäniksen synteettisen M-ST:n hyperimmuuneja antisereumeita, kuten on esitetty julkaisuissa Klipstein et al., J. Infect. Dis., 147:318-326 (1983) ja Klipstein et al., Infect. Immun., 39:117-121 (1983). Konjugaateissa olevan B-alayksikön antigeenisyyttä määritettiin ELISA-tekniikalla, ihmisen B-ala-

yksiköiden herättämää, vuohen hyperimmuunian antiseerumia käyttäen. Konjugaatin kunkin toksiinikomponentin antigeenisuus on ilmoitettu prosenttisuutena vastaavalla tavalla määritetyn vaimentamattoman toksiinin antigeenisyydestä; kunkin toksiinikomponentin prosenttinen antigeenisuus 1000:lla kerrottuna tuotti antigeeniyksiköittensä lukumäärän rokotemilligrammaa kohden. Konjugaateissa olevien multimeeristen ST-valmisteiden antigeenisuus on ilmoitettu M-ST:n antigeeniyksiköiden avulla.

Rokotteiden jäännöstoksisuus määritettiin menetelmällä, joka on aikaisemmin esitetty julkaisussa Klipstein et al., Infect. Immun., 37:550-557 (1983), vaimentamattoman ST:n arvoihin verraten. Kunkin rokotteen pienin mahdollinen vaikuttava annos määritettiin imevän hiiren kokeella, jossa yksi hiiriyksikö on määritelty siksi määräksi, joka tuottaa suoliston painon ja ruumiin painon väliseksi suhteeksi vähintään arvon 0,083.

Immunointitoimenpiteet

150-175 gramman Sprague-Dawley-rotille annettiin primääri immunointi vatsakalvon sisäisesti (i.p.), Freund'in täydellistä apuainetta käyttäen, mitä seurasivat kaksi suun kautta annettua (p.o.) lisäannosta neljän vuorokauden välein. p.o.-immunointi suoritettiin vatsaan johtavan letkun avulla, kaksi tuntia simetiidiini (TAGAMET[®], saatavana toimittajalta Smith Kline & French Laboratories, Carolina, Puerto Rico) p.o.-antamisen jälkeen, sen annostuksen ollessa 50 milligrammaa ruumiin painokiloa kohden, vatsaerityksen poistamiseksi.

Uhkaamistoimenpiteet

Rotat alistettiin uhalle neljästä kuuteen vuorokautta lopullisten lisäannosten antamisen jälkeen, tiputtamalla 0,1 millilitraa sellaista kasvatusliuosta, joka sisälsi 10^9 E.coli:n LT⁻ST⁺-kannan Tx 452 (O78:H12) elävää organismia millilitrassa, yhteen 10 senttimetrin mittaiseen ligatoituun etäissuolen silmukkaan 18 tunnin aikana, kuten edellä sekä julkaisussa Klipstein et al., Infect. Immun., 34:637-639 (1981) ja julkaisussa Klipstein et al., Infect. Immun., 40:924-929 (1983) on esitetty.

Kunkin päivän mittatulos määritettiin neljästä kuuteen immu-
noidusta rotasta, ja esitetyt tulokset ovat erityksen alenemis-
prosentin keskiarvoja (plus tai miinus keskiarvon standardipoik-
keama) immunoiduissa rotissa, verrattuna samalla tavalla uhattu-
jen viiden immunoimattoman vertailurotan vastaaviin arvoihin.
Enemmän kuin 50 % alentunut erityys tarkoittaa merkittävää eroa
(P pienempi kuin 0,001) immunoitujen ja vertailueläinten arvojen
välillä, mikä määritettiin Student:in t-testillä kahdelle riip-
pumattomalle keskiarvolle.

Antitoksiiniresponsi

M-ST:n ja B-alayksikön herättämät mukosaaaliset, IgA-antitoksii-
nin (mukosaalinen AT) tiitterit määritettiin ELISA-tekniikalla,
kuten edellä seuraavissa julkaisuissa Klipstein et al., Infect.
Immun., 37:550-557 (1983) ja julkaisussa Klipstein et al.,
Infect. Immun., 40:924-929 (1983) on esitetty. P-ST-rokotteella
immunoitujen eläinten tiitteriarvot määritettiin kaksoiskerros-
tekniikalla, jossa vuohen M-ST:n aiheuttamaa hyperimmuunua anti-
seerumia käytettiin kiinteänä faasina ja M-ST toimi antigeeninä.
Nämä tulokset on ilmoitettu M-ST-arvoina. Esitetyt arvot ovat
immunoitujen rottien tiitteriarvojen kasvun keskiarvoja, seuraa-
vaan kokonaislukuun pyöristettynä, immunoimattomiin vertailu-
rottiin verrattuna. Vertailurotissa kumpaakin toksiinikompo-
nenttia vastaan vaikuttavien tiittereiden arvot oli 2:1, joten
tiitteriarvo 1:64 immunoiduissa eläimissä tarkoitti 6-kertaista
kasvua.

B. Muita monomeerisiä ja polymeerisiä ST-molekyylejä sisäl- täviä rokotekonjugaatteja

Näissä konjugaateissa käytetyt monomeeriset synteettiset ST-
(M-ST) sekä polymeeriset synteettiset ST- (P-ST)-valmisteet
olivat niitä samoja, joiden valmistaminen ja käyttö on esitetty
edellä kappaleissa II, III ja VI A. LT:n B-alayksikkö oli osas-
sa VI A esitettyä materiaalia.

M-ST:n ja P-ST:n liittäminen B-alayksikköön 1-etyyli-3-(3-
dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidiä käyttäen (EDAC) suoritettiin

kuten edellä osassa IV on M-ST:lle esitetty. Sekä käytetyn M-ST:n että P-ST:n määrä perustui molempien materiaalien monomeerisiin muotoihin.

Glutaraldehydillä (GA) suoritettut kytkemiset toteutettiin osassa VI A esitetyllä tavalla, paitsi että käytetyn GA:n määrä on ilmoitettu GA:n ja konjugaatissa olevan kokonaisproteiinin välisenä painosuhteena, suuruudeltaan 0,5:1 tai 0,6:1, eikä GA:n ja B-alayksikön välisenä moolisuhteena, suuruudeltaan 700:1, kuten osassa VI A tehtiin.

Dimetyyli-suberimidaatilla (DMS) suoritetuissa kytkemisissä käytettiin DMS:n ja kokonaisproteiinin välistä painosuhdetta 1:1. Esimerkkejä tämänkaltaisesta kytkemisestä on löydettyissä julkaisuista Carpenter et al., J. Biol.Chem., 247:5580-5586 (1972) ja julkaisussa Hillel et al., Biochemistry, 16:3334-3342 (1977).

Konjugaattien antigeenisyydet, antigeeniyksiköiden lukumäärä (AU) milligrammassa konjugaattia, se konjugaattia sisältävän rokotteen määrä, jota oli käytettävä toksiinien 1000 AU:n saamiseksi, sekä tällaisen rokotteen ST-valmisteen määrä määritettiin, kuten osassa VI A on esitetty. Konjugaattien eritysteho määritettiin edellä esitettyä imevän hiiren koetta käyttäen.

C. Konjugoimattoman, polymeerisen ST:n immunogeenisyys

Näissä määrityksissä käytetty polymeerinen synteettinen ST (P-ST) oli materiaalia, jonka puhdistaminen on esitetty aikaisemmin osissa II ja VI A. Immunoinnit ja käytetyt ELISA-kokeet suoritettiin seuraavasti.

O-vuorokautena rottiin injektointiin lihaksen sisäisesti (i.m.) rokotetta, joka sisälsi 200 mikrogrammaa P-ST:tä, joka oli dispergoitu 1,5 millilitraan täydellistä Freund'in apuainetta, sekä 1,0 millilitraa fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (FBS), jonka pH-arvo oli 7,2. Lisäannoksina rotat saivat vatsakalvon

sisäisesti rokoteinjektioita, jotka sisälsivät saman P-ST-määrän 1,0 millilitrassa epätäydellistä Freund'in apuainetta, sekä 14. vuorokautena 1,0 millilitraa PBS:ää, mitä seurasi kaksi rokotteiden lisäannoksen injektointia, jotka sisälsivät saman P-ST-määrän alumaan sorboituneena, sekä 27. päivänä 1,5 millilitraa PBS:ia. Immunoitujen rottien seeruminäytteet saatiin korvan suonesta 34 päivän kuluttua immunoinnista.

Sitä 18-meeristä monomeerista synteettistä ST:tä (M-ST), jonka synteesi ja ominaisuudet on esitetty osissa II, III ja IV, ja jolla oli ST Ib:n aminohappojäännösten järjestys, supra, käytettiin antigeenina antiseerumin tiittereiden ELISA-kokeessa. Antigeeni liuotettiin PBS:ään pH:ssa 7,2, jolloin saatiin 1 milligramman millilitrassa sisältävä varastoliuos. Tämän jälkeen tätä varastoliuosta laimennettiin 0,1 molaarisella natriumasettaattipuskurilla, jonka pH-arvo oli 9,6, toisen varastoliuoksen saamiseksi, joka sisälsi M-ST:tä pitoisuutena 0,5 mikrogrammaa millilitrassa.

Tätä toista varastoliuosta laitettiin 50 mikrolitraa mikrotiiterilevyn koloihin siten, että kuhunkin koloon joutui 25 nanogrammaa antigeenia. Tämän jälkeen levyä inkuboitiin kosteassa kammiassa 2 tunnin ajan, lämpötilan ollessa 37°C.

Kolot pestiin tämän jälkeen kolmasti PBS-liuoksella, joka sisälsi 0,07 % polysorbaatti 20:tä (TWEEN® 20; ICI United States, Inc., Wilmington, DE), mitä seurasi kaksi pesua tislattulla vedellä. Tämän jälkeen kuhunkin koloon lisättiin 100 mikrolitraa PBS:ssä olevaa 1 %:sta härän seerumin albumiinia (BSA) epäspesifisten sitoutumiskohtien suojaamiseksi, ja BSA:ta sisältäviä liuoksia inkuboitiin koloissa 1 tunnin ajan 37°C:ssa.

Sitoutumatonta BSA:ta sisältävät liuokset ravistettiin levyiltä. Levyä ensin kuivaamatta kuhunkin kolorivistön ylärivin koloon lisättiin 90 mikrolitraa PBS:ää, kun taas levyn muihin koloihin lisättiin 50 mikrolitraa PBS:ää. Tämän jälkeen kuhunkin ylärivin koloon lisättiin 10 mikrolitraa antiseerumia, ja näin

valmistettua seosta sekoitettiin. Tämän jälkeen kustakin kolosta siirrettiin 50 mikrolitraa antiseerumia sisältävää liuosta näiden kolojen alapuolella olevien kolojen 50 mikrolitraan PBS:ää, ja sekoitettiin, jolloin saatiin edelleen kaksinkertainen laimennos. Samanlaiset kaksinkertaiset laimennossarjat tehtiin levyn jäljellä oleviin koloihin. Sen jälkeen kun kaikki laimennokset oli tehty, niin laimennettuja, antiseerumia sisältäviä koloja inkuboitiin 1 tunnin pituinen ajanjakso 37°C:ssa.

Peroksidaasilla merkittyä vuohen anti-jänis-seerumia laimennettiin 1:3000 tilavuuden suhteen PBS:llä, joka myös sisälsi 1 % BSA:ta, ja 50 mikrolitraa tuloksena olevaa liuosta lisättiin kuhunkin koloon, paitsi levyn ylimpään riviin, jota ei analysoitu. Näin valmistettuja koloja inkuboitiin tunnin ajan 37°C:ssa, jonka jälkeen ne huuhdottiin edellä esitetyllä tavalla.

Orto-fenyleenidiamiini (OPD)-liuosta valmistettiin liuottamalla yksi OPD-substraattitabletti (Pittman-Moore, Inc., Washington Crossing, NJ) 6 millilitraan tislattua vettä, johon oli myös lisätty yksi tippa 3 %:sta vetyperoksidia. 80 mikrolitraa tuloksena olevaa liuosta lisättiin kuhunkin mikrotiitterilevyn koloon. Värin muodostuminen koloissa pysäytettiin 20 minuutin kuluttua lisäämällä kuhunkin koloon 50 mikrolitraa 4-normaalista rikkihappoa. Tämän jälkeen kussakin kolossa oleva värin määrä määritettiin mittaamalla optinen tiheys aallonpituudella 492 nanometriä.

Se jäniksen seerumissa oleva vasta-aineen määrä, joka vaadittiin kyllästäämään puolet levyllä olevasta M-ST-antigeenista laskettiin tämän jälkeen standardimenetelmiä käyttäen. Näiden laskelmien tuloksena todettiin, että immunoitujen jänisten seerumissa oli läsnä riittävästi M-ST:n vasta-ainetta kyllästäämään puolet käytetystä M-ST-antigeenista, kun tämä seerumi oli laimennettu suurinpiirtein suhteessa 1:2500. Täten tällä kaksoiskerros-ELISA-määrityksellä saatiin arvoltaan 1:2500 oleva antiseerumitiitteri.

VII. Diagnostiikka

Edellä esitetyt tulokset osoittavat selvästi, että tämän keksinnön mukaiset synteettiset ST-valmisteet ovat antigeenisia. Esimerkiksi monomeerisen synteettisen ST:n antigeenisyyden on osoitettu olevan noin 40:stä noin 260:een prosenttia biologisen ST:n antigeenisyydestä, kun testaaminen suoritettiin käyttämällä biologisen ST:n vasta-aineita, ja antigeenisyyden on osoitettu olevan noin 10:stä noin 100:aan prosenttia vastaavasta antigeenisyydestä, kun mittauksessa käytettiin tiettyjen synteettisten ST-valmisteiden herättämiä vasta-aineita; eli taulukon 2 puhdistettua tuotetta (3). Samoin multimeerisen ST/ST-dimeerin antigeenisyyden on osoitettu olevan noin 300-350 prosenttia monomeerisen ST:n (M-ST) antigeenisyydestä, kun taas polymeerisen ST:n-antigeenisyyden on osoitettu olevan 900-1500 prosenttia M-ST:n antigeenisyydestä.

Tästä syystä tämän keksinnön mukaiset synteettiset ST-molekyylit, ja erityisesti multimeeriset ST-muodot voivat olla käyttökelpoisia diagnostisina reagensseina tai diagnostisten järjestelmien osina, identifioitaessa sellaisen ST-toksiineja tuottavien bakteereiden, kuten E.coli:n tai Klebsiella pneumoniae:in infektoimia eläimiä, ihmiset mukaanlukien. Tämän keksinnön mukaisten ST-molekyylien herättämät vasta-aineet saattavat myöskin olla käyttökelpoisia tällaisessa diagnostiikassa.

Immunologiset kokeet ovat erityisen suositeltavia menetelmiä ST-molekyylien käyttämiseksi. Esimerkkinä tällaisista immunologisista kokeista on edellä esitetty ELISA-määritykset. Lisäksi käyttökelpoisiin immunologisiin kokeisiin kuuluvat radioimmuunitestit sekä fluoresenssin avulla suoritettavat immuunikokeet, ja muut vastaavat.

Tämän keksinnön mukaisen diagnostisen järjestelmän eräs toteutusmuoto on erityisen käyttökelpoinen kilpailevissa kokeissa, ja se koostuu ensimmäisestä ja toisesta reagenssista, jotka ovat erillisissä astioissa. Ensimmäinen reagenssi muodostuu

tämän keksinnön mukaisesta synteettisestä antigeenisestä ST-polypeptidistä, kuten M-ST:stä tai P-ST:stä, joka toimii antigeeninä. Toinen reagenssi käsittää reseptoreita, esimerkiksi sellaisia vasta-aineita, jotka immunoreagoivat M-ST:n tai P-ST:n kanssa, ja jotka immunoreagoivat myös biologisen ST:n kanssa, kuten edellä esitettyjen ST-molekyylien kanssa. Antigeenin ja reseptoreiden välisen immuunireaktion läsnäolo voidaan osoittaa joillakin toisilla, antireseptorin kaltaisilla reseptoreilla, jotka on liitetty merkkiaineeseen, kuten radioaktiiviseen alkuaineeseen, esimerkiksi ^{125}I :hin, fluoresoivaan väriin kuten fluoreseiiniin tai entsyymiin, kuten peroksidaasiin. Tämä osoituskeino on joko erillisessä säiliössään, fosfataasiin sidottuina vuohi-antijänis-vasta-aineina, jolloin toisessa erillisessä astiassa on substraatti, tai se on vasta-aineiden joukossa, kun radioaktiiviset alkuaineet sidotaan vasta-aineisiin. Osoittava keino voidaan myös hankkia erikseen.

Edeltä käsin määrätty, ensimmäisen ja toisen reagenssin määrien seokset, edeltä käsin määrätyn testattavan näytteen määrän läsnäollessa, joka näyte voi olla ulostenäyte tai ulostenäytteestä saatava bakteeriviljelmä, saavat aikaan sellaisen immunoreaktion määrän, jonka osoittava keino ilmoittaa. Immunoreaktion määrä eroaa tunnetusta immunoreaktion määrästä, kun testattavassa näytteessä on läsnä ST:tä.

Tavallisesti käytännössä bakteeriviljelmää on inkuboitu ensin vasta-aineen kanssa, jonka jälkeen tätä seosta inkuboidaan sen P-ST:n kanssa, joka on tarttunut ELISA:ssa käytetyn tiitterilevyn kolojen seinämiin. Kolon huuhtominen vasta-aineelle luonnollisen biologisen ST-kompleksin (immunoreagoiva aine) poistamiseksi jättää jäljelle P-ST:n ja vasta-aineen muodostaman immuunikompleksin, jonka läsnäolo ja määrä voidaan ilmoittaa osoittavalla keinolla.

Kokonaisten, vahingoittumattomien, biologisesti aktiivisten vasta-aineiden käyttäminen ei ole välttämätöntä useissa diagnostisissa järjestelmissä, kuten juuri edellä esitetystä

kilpailevassa kokeessa. Pikemminkin vain tämän vasta-ainemolekyylin biologisesti aktiivista, idiotyyppin sisältävää amidi-osaa, joka sitoutuu antigeeniseen ST:hen, saatetaan tarvita. Esimerkkejä tällaisista idiotyyppin sisältävistä polyamidiosista ovat Fab- ja $F(ab')_2$ -vasta-aineosina tunnetut polyamidit, joita valmistetaan hyvin tunnetuilla, tyyppillisesti koko vasta-aineeseen kohdistuvilla entsyymireaktioilla.

Kokonaisia, vahingoittumattomia vasta-aineita, Fab-, $F(ab')_2$ -osia, ja vastaavia, jotka sisältävät vasta-aineiden idiotyyppilliset alueet, kutsutaan ohessa reseptoreiksi. Edellä ja liitteenä olevissa patenttivaatimuksissa "reseptorilla" tarkoitetaan sellaisten molekyylien ryhmää, joka muodostuu diagnostisissa tuotteissa tai menetelmissä käyttökelpoisista molekyyleistä. Kuitenkin koska Fab- tai $F(ab')_2$ -vasta-aineosaa voidaan käyttää diagnostisen menetelmän tai tuotteen reseptorina, niin tavallisesti kokonaisen, vahingoittumattoman vasta-aineen käyttö on suositeltavaa, jo siitäkkin syystä, että vasta-aineen Fab- tai $F(ab')_2$ -osan valmistaminen edellyttää lisäreaktioita ja seerumeiden puhdistamista.

Edellä esitetty on tarkoitettu havainnollistamaan tätä keksintöä, mutta sen tarkoituksena ei ole olla keksintöä rajoittava. Lukuisia muunnelmia ja modifikaatioita voidaan toteuttaa poikkeamatta keksinnön todellisesta hengestä tai uudistavien käyttötapojen piiristä.

1. Menetelmä synteettisen, antigeenisesti aktiivisen peptidin valmistamiseksi, jolla peptidillä on vähintään noin 10 % *Escherichia coli*in lämpöstabiilin enterotoksiinin antigeenisestä aktiivisuudesta, tunnettu siitä, että menetelmä käsittää vaiheet:

(a) otetaan liukenematon hartsi, joka sisältää useita bents-hydryyliamiiniryhmiä;

(b) annetaan alfa-O-bentsyyli-N-Boc-aspartiinihapon reagoida mainitun hartsin amiiniryhmien kanssa;

(c) poistetaan Boc-ryhmä vapaan amiiniryhmän tuottamiseksi mainittuun Asp-jäännökseen;

(d) annetaan vapaan amiinin reagoida ylimäärän kanssa toista aminohappoa (i) jolla on vapaa karboksyyli-ryhmä, (ii) jonka amiini on sitoutunut Boc-ryhmään ja (iii) jonka reaktiivinen ryhmä on sitoutunut suojaavaan ryhmään, amidisidoksen muodostamiseksi;

(e) poistetaan ylimäärä mainittua toista aminohappoa;

(f) poistetaan viimeksi mainittu Boc-ryhmä vapaan amiiniryhmän muodostamiseksi;

(g) toistetaan vaiheet (d), (e) ja (f) kunnes on syntetisoitu suojattu polypeptidi, joka sisältää 14 - noin 44 aminohappojäännöstä, poislueutuna ensin mainittu Asp-jäännös, käsittävä sekvenssi;

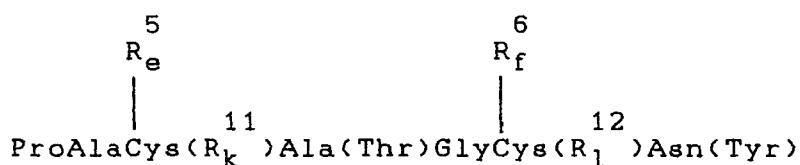
(h) poistetaan syntetisoitu, suojattu polypeptidi mainitusta hartseista ja poistetaan suojaryhmät ensimmäisen polypeptidin muodostamiseksi;

(i) liuotetaan tai dispergoidaan mainittu ensimmäinen polypeptidi vettä sisältävään seokseen pH-arvossa noin 7,5 - noin 10,5 ja pitoisuudeksi, joka on pienempi kuin noin 2 mg/ml kohden;

(j) saatetaan mainittu seos kosketuksiin hapettavana aineena toimivan molekulaarisen hapen kanssa, liuoksen pH-arvon ollessa noin 7,5 - noin 8,0 kosketuksiin saattamisen aikana;

(k) ylläpidetään mainittua kosketusta noin 1 noin 24 tuntiin kestäväen ajanjakson ajan hapettuneen polypeptidin muodostamiseksi, joka sisältää vähintään yhden molekyylin sisäisen di-

kaava



a-f ja g-l ovat kokonaislukuja, joilla kullakin on arvo 0 tai 1 edellyttäen, että ¹⁻⁶ ⁷⁻¹² ¹⁻⁶ mikäli jokin luvuista a-f tai g-l on 0, niin vastaava R_{a-f}¹⁻⁶ tai R_{g-l}⁷⁻¹² -ryhmä puuttuu, ja kun R_{a-f}¹⁻⁶ -ryhmä on poissa pysyvä jäännöksen rikkiatomi, josta jäännöksestä puuttuu R_{a-f}¹⁻⁶ -ryhmä, muodostaa kystiinidisulfidisillan, kun taas mikäli mainittujen lukujen a-f tai g-l arvo on 1, niin vastaava R_{a-f}¹⁻⁶ tai R_{g-l}⁷⁻¹² -ryhmä on läsnä; yksilöllisesti otettuina ~~mainitut~~¹⁻⁶ R_{a-f}¹⁻⁶ -ryhmät ovat samanlaisia tai erilaisia kokonaisuuksia, jotka ovat sitoutuneet Cys-jäännösten rikkiatomiin, ja ne valitaan ryhmästä, johon kuuluu vety, 1 noin 4 hiiliatomia käsittävä alkyyliryhmä, 2 noin

20 hiiliatomia käsittävä substituoitu alkyyyliryhmä, 1 noin 8 hiiliatomia käsittävä asyyyliryhmä, ja 2 noin 10 hiiliatomia käsittävä substituoitu asyyyliryhmä;

R_g, R_h, R_i, R_j, R_k ja R_l ovat samanlaisia tai erilaisia vaihtoehtoisia Ser-jäännöksiä edeltävälle Cys-jäännökselle, g-1 ovat kokonaislukuja, joiden arvo on nolla tai yksi edellyttäen, että mikäli jonkin luvuista g-1 arvo on nolla, niin vastaava erillinen R_{g-1} -ryhmä puuttuu, ja lisäksi edellyttäen, että vähintään kahden luvuista g-1 arvo on nolla, ja edelleen edellyttäen, että vähintään yksi niistä ei-vierekkäisten Cys-jäännösten muodostamista pareista on läsnä, jotka jäännökset kuuluvat niiden Cys-jäännösten joukkoon, jotka edeltävät erillisiä R_{g-1} -ryhmiä mainittujen ei-vierekkäisten ei-vierekkäisten Cys-jäännösten ollessa valittu ryhmästä, joka käsittää ne Cys-jäännökset, jotka vastaavat niitä ST Ib -polypeptidissä olevia aminohappojäännösten asemia, jotka on numeroitu luvuilla 5 tai 6 ja 9 tai 10, 5 tai 6 ja 14, ja 9 tai 10 ja 17, mainitun ST Ib -polypeptidin aminopäästä lukien; "m" on kokonaisluku, jolla on arvo nolla tai yksi edellyttäen, että mikäli "m" on nolla, niin R_m puuttuu, ja mikäli "m" on yksi niin R_m on valittu ryhmästä, joka käsittää 1 noin 26 aminohappojäännöstä sisältävän ketjun, sitovan ryhmän, ja sen karboksyylihapon asyyliosian, joka happo käsittää 1 noin 20 hiiliatomia, ja joka muodostaa aminopään jäännöksen amiinin kanssa amidisidoksen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että

"e" on nolla, mikäli "a" on nolla,

"d" on nolla, mikäli "b" on nolla, ja

"f" on nolla, mikäli "c" on nolla;

kumpikin luku "g" ja "k" ovat nolliä, mikäli "a" on nolla,

kumpikin luku "h" ja "j" ovat nolliä, mikäli "b" on nolla, ja

kumpikin luku "i" ja "l" ovat nolliä, mikäli "c" on nolla; ja

polypeptidin sisäinen kystiinin disulfidisidos on läsnä mai-

nitussa kaavassa esitetyissä Cys-jäännöksissä, sitoutuneena ryhmiin R_a ja R_e tai R_b ja R_d tai R_c ja R_f .

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että "a", "b" ja "c" ovat nollia ja kolme polypeptidin sisäistä kystiinin disulfidisidosta ovat läsnä mainitussa kaavassa esitettyissä Cys-jäännöksissä, sitoutuneina ryhmiin R_a ja R_e tai R_b ja R_d tai R_c ja R_f .

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mainittu molekyylin sisäinen kystiinin disulfidisidos on polypeptidien välinen sidos ja mainittu polypeptidi on yksi lukuisista multimeerin toistuvista yksiköistä.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että "m":llä on arvo yksi, ja mainittu R_m on ketju, joka käsittää neljä aminohappojäännöstä, joilla on järjestys, vasemmalta oikealle, ja suunnassa aminopäästä karboksipään edeten, joka on esitettyinä kaavassa Asn(Ser)Thr(Ser)Phe(Asn)Tyr, jossa suluiissa olevat aminohappojäännökset ovat kulloinkin vaihtoehtoisia välittömästi edeltäville aminohappojäännöksille.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että R_g ja R_k ovat Ser.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että R_i ja R_l ovat Ser.

8. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että R_h ja R_j ovat Ser.

9. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että R_i ja R_k ovat Ser.

10. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että R_j^{10} ja R_k^{11} ovat Ser.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että R_m^{13} on ketju, joka käsittää aminohappojäännökset, joilla on järjestys, vasemmalta oikealle, ja suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten, jota esittää kaava, joka on valittu ryhmästä käsittäen seuraavat kaavat;

MetValIleIleThrPheMetSerGlyGluThr

PheGlnValGluValProGlySerGlnHisIleAspSerGlnLys

Asn(Ser)Thr(Ser)Phe(Asn)Tyr;

TyrThrGluSerMetAlaGlyLysArgGluAsn(Ser)Thr(Ser)

Phe(Asn)Tyr;

AcetylAsn(Ser)Thr(Ser)Phe(Asn)Tyr; ja

AsnThrPheCysCysGluLeuCysCysTyrProAla

CysAlaGlyCysAsnAsnThrPheTyrCysCysGluLeuCysCys

TyrProAlaCysAlaCysAsn.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että aminohappojärjestys, vasemmalta oikealle, suunnassa aminopäästä karboksipäähän edeten, on esitettyinä kaavassa:

Asn(Ser)Thr(Ser)Phe(Asn)TyrCysCysGluLeuCysCys

Tyr(Asn)ProAla(Thr)CysAlaGlyCysAsn(Tyr)

jossa kahta Cys-jäännöstä yhdistävät viivat tarkoittavat kystiini-jäännösten molekyylin sisäisiä disulfididisidoksia; ja suluisissa olevat kuusi spesifistä aminohappojäännöstä ovat kulloinkin vaihtoehtoisia välittömästi edeltävälle aminohappojäännökselle.

Figure 1

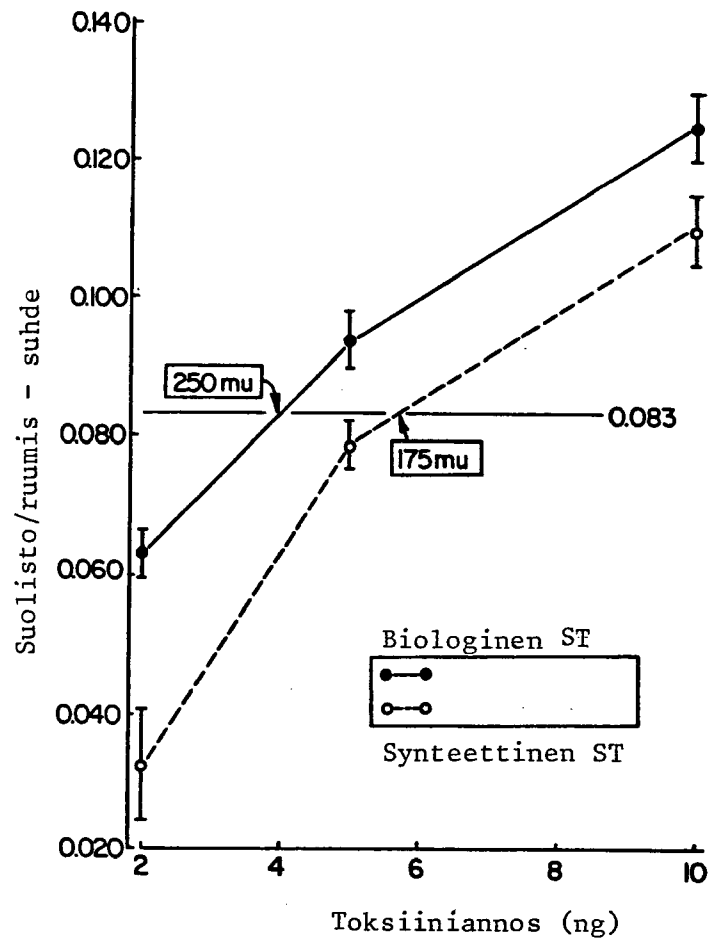


Figure 2

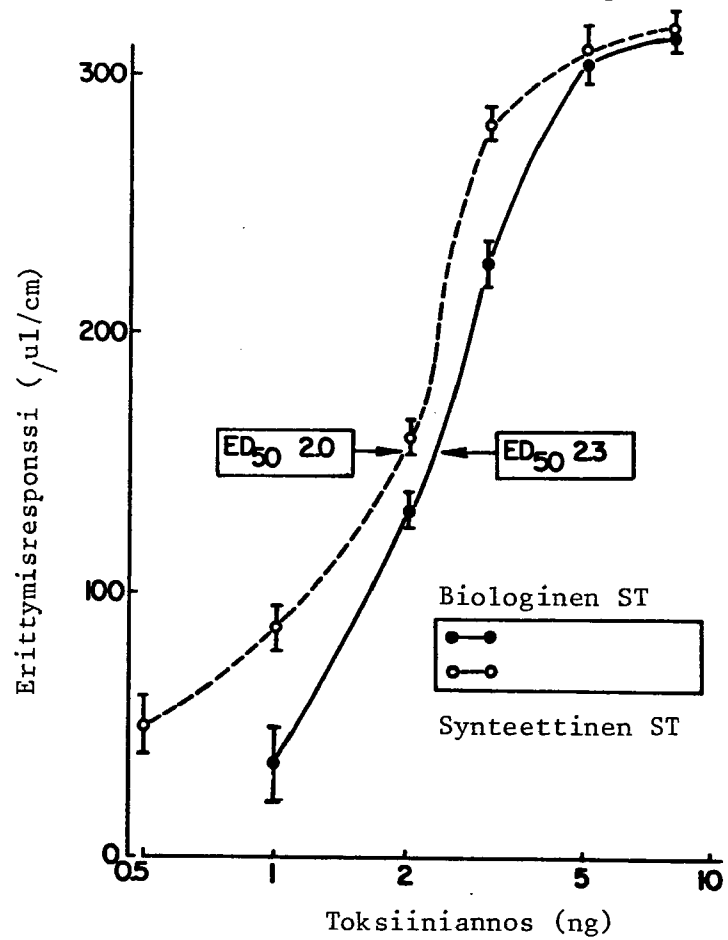


Figure 3

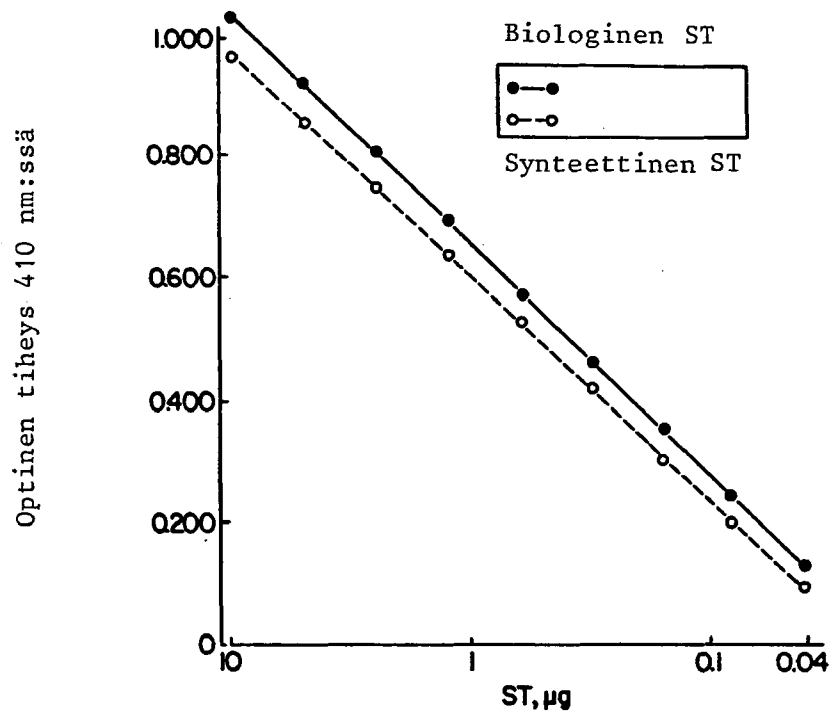
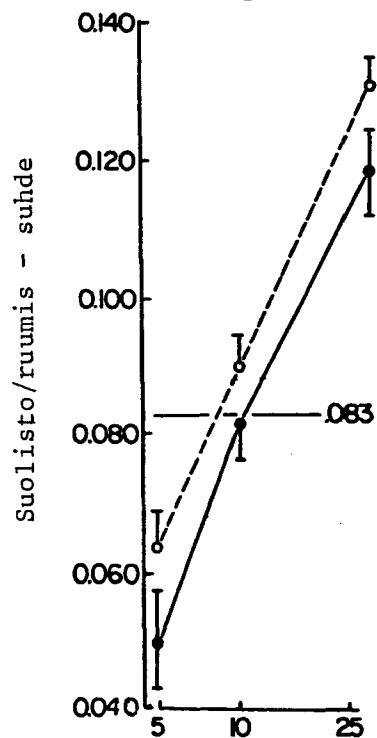


Figure 4

Antiseerumi: Biologinen ST



Antiseerumi: Synteettinen ST

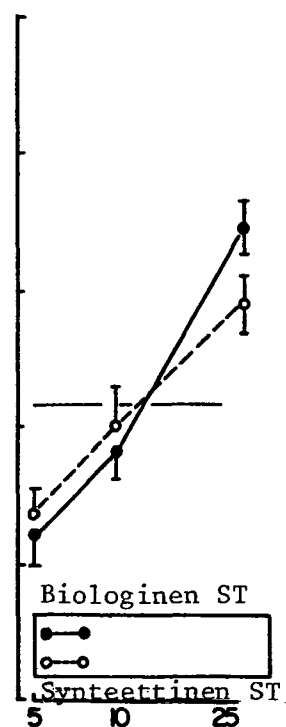


Figure 5

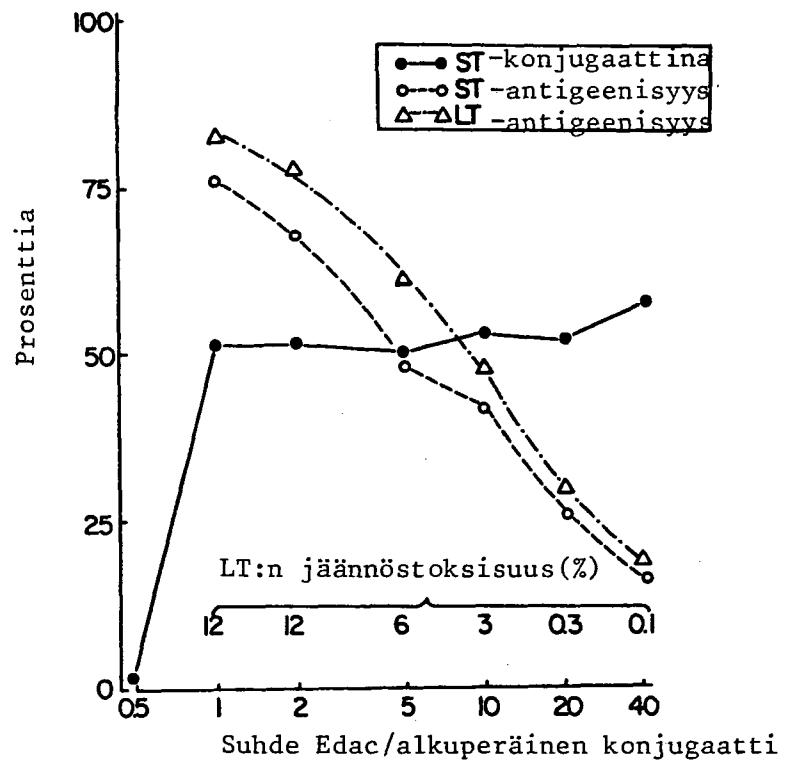


Figure 6

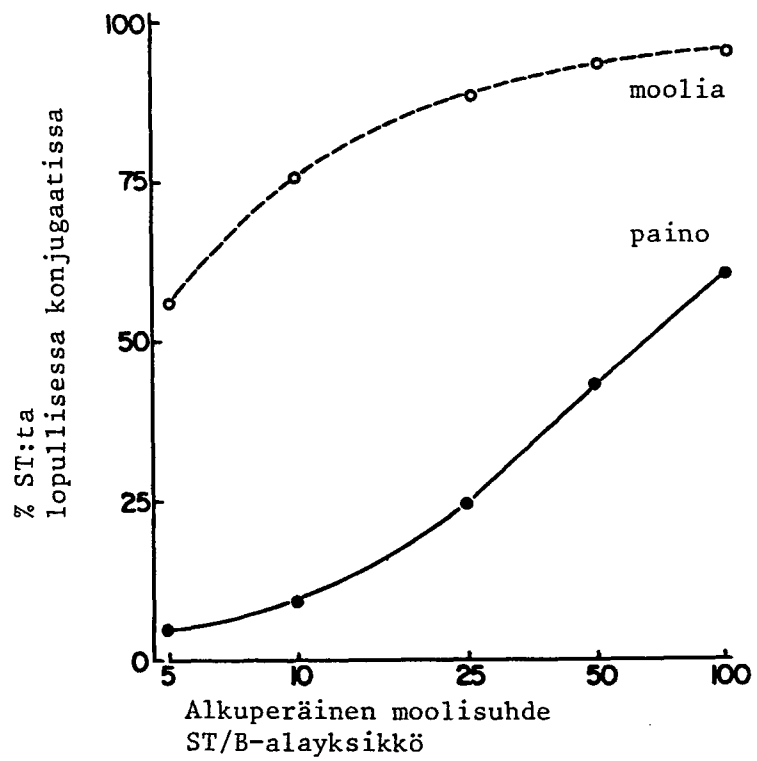


Figure 7

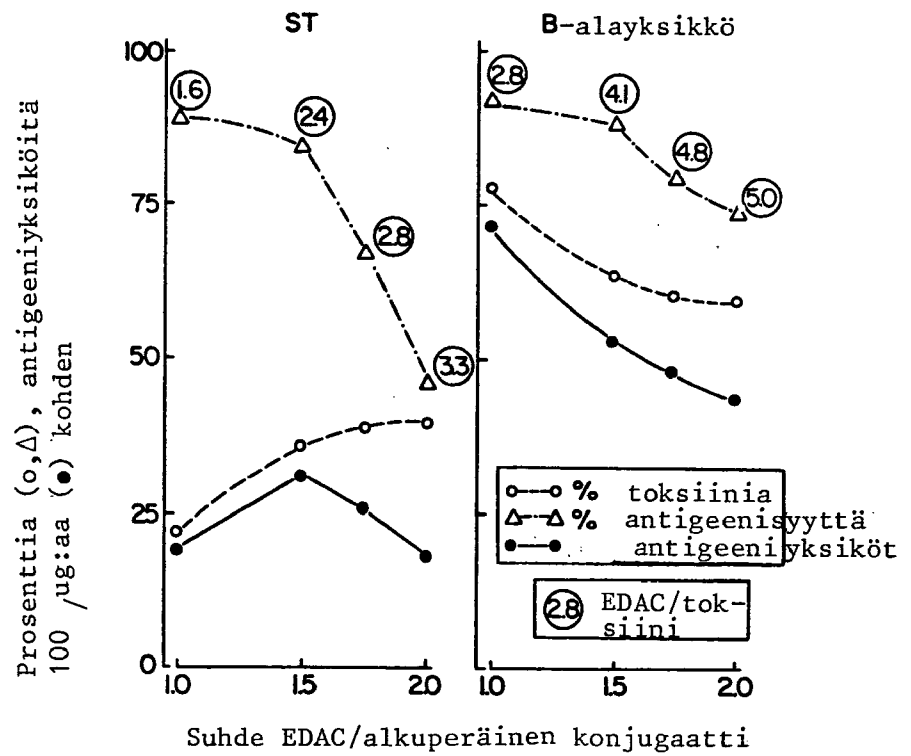


Figure 8

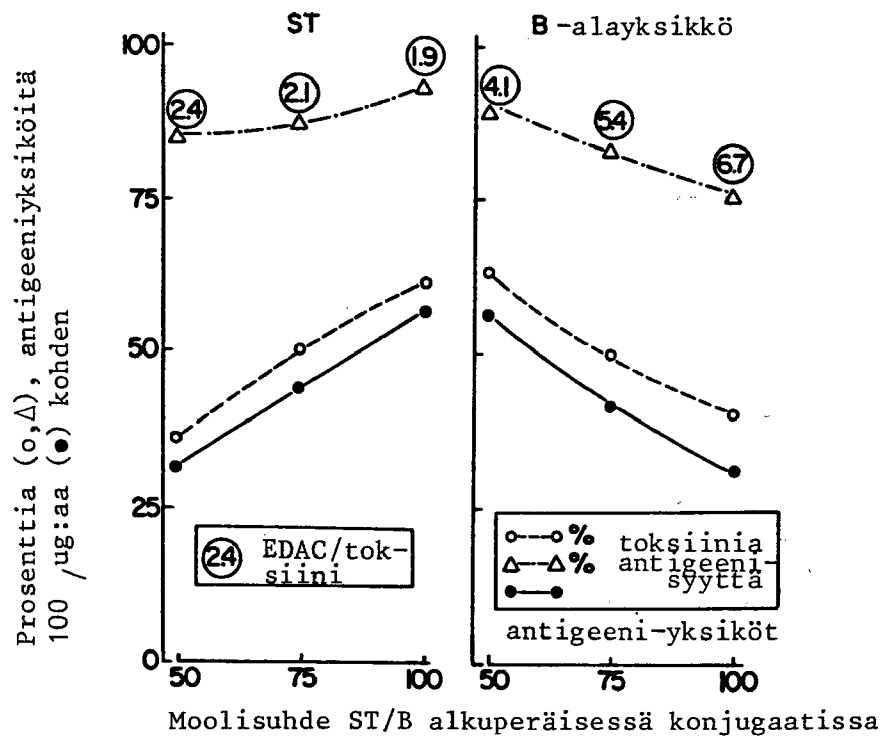


Figure 9

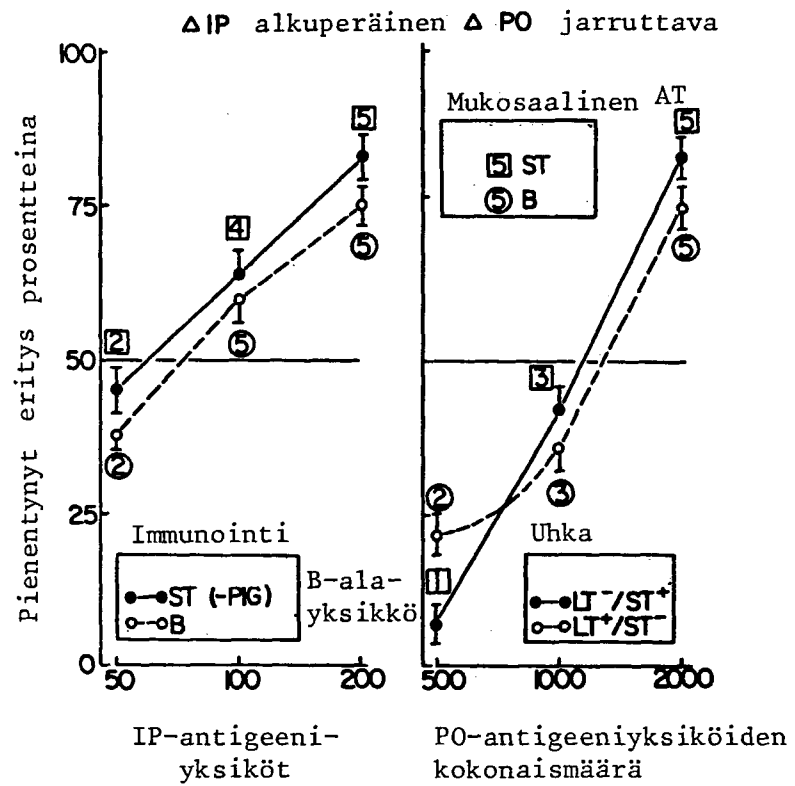


Figure 10

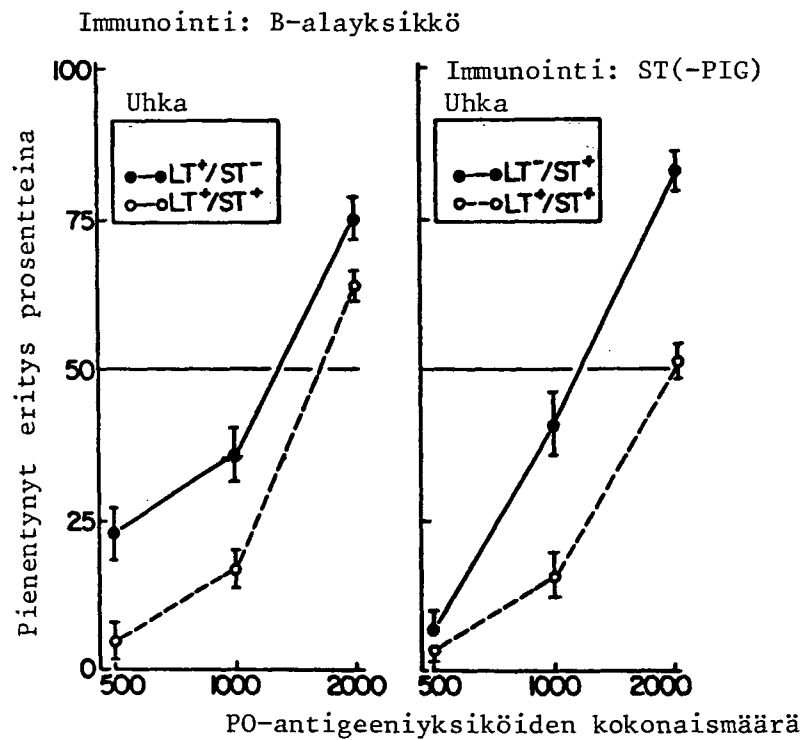


Figure 11

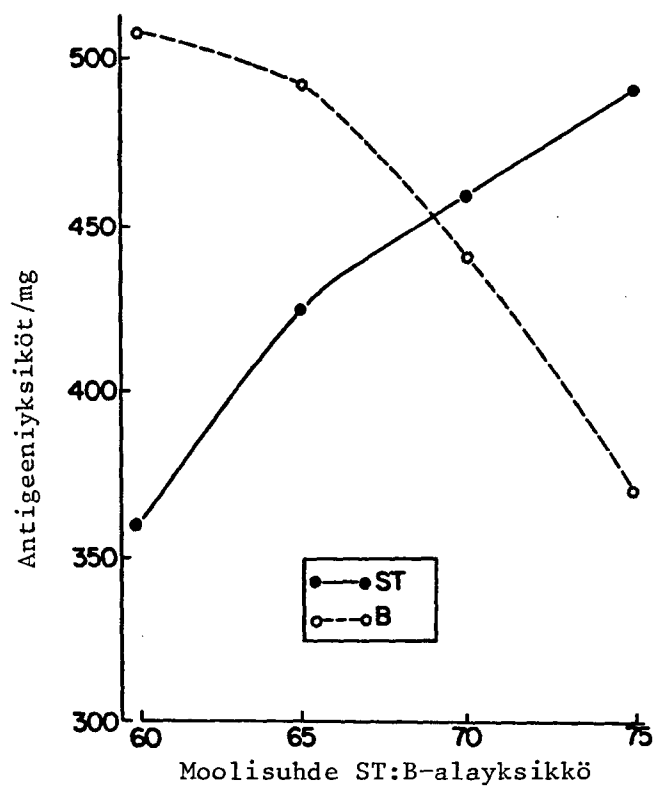


Figure 12

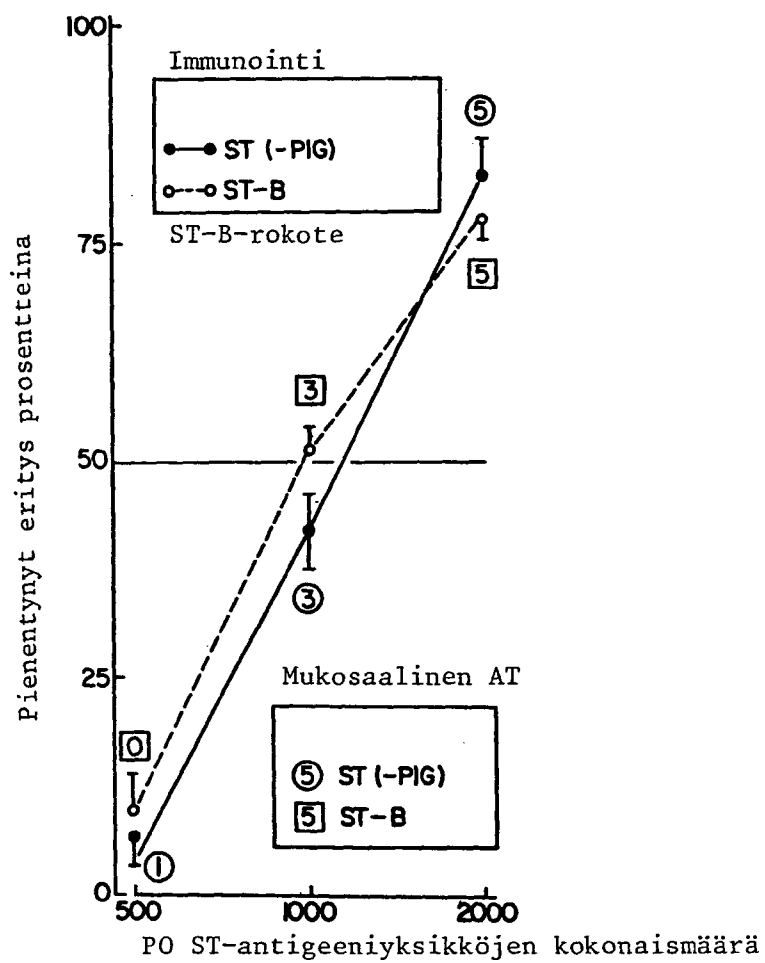


Figure 13

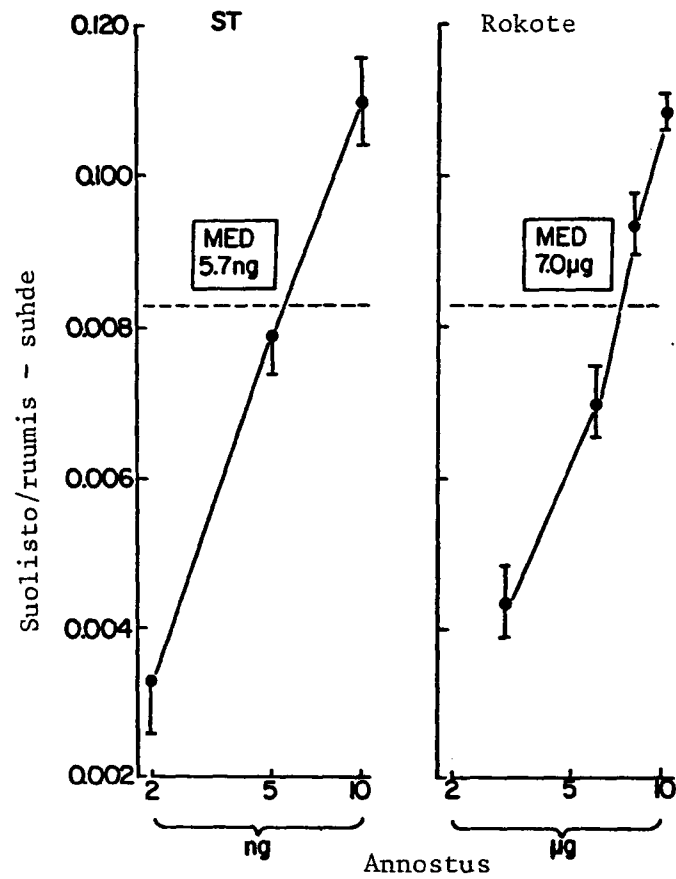


Figure 14

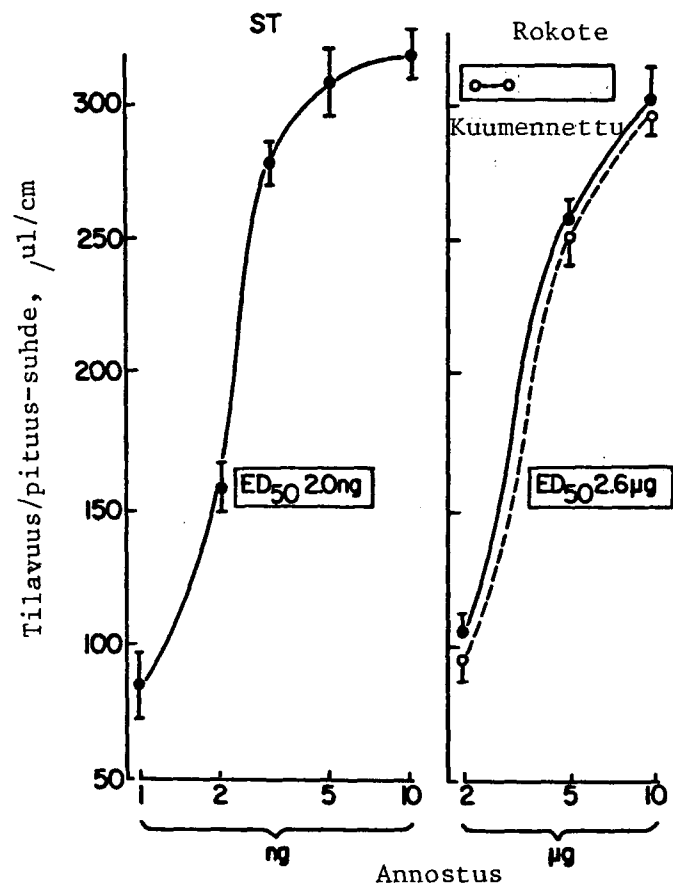


Figure 15

Immunoointi ST x B-rokotteella
suoja rotissa

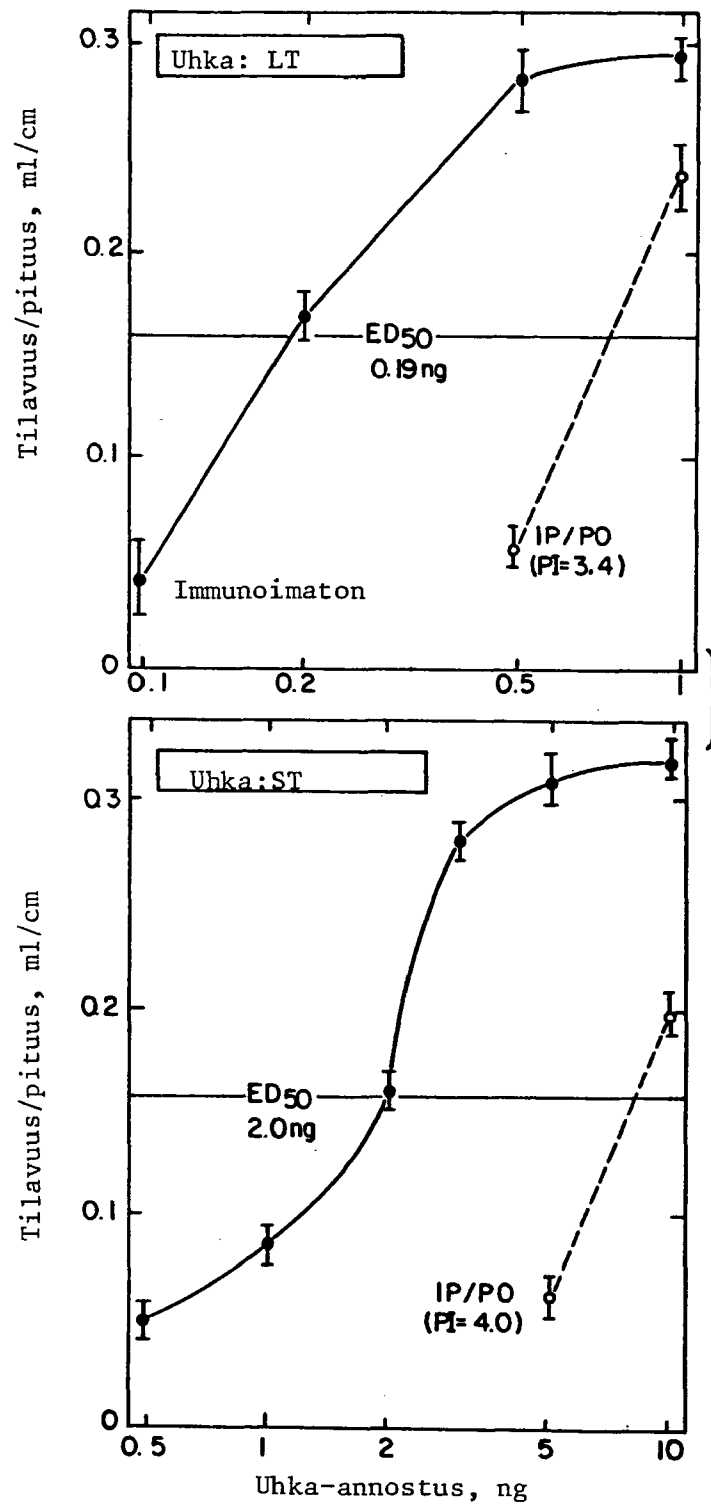


Figure 16

Immunointi ST x B-rokotteella
suoja jäniksissä

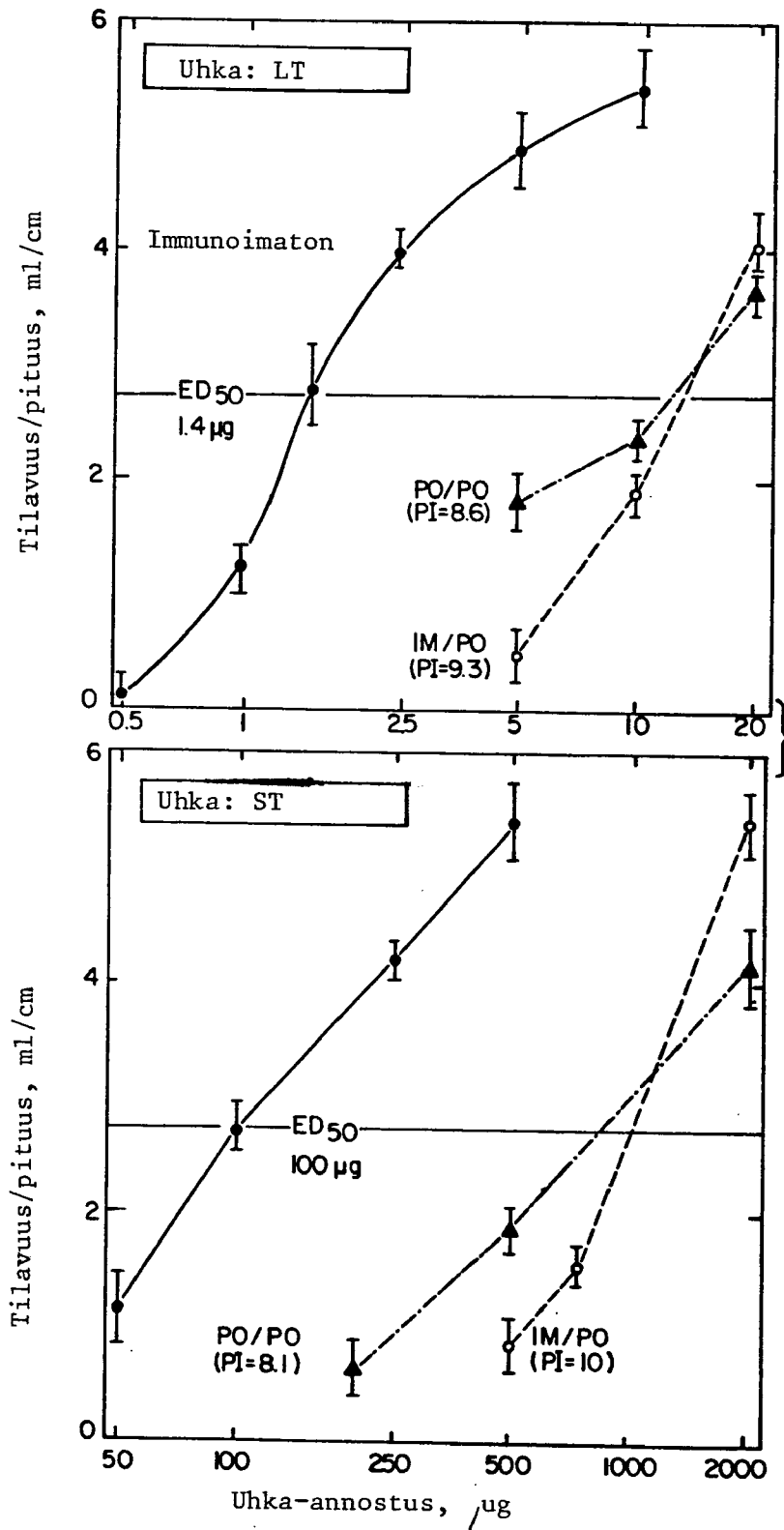


Figure 17

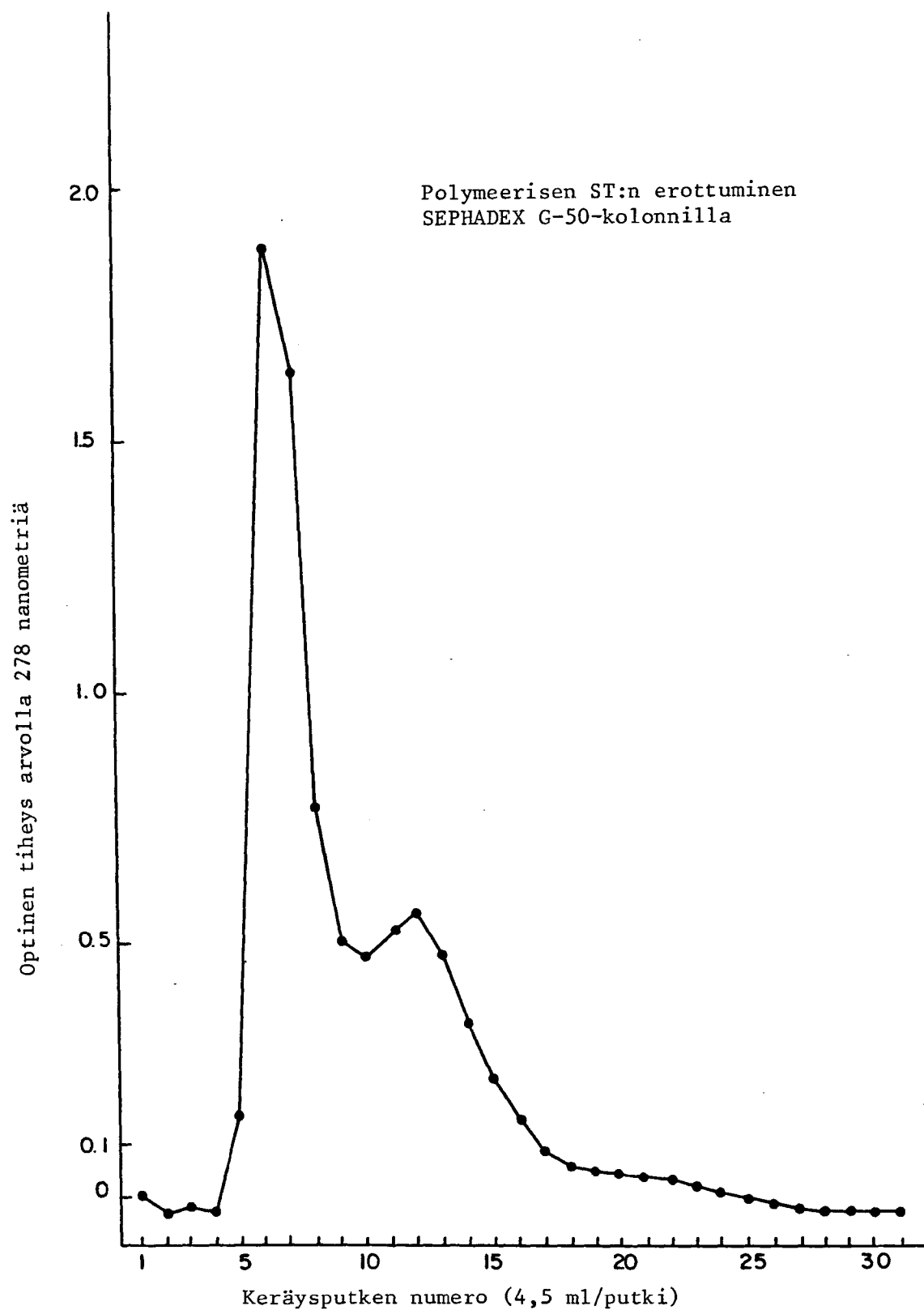


Figure 18

Suoja Klebsiella ST:tä vastaan rokotteella,
joka sisältää synteettistä E. Coli-ST:tä

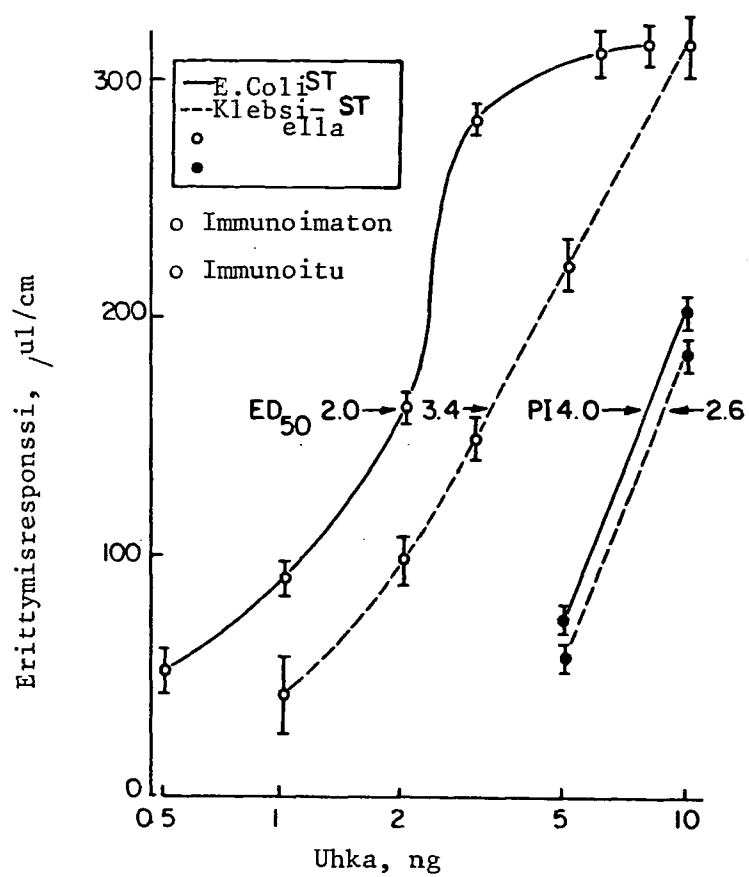


Figure 19

Erilaisten synteettisten ST-valmisteiden antigeenisuus;

Elisa, jossa käytetään antiseerumia M-ST:hen

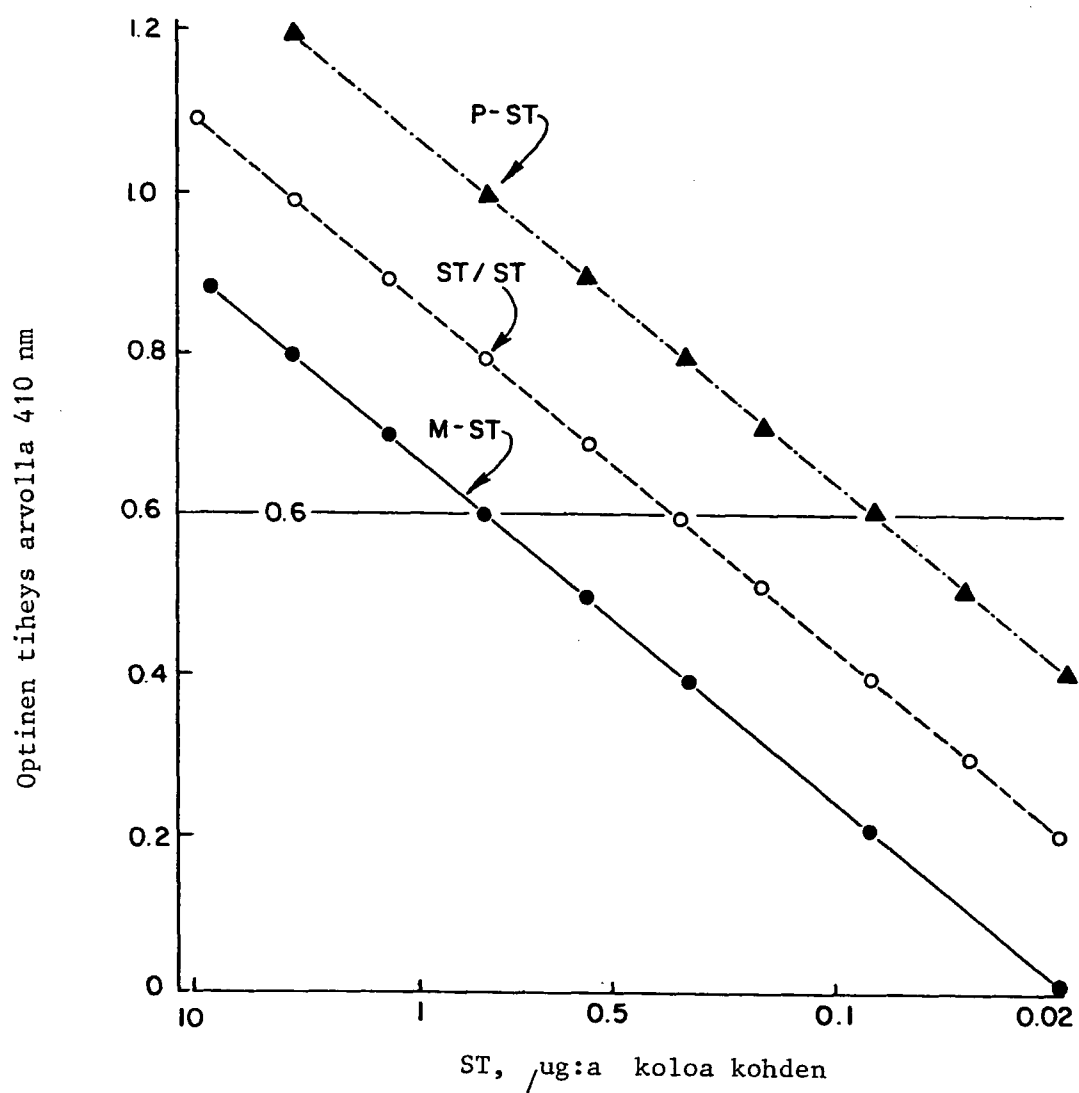


Figure 20

ST x B-konjugaatit, joissa käytetään erilaisia synteettisiä ST-valmisteita

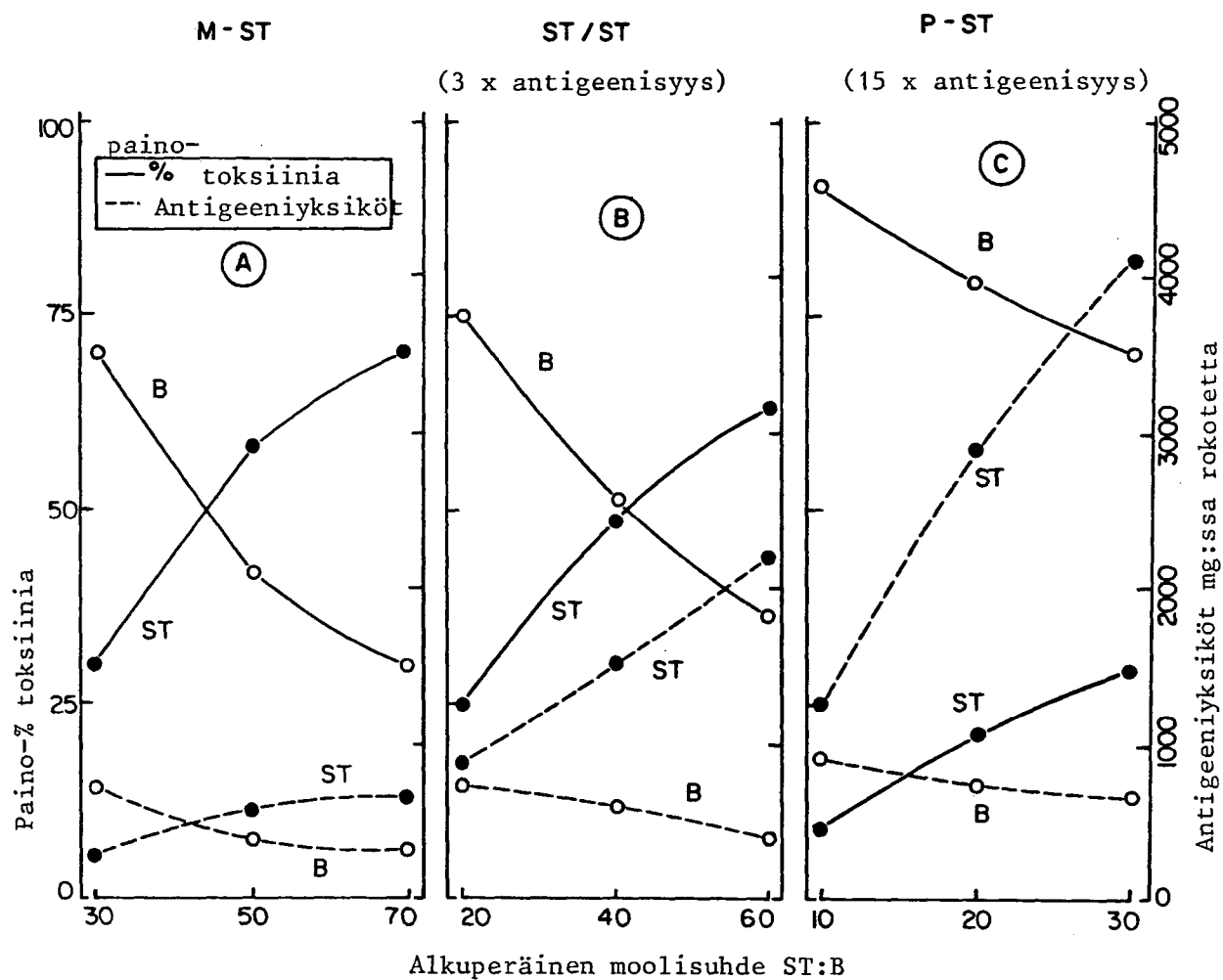


Figure 21

M-ST:n immunogeenisyys P-ST:n funktiona immunoituissa rotissa
 Uhka: LT7ST⁺ E. Coli

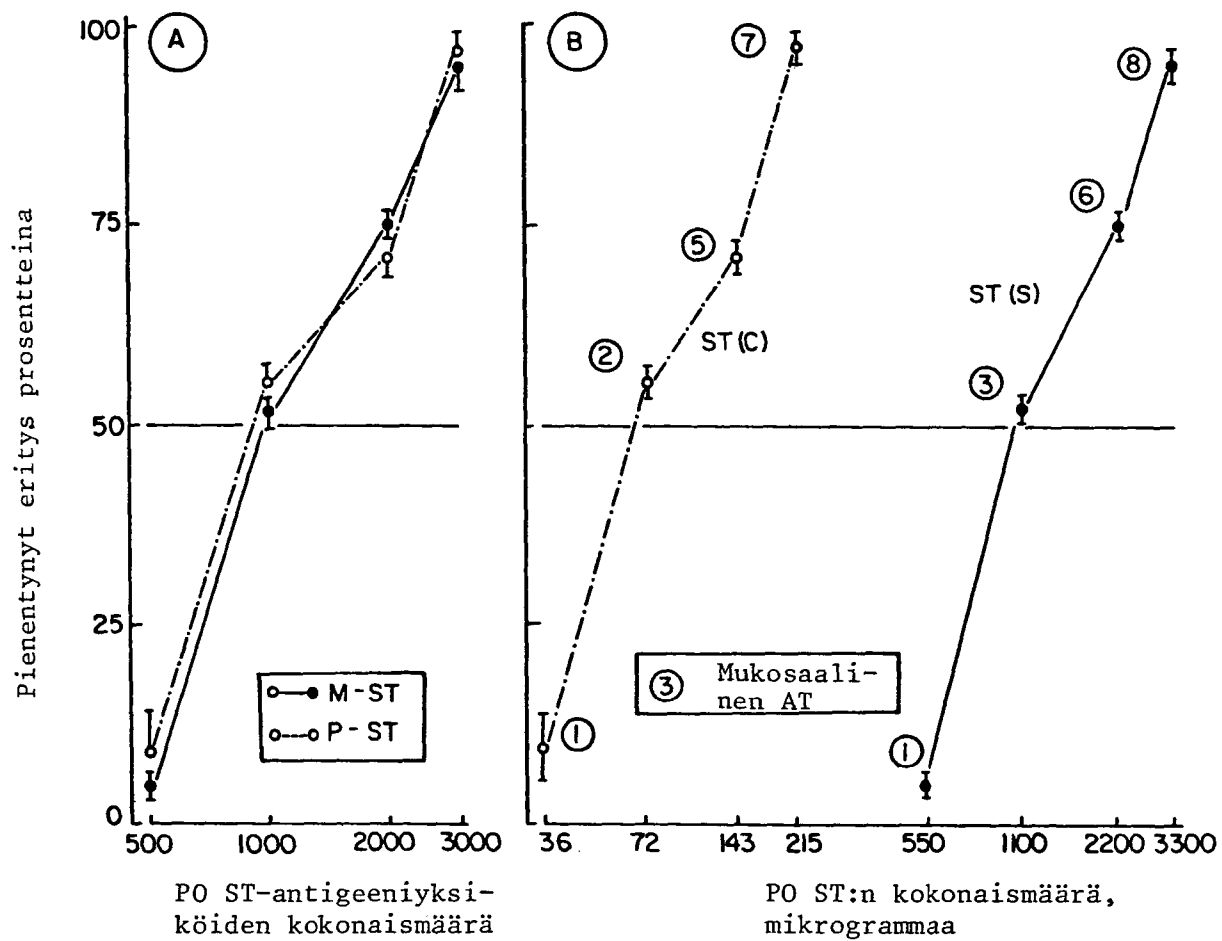
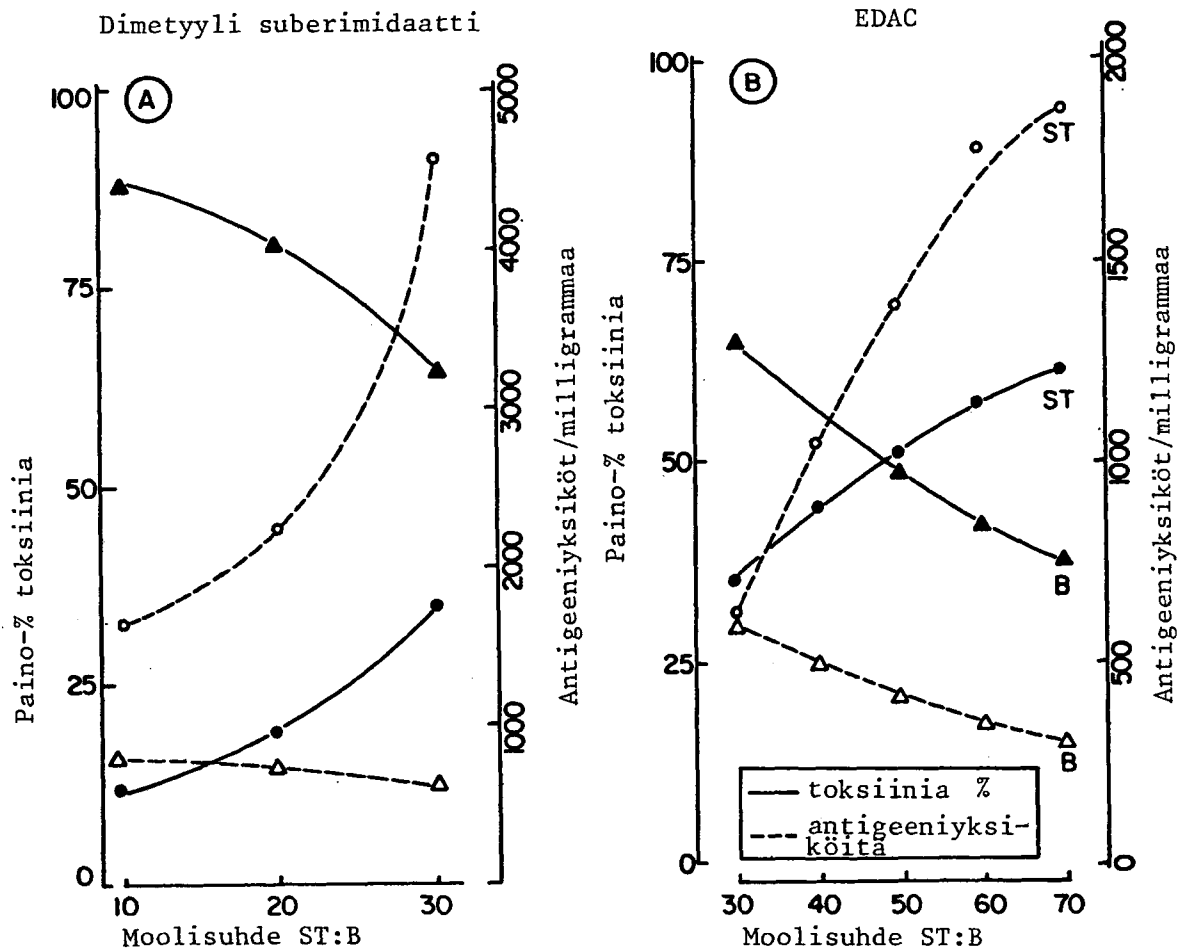


Figure 22

Polymeeriset ST-B-alayksikkö-konjugaatit,
jotka on valmistettu erilaisilla kytkevillä aineilla



Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningar, publiceringar, utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP H 93652 (A 61K 37/02)

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

4/1-90

Päivi Mäkelä

Allekirjoitus