

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 166155 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1919/91

(22) Indleveringsdag: 26 nov 1991

(24) Lebedag: 26 jun 1985

(41) Alm. tilgængelig: 26 nov 1991

(44) Fremlagt: 15 mar 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 2891/85

(30) Prioritet: 26 jun 1984 US 624564

(51) Int.Cl.5

C 07 K 13/00

C 07 K 15/04

C 12 N 15/30

C 12 N 15/70

// C 07 K 7/08

(71) Ansøger: The *United States of America U.S. Department of Commerce; 5285 Port Royal Road; Springfield; Virginia 22161, US

(72) Opfinder: Thomas Frank *McCutchen; US, John Barton *Dame; US, Jackie Lester *Williams; US, Imogene *Schneider; US

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Immunologisk aktive peptider, der er i stand til at fremkalde immunisering mod malaria, malariamodvirkende immunogent stimulerende middel indeholdende disse, anvendelse deraf til fremstilling af et malaraiimmuniserende middel, en DNA-sekvens, der koder for peptiderne, en DNA-kloningsbærer der omfatter DNA-sekvensen samt en E. coli-organisme, der indeholder DNA-sekvensen

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: Nature bind 289 (1981)
side 301-303, Chemical Abstracts bind 99
(1983) nr. 51557p

(67) Sammendrag:

1919-91

Immunologisk aktivt i alt væsentligt rent peptid, der er i stand til i et menneske at fremkalde en immunreaktion, som er krydsreantiv med og beskyttende mod infektion med en malaria-parasit, hvorhos peptidet indeholder en sekvens med formlen Thr-Glu-Trp-Z-Pro-Cys-Ser-Val-Thr-Cys-Gly-Asn-Gly, hvori Z er Ser eller Thr eller formlen Lys-Pro-S-T-S-Lys-Leu-Lys-Gln-Pro-U-V-Gly-W-Pro, hvori S er Lys eller Asn, T er His eller Glu, U er Gly eller Asn, V er Asn eller Glu, og W er Asn eller Gln samt DNA-sekvenser og forskellige andre genetiske materialer som er nyttig ved fremstillingen af disse peptider via biologiske metoder.

DK 166155 B

fortsættes

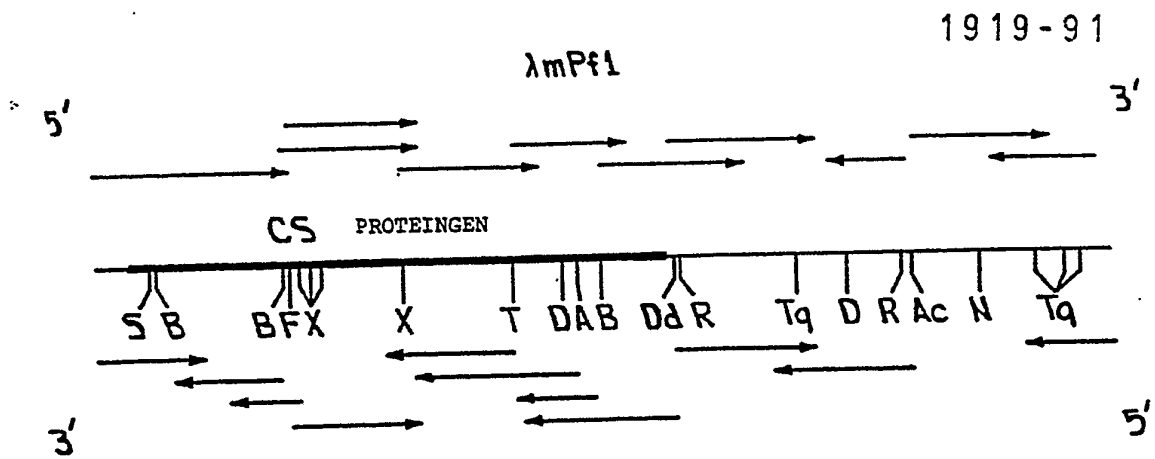


FIG. 1

Den foreliggende opfindelse angår et immunologisk aktivt i alt væsentligt rent syntetisk peptid, der er i stand til hos et menneske at fremkalde en immunreaktion, og som er krydsreaktiv med og beskyttende mod infektioner af en malariaparasit, et
5 malariamodvirkende immunogent stimulerende middel, anvendelse af peptidet til fremstilling af et middel til at fremkalde immunisering mod malaria, en i alt væsentlig ren DNA-sekvens, der koder for peptidet, en rekombinant DNA-kloningsbærer, der omfatter DNA-sekvensen samt en E. coli-organisme, der indeholder DNA-sekvensen.
10

Opfindelsen angår således immunologisk aktive midler, der er i stand til at fremkalde immunreaktioner i mennesker og andre dyr, hvilket resulterer i beskyttelse mod infektioner med malariaparasitter og nærmere bestemt beskyttelsen af mennesker mod human malariaparasitten Plasmodium falciparum.
15

Der er helt klart behov for vacciner til at afhjælpe den nuværende globale genopblussen af malaria. Fordi immunitet mod malaria er stadiumspecifik, er der blevet udviklet vacciner mod hvert stadium i malarialivscyklen: sporozoiter, myggestadiet, som initierer infektion hos mennesker; asexuelle erythrocyt-parasitter, stadiet, som fremkalder sygdommen, samt gameter, stadiet, som overfører infektionerne til myg. Et område af interesse er en sporozoitvaccine, som, hvis den er effektiv, ville påvirke immunsystemet til at dræbe sporozoiter, der er innokuleret af myggen og således hindre de efterfølgende stadier, der er ansvarlige for sygdommen, i overførsel af infektionen til andre.
20
25
30

Dyr og mennesker er tidligere blevet beskyttet ved injektion af bestrålede sporozoiter. Vaccination med bestrålede sporozoiter er imidlertid upraktisk på grund af den begrænsede tilførsel og instabilitet af sporozoiter. Anvendelsen af monoklone antistoffer førte til opdagelsen af det vigtigste overfladeprotein på sporozoiter af Plasmodium berghei, en gnavermalaria (N. Yoshida, R. S. Nussenzweig, P. Potocnjak et al.,
35

Science 207, 71 (1980)). Dette protein dækker overfladen af sporozoiten og betegnes som circumsporozoit (CS)-proteinet. Injektion af monoklone antistoffer mod CS-proteinet af P. berghei beskyttede mus fuldstændigt mod angreb af inficerede myg (P. Potocnjak, R. S. Nussenzweig, V. Nussenzweig, J. Exp. Med. 151, 1504 (1980)). Analoge CS-proteiner er blevet identificeret til arter af abe- og human-malaria, herunder p. falciparum, den vigtigste malaria hos mennesker (F. Santoro et al., J. Biol. Chem. 258, 3341 (1983); E. H. Nardin et al., J. Exp. Med. 156, 20 (1982)), selv om strukturen af P. falciparum-proteinet ikke kendtes forud for den foreliggende opfindelse. Genet for CS-proteinet af abe-malarien, P. kleave, blev klonet først på grund af tilgængeligheden af store antal af P. kleave sporozoiter i inficerede myg til fremstillingen af et cDNA-bibliotek J. Ellis (L. S. Ozaki, R. W. Gwadz et al, Nature 302, 536 (1983); G. N. Godson, J. Ellis, P. Svec et al., Nature 305, 29 (1983)). Dette gen kodede for et protein med en gentagende aminosyresekvens (12 aminosyrer gentaget 12 gange), som indeholdt den epitop, som binder de beskyttende monoklone antistoffer. Denne gentagende epitop var det væsentligste immunogen på proteinet, da monoklone antistoffer blokerede adgang for polyklone anti-sporozoit-sera til "Triton X-100" opløseliggjort protein i den immunoradiometriske prøve (F. Zavala, A. H. Cochrane, E. H. Nardin et al., J. Exp. Med. 157, 1947 (1983)).

Der er imidlertid fortsat behov for et antigen stof, der er beslægtet med CS-proteinet af en human-malariaparasit, da antistoffer, der tidligere er blevet fremstillet mod denne gentagende epitop fra abeparasitter, ikke kan reagere med human-malariaparasitter.

Det er derfor formålet med opfindelsen at tilvejebringe en syntetisk peptidsekvens, der er i stand til at fremkalde en mod malaraiainfektion beskyttende immunreaktion i mennesker.

Det er et andet formål med opfindelsen at tilvejebringe en DNA-sekvens, der er i stand til at udtrykke antigen stof med

sådanne egenskaber.

Disse og andre formål med opfindelsen er, som det vil fremgå tydeligere af det følgende, blevet opfyldt ved tilvejebringelse af et immunologisk aktivt, i alt væsentligt rent, syntetisk peptid, som i et menneske er i stand til at fremkalde en immunreaktion enten alene eller når det er bundet til et bæremolekyle, og som er krydsreaktiv med og beskyttende mod infektioner med en malariaparasit, hvilket peptid er ejendommeligt ved, at det indeholder en sekvens med formlen Thr-Glu-Trp-Z-Pro-Cys-Ser-Val-Thr-Cys-Gly-Asn-Gly, hvori Z er Ser eller Thr, eller formlen Lys-Pro-S-T-S-Lys-Leu-Lys-Gln-Pro-U-V-Gly-W-Pro, hvori S er Lys eller Asn, T er His eller Glu, U er Gly eller Asn, V er Asp eller Glu, og W er Asn eller Gln.

Opfindelsen angår også et malariamodvirkende immunogent stimulerende middel, der er ejendommeligt ved, at det omfatter et peptid ifølge opfindelsen bundet til en immunogen bærer.

Opfindelsen angår endvidere anvendelse af et peptid ifølge opfindelsen til fremstilling af et middel til at fremkalde immunisering mod malaria.

Opfindelsen angår desuden en i alt væsentligt ren DNA-sekvens, der koder for peptidet ifølge opfindelsen.

Desuden angår opfindelsen en rekombinant DNA-kloningsbærer, der er ejendommelig ved, at den omfatter nævnte DNA-sekvens.

Endelig angår opfindelsen en E. coli-organisme, der indeholder den nævnte DNA-sekvens, og som er ejendommelig ved, at DNA-sekvensen er blevet kunstigt indført i organismen, og at organismen er i stand til at udtrykke et immunologisk aktivt peptid, der er i stand til hos et menneske at fremkalde en immunreaktion, som er krydsreaktiv med og beskyttende mod en malariaparasit.

Nature bind 289 (1981), side 301 -303 beskriver antigener fra Plasmodium falciparum, der kan påvises af monoklonale antistoffer, som hindrer vækst af Plasmodium falciparum. Artiklen anviser immunisering af mus med de naturligt forekommende P. falciparum-antigener udvundet fra en patient med malaria. Chemical Abstracts bind 99 (1983) nr. 51557p beskriver circumsporozoit-proteiner af Plasmodium falciparum. Disse proteiner er multivalente med hensyn til en enkelt epitop, idet monomerer af proteinerne kan binde to eller flere molekyler af det samme antistof. Referencen angiver imidlertid tydeligt, at størstedelen af den immunogene aktivitet hos P. falciparum, P. vivax og P. knowlesi er placeret i CS-proteinet. Begge de nævnte referencer anviser imidlertid alene naturligt forekommende CS-proteiner som antigener og beskæftiger sig således ikke med syntetiske proteiner. Det har nu vist sig, at hele CS-proteinstrukturen ikke er nødvendig til opnåelse af antigenisk aktivitet, idet der kan fremstilles specifikke sekvenser syntetisk, hvilke sekvenser er dem, der er af vigtig betydning til at fremkalde immunisering mod malaria. Kendskabet til, hvorledes disse syntetiske peptider skal være sammensat er af særlig nytte, idet sådanne let kan fremstilles ved genteknologi. Dette giver mulighed for at fremstille store mængder af det immunogene protein og gør det således let af fremstille store mængder af malariavaccine. Da de nævnte referencer ikke anviser hvilke sekvenser, der er betydningsfulde for immunreaktionen, kan man ikke på samme lette måde fremstille malariavaccine på basis af de anvisninger, der fremgår af ovennævnte referencer fra Nature og Chemical Abstracts.

En nærmere forståelse af opfindelsen og mange af de heraf følgende fordele vil let kunne forstås efter gennemgang af den følgende detaljerede beskrivelse i forbindelse med tegningerne, hvori

fig. 1 viser et skematisk restriktionskort og sekventeringsstrategi for klon λ mPfl. Positionerne af restriktionsenzymkløvningsstederne, der er vist i figuren, blev bestemt ud fra

sekvensen og bekræftet ved digestion: A. *Ava*II; Ac. *Acc*I; B. *Bst*NI; D. *Dra*I; Dd. *Dde*I; F. *Fok*I; N. *Nde*I; R. *Rsa*I; S. *Stu*I; T. *Tth*III; Tq. *Taq*I; X. *Xho*II. Pile viser udgangspunktet, retningen og omfanget af de bestemte sekvenser. Den CS-proteinkodende region er vist ved en optrukket linie.

Fig. 2 viser nucleotidsekvensen af CS-proteingenet fra *P. falciparum*. Nucleotidsekvensen af CS-proteingenet i λ MPf1 er vist. Det indsatte stykke *Eco*R1 i λ MPf1 blev subklonet i pUC8 og derpå sekventeret. Sekvensen af begge DNA-strengene blev bestemt for 100% af den CS-proteinkodende region og over 70% af de flankerende regioner. De indsatte stykker af kloner λ MPf5, 8, 13 og 15 blev også subklonet i pUC8 og enderne sekventeret. Den første base af hver klon 5' til den CS-proteinkodende region er anbragt til højre for pilene. *Eco*R1-koblerne (GGAATTCC), der er ligeret i begge ender af de indsatte stykker, er ikke vist som en del af sekvensen. Den udledte aminosyresekvens af CS-proteinet er givet nedenfor nucleotidsekvensen. To regioner af proteinet fra *P. falciparum*-homologe til *P. Knowlesi* CS-proteinet er mærket region I og region II. Gentagelsesenhederne er understreget, og de afvigende aminosyrer i enhederne er i kasser. Den gule terminator-kodon i sekvensen er angivet med stjerner.

Fig. 3 viser i grafisk form data, som viser inhibering af binding af monoklont anti-CS-proteinantistof, 2F1.1, ved hjælp af syntetiske peptider af den dominerende gentagende aminosyresekvens. Syntetiske peptider, der indeholder voksende længder af den dominerende gentagelsessekvens, blev fremstillet og anvendt til at inhibere binding af 2F1.1 til et lysat af λ MPf1, der vokser i Y1089. Dataene er angivet som middeltallet \pm SE af tre replikationer. De syntetiske sekvenser, der blev undersøgt, var Asn-Pro-Asn-Ala (_____), Pro-Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala (o_____o), Pro-Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala (Δ _____ Δ), Pro-Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala (X_____X), og et ubeslægtet decapeptid (•_____•).

Fig. 4 viser formler af homologiregioner mellem CS-proteinerne P. falciparum og P. knowlesi. Region I ender to aminosyrer fra gentagelsesdelen af proteinet i P. falciparum. I P. Knowlesi er mindst 3 aminosyrer af denne region en del af protei-
nets gentagelsesdel.

Den foreliggende opfindelse opstod delvis ud fra opdagelsen af egenskaberne og strukturen af de immunologisk aktive segmenter af CS-proteinet fra P. falciparum. Opfinderne har bekræftet, at monoklone antistoffer, der kan reagere med CS-proteinet af P. falciparum, er rettet mod gentagelsesenheder, der findes i proteinet. Nu hvor disse gentagelsesenheder (og andre regioner af CS-proteinet, som viser sig at være invariante regioner, der findes i adskillige plasmodium-arter) er blevet identificeret, er det muligt ved hjælp af enten syntetisk-kemiske midler eller ad biologisk vej at fremstille peptider, der indeholder disse immunodominantregioner, som udgør grundlaget for vacciner.

Den foreliggende opfindelse omfatter følgelig et immunologisk aktivt, i alt væsentligt rent, syntetisk peptid, der er i stand til i et menneske at fremkalde en immunreaktion enten alene eller bundet til et bæremolekyle, som er krydsreaktivt med og beskyttende mod infektion med en malariaparasit, hvorhos peptidet indeholder en sekvens med formlen Thr-Glu-Trp-Z-Pro-Cys-Ser-Val-Thr-Cys-Gly-Asn-Gly, hvori Z er Ser eller Thr, eller formlen Lys-Pro-S-T-S-Lys-Leu-Lys-Gln-Pro-U-V-Gly-W-Pro, hvori S er Lys eller Asn, T er His eller Glu, U er Gly eller Asn, V er Asp eller Glu, og W er Asn eller Gln. En tilsvarende virkning har et peptid, der indeholder mindst to på hinanden følgende gentagelser af en sekvens Asn-X-Y-Pro, hvor X er Ala eller Val, og Y er Asn eller Asp. Sidstnævnte peptid er beskrevet i DK patentansøgning nr. 2891/85. Der er følgelig mindst tre variationer af peptider, som har den ønskede immunologiske karakter: (1) et peptid, som indeholder gentagelsesenhederne, men ikke de længere sekvenser; (2) et peptid, som indeholder et eller begge de to længere sekvenser (heri ofte

benævnt som region I og region II), og (3) et peptid, der indeholder både gentagelsesenhederne og en af eller begge sekvenserne, der er identificeret som region I og region II.

5 Udtrykket "syntetisk" anvendes heri til at betegne, at det tidligere kendte CS-protein fra *P. falciparum* er specielt udelukket fra peptider ifølge opfindelsen, når det foreligger i naturlig tilstand. Den foreliggende opfindelse bygger delvis på opdagelsen af strukturen af epitoperne af CS-proteinet og på den evne, som antistofferne mod disse epitoper har til at frembringe immunitet mod malaria. Da epitopens struktur blev kendt, blev det muligt at konstruere syntetiske peptider, der er nyttige som vacciner. Syntetisk udelukker imidlertid ikke her produktionen ved hjælp af biologiske metoder, hvori mennesker har intervenseret, f.eks. ved anvendelse af genteknik.

10 En afgørende egenskab hos alle peptider ifølge opfindelsen er, at de er immunologisk aktive og i stand til at fremkalde en human reaktion, som er krydsreaktiv overfor infektion med en malariaparasit enten alene eller bundet til et bæremolekyle. Det er derfor nødvendigt at i det mindste en del af de opregnede sekvenser findes på en immunogent tilgængelig overflade af et peptid, der indeholder en eller flere af disse sekvenser. Der findes flere metoder til opbygning af et peptid med disse egenskaber.

25 For det første er det muligt kemisk eller biokemisk at syntetisere et peptid, hvori peptiderne består i alt væsentligt af de opregnede sekvenser. Sådanne peptider plejer at indeholde mindst 10% af deres aminosyrer i de opregnede sekvenser, fortrinsvis mindst 40%, og især mindst 60%, og særligt fordelagtigt mindst 80%. Især foretrækkes peptider, som består fuldstændigt af de opregnede sekvenser (sammen med peptider, der kan betragtes som bestående af den opregnede gentagelsessekvens, hvori 1 - 3 terminalaminosyrer af peptidet mangler fra den ene eller begge ender af peptidet).

Det er også muligt at konstruere peptider, hvori de opregnede sekvenser af aminosyrer findes på overfladen af slutpeptidet. Dette kan ske f.eks. ved at vedhæfte en eller flere af de opregnede sekvenser til en overflade af et forud fremstillet peptid ved hjælp af en peptidbinding.

Selv i det tilfælde, hvor en eller flere af de opregnede sekvenser er indeholdt i det indre af aminosyresekvensen af et større syntetisk peptid eller protein, kan fagfolk på immunologiområdet let bestemme, om peptidet falder inden for den foreliggende opfindelses omfang. Kun de peptider, som kan reagere med antistoffer, der er fremkaldt mod CS-proteiner, antages at falde indenfor den foreliggende opfindelses omfang. Fagfolk på området kan derfor let syntetisere et peptid som indeholder en af sekvenserne ifølge den foreliggende opfindelse og derpå rutinemæssigt bestemme, hvorvidt det færdige produkt falder indenfor den foreliggende opfindelses omfang eller ej ved omsætning af proteinet med et antistof (fortrinsvis et monoklont antistof) fremkaldt mod et CS-protein, fortrinsvis et CS-protein af *P. falciparum*, eller mod et peptid, som består i alt væsentligt eller fuldstændigt af én af de sekvenser, som specielt er angivet i den foreliggende tekst. Hvis der foregår en positiv immunologisk reaktion, falder proteinet indenfor den foreliggende opfindelses omfang. Antistoffer, der kan reagere med CS-proteinet af *P. falciparum*, er offentligt og let tilgængelige, idet de f.eks. produceres ved hjælp af deponeret hybridoma-cellelinie ATCC HB8583, som danner antistoffet, der heri er identificeret som 49.2F1.1.

Der er ikke nogen øvre grænse for størrelsen af molekyler ifølge opfindelsen, bortset fra de grænser, som udgøres af evnen til at syntetisere store peptidmolekyler. Molekyler ifølge opfindelsen kan være enten opløselige eller uopløselige i vandige opløsninger. I virkeligheden omfatter en foretrukket udførelsesform for opfindelsen syntesen af højmolekylære, uopløselige peptider, der kan formales og injiceres som en vandig suspension for at fremkalde immunologisk beskyttelse. Mindre

molekyler er ikke desto mindre også velegnede til gennemførelse af opfindelsen. Molekyler, der indeholder 100, 200, 400 eller endog 1.000 gentagelsesenheder er velegnede til udøvelse af den foreliggende opfindelse. Der synes imidlertid ikke at være behov for syntetisering af peptider, der indeholder flere end 50 gentagelsesenheder, da peptider, der indeholder indtil 50 gentagelsesenheder, vil være tilstrækkelig til at fremkalde den ønskede immunologiske effekt og er lettere at syntetisere. Molekyler med 20 - 50 gentagelsesenheder foretrækkes især. Peptider, som indeholder indtil 50 gentagelsesenheder, hvori gentagelsesenhederne udgør mindst 40% og især 80% af hele peptidet, foretrækkes. Af de mulige gentagelsesenheder foretrækkes især Asn-Ala-Asn-Pro, medens gentagelsesenheden Asn-Val-Asp-Pro er den dernæst mest foretrukne sekvens. Peptider, hvori mindst 80% af gentagelsesenhederne er Asn-Ala-Asn-Pro, idet resten er Asn-Val-Asp-Pro, foretrækkes især.

En særligt foretrukket peptidsekvens til peptider, der indeholder gentagelsesenhederne, er et peptid, som består i alt væsentligt af sekvensen A-B-A-B-A-B(A)15-B-(A)x, hvori A betegner Asn-Ala-Asn-Pro, B betegner Asn-Val-Asp-Pro, og x er 0-30, fortrinsvis 15-25, og særligt fordelagtigt 20.

Når et peptid ifølge opfindelsen indeholder en af sekvenserne, der ikke specielt er angivet som en krævet gentagelsesenhed (selv om disse sekvenser naturligvis kan gentages om ønsket) foretrækkes peptider, hvori Z er Ser, S er Lys, T er His, U er Gly, V er Asp, og W er Asn. Af de to opregnede længere sekvenser foretrækkes peptider, der indeholder sekvensen Thr-Glu-Trp-Z-Pro-Cys-Ser-Val-Thr-Cys-Gly-Asn-Gly (dvs. region II).

Når der syntetiseres et peptid ifølge opfindelsen, som indeholder både gentagelsessekvenserne og en eller flere af peptidsekvenserne, der er identificeret som region I eller region II, indeholder de peptider, som foretrækkes, fra 2 til 50 af gentagelsesenhederne efterfulgt af en peptidsekvens, der indeholder region II-sekvensen og har forud en peptidsekvens,

Med fremkomsten af moderne peptidsyntetiseringsmidler (hvoraf mange er kommercielt tilgængelige) er det naturligvis i voksende grad blevet lettere at syntetisere enten komplette store peptidmolekyler eller at syntetisere store fragmenter, som derpå kan sammenknyttes.

Før en beskrivelse af de genetiske (biologiske) metoder til syntetisering af peptider ifølge opfindelsen vil det være nyttigt at betragte en foretrukket udførelsesform for opfindelsen, hvori evnen af peptiderne ifølge opfindelsen til at fremkalde immunologisk reaktion forøges ved binding af et eller flere af peptiderne ifølge opfindelsen til en immunogen bærer. Det resulterende produkt med forøget immunogenicitet betegnes heri som et antimalaria-immunogent stimuleringsmiddel.

Anvendelsen af immunogene bærere til at forøge immunogeniciteten af små molekyler er velkendt. Bærere deles principielt i to klasser, nemlig opløselige molekyler og partikler. Typiske eksempler på opløselige molekyler er proteiner og polysaccharider. Typiske eksempler på partikler er liposomer og bakterieceller eller dele deraf, såsom membraner. Hele celler dræbes almindeligvis eller deres reproduktion hindres for at undgå problemer i forbindelse med infektion.

I alle tilfælde er den faktiske struktur af bæreren uden betydning, da det er bærerens størrelse, der bevirker forøgelse af den immunogene reaktion. Når opløselige makromolekyler, såsom proteiner og polysaccharider, anvendes som bærere, foretrakkes molekylvægte i intervallet fra 10.000 til 1.000.000. Hvis størrelsen er tilstrækkelig stor, kan protein- eller polysaccharidebæreren være uopløselig og således betragtes som et partikelformet stof.

Fremgangsmåden til vedhæftning af et peptid til bæreren er forholdsvis uinteressant, når blot peptidets immunogene specificitet bevares i det mindste delvis. En foretrukket metode til opnåelse af dette resultat er at hæfte et peptid til bæreren

ved hjælp af en amidbinding, dannet mellem en carboxylsyre eller aminogruppe fra bæreren og en amino- eller carboxylsyregruppe a peptidet, især en fri carboxylsyre- eller aminoterminialgruppe af peptidet. En anden foretrukket bindingsmetode er dannelsen af en esterbinding mellem en carboxylsyre- eller hydroxygruppe fra bæreren og en hydroxy- eller carboxylsyregruppe fra peptidet, fortrinsvis en terminalcarboxylsyregruppe fra peptidet. Bindingsgrupper, f.eks. terminaldiaminer med 1 - 10 methylencarbonatomer, som forbinder aminerne, kan anvendes om ønsket.

Når der anvendes en bærer, kan immunreaktionen forøges ved at binde flere peptider til bærerens overflade. Der kan f.eks. bindes fra 1 til 100.000 peptider til et protein eller et polysaccharid, idet 100 - 10.000 foretrækkes. Når proteiner anvendes som bærer, foretrækkes amfotere proteiner. Sådanne proteiner har en lipofil del og en hydrofil del. I sådanne proteiner foretrækkes det at binde peptider ifølge opfindelsen til den hydrofile del og derved udsætte dem for det humorale miljø, når den lipofile del bliver indlejret i forskellige membraner.

Et foretrukket protein til anvendelse som bærer er tetanus-toxoid, en rutinemæssigt anvendt vaccine, som er et stof som tidligere er blevet foreslået til anvendelse som immunogen bærer.

Den foretrukne udførelsesform, som er angivet ovenfor til brug med makromolekylebærere, egner sig også til brug i forbindelse med partikelformede bærere bortset fra, at den øvre grænse for peptider pr. bærer er ca. 10^{15} , fortrinsvis 10^{10} . Bakterieceller (dræbte eller på anden måde hindret i at reproducere) er de foretrukne partikelformede stoffer.

Når peptider, som nøje ligner det naturlige CS-protein fra *P. falciparum*, ønskes, foretrækkes det at syntetisere peptidet biologisk under anvendelse af et gen, der er forbundet med el-

ler afledt af CS-proteingenet af *P. falciparum*. De resulterende genprodukter kan derpå modificeres, f.eks. ved kløvning af terminalaminosyrer.

5 Fremkomsten af rekombinant DNA-teknologien har i den senere tid ført til en hurtig forøgelse af antallet af teknikker, som er tilgængelige til fremstilling af klonede genprodukter. Eksempler på nyere amerikanske patentskrifter, hvori der er beskrevet metoder, som er velegnede til produktion af klonede ge-

10 ner, der er velegnede til anvendelse i forbindelse med den foreliggende opfindelse omfatter US-patentskrifterne nr. 4.419.450, 4.418.194, 4.414.150, 4.399.216, 4.394.443, 4.356.270, 4.351.901 og 4.237.224. Det er naturligvis også muligt at modificere de deri beskrevne teknikker ved syntetisering af DNA-sekvenser, som er i stand til at udtrykke det

15 ønskede peptidprodukt og indføre dem i egnede kloningsvektorer, som beskrevet i US-patentskrifterne nr. 4.273.875, 4.304.863, 4.332.901, 4.403.036, 4.363.877 og 4.349.629. I det følgende beskrives generelt metoder, der involverer genetisk manipulation og som er velegnet til anvendelse i forbindelse

20 med den foreliggende opfindelse.

Genetisk information indkodes på dobbelt-strengt deoxyribonucleinsyre ("DNA" eller "gener") i form af den rækkefølge,

25 hvori den DNA-kodende streng præsenterer de karakteristiske baser i dens gentagende nucleotidkomponenter. "Ekspression" af den indkodede information til dannelse af polypeptider omfatter en totrinsproces.

30 I overensstemmelse med visse kontrolregioners ("reguloner"), diktater i genet, kan RNA-polymerase bringes til at bevæge sig langs den kodende streng under dannelse af messenger-RNA (ribonucleinsyre) i en proces, der kaldes "transcription". I et efterfølgende translationstrin omdanner cellens ribosomer

35 sammen med transfer-RNA mRNA-"meddelelsen" til polypeptider. I den information, mRNA transcriberer fra DNA, er signaler for starten og termineringen af ribosomal translation såvel

som identiteten og sekvensen af de aminosyrer, som udgør polypeptidet. Den DNA-kodende streng omfatter lange sekvenser af nucleotid-tripletter, kaldet "codoner", fordi de karakteristiske baser af nucleotiderne i hver triplet-codon indkoder specifikke informationsstykker. Tre nucleotider, der læses som ATG (adenin-thymin-guanin), resulterer f.eks. i et mRNA-signal, der fortolkes som "start translation" -, medens termineringscodoner TAG, TAA og TGA fortolkes som "stop translation". Mellem start- og stop-codonerne ligger det såkaldte strukturelle gen, hvis codoner definerer aminosyresekvensen, der translateres i sidste instans. Denne definition forløber i overensstemmelse med den veletablerede "genetiske kode" (f.eks. J. D. Watson, Molecular Biology of the Gene, W. A. Benjamin Inc., N.Y., 3. udgave (1976)) som beskriver codonerne for de forskellige aminosyrer. Den genetiske kode er degenere-ret i den forstand, at forskellige codoner kan give den samme aminosyre, men nøjagtig ved, at der for hver aminosyre er én eller flere codoner for denne og ingen anden. F.eks koder alle codonerne TTT, TTC, TTA og TTG når de læses som sådanne, således for serin og ingen anden aminosyre. Under translation skal den passende læsefase eller læseramme opretholdes. Overvej f.eks. hvad der sker, når ribosomet læser forskellige baser som begyndelsen af en codon (understreget) i sekvensen

25

. . . GCTGGTTGTAAG....:

...GCT GGT TGT AAG ...-----Ala-Gly-Cys-Lys... G CTG

30

GTT GTA AG ...-----Leu-Val-Leu...

...GC TGG TTG TAA A ...-----Trp-Leu-(STOP).

35

Det til sidst dannede polypeptid afhænger således vitalt af den rumlige sammenhæng af det strukturelle gen med hensyn til regulonen.

En bedre forståelse af fremgangsmåden til genetisk ekspression kommer, når man definerer visse komponenter af gener:

5 Operon: Et gen, der omfatter et eller flere strukturelle gener til polypeptidekspression og kontrolregionen ("regulon"), som regulerer denne ekspression.

10 Promotor: Et gen i regulonen, hvortil RNA-polymerase skal binde til transcriptionsinitiering.

Operator: Et gen, hvortil repressorprotein kan binde, hvorved hindres RNA-polymerasebinding på den nærliggende promotor.

15 Inducer: Et stof, som deaktiverer repressorprotein, frigør operatoren og lader RNA-polymerase binde til promotoren og begynde transcription.

20 Katabolit-aktivator-protein ("CAP") bindingssted: Et gen, som binder cyklisk adenosinmonophosphat ("cAMP)-formidlet CAP, også almindeligt krævet til transcriptionsinitiering. CAP-bindingsstedet kan i særlige tilfælde være unødvendigt. En promotormutation i lactose-operonen af phagen λ plak UV5 eliminerer f.eks. kravet for cAMP- og CAP-ekspression. J. Beckwith et al., J. Mol. Biol. 69, ISS160 (1972).

25 Promotor-operator-system: Betyder heri en operabel kontrolregion af et operon, med eller uden hensyn til dets inklusion af et CAP-bindingssted eller evne til at kode for repressorprotein-ekspression.

30 Til definition og anvendelse ved den følgende diskussion af rekombinant-DNA defineres desuden følgende:

35 Kloningsbærer: Ikke-kromosomal, dobbeltstrenget DNA, der omfatter et intakt "replikon", således at bæreren replikeres, når den anbringes i en encellet organisme ("mikrobe") ved hjælp af en "transformations"-proces. En således transformeret organisme kaldes en "transformant".

Plasmid: I det foreliggende tilfælde en kloningsbærer afledt af vira eller bakterier, idet sidstnævnte er "bakterielle plasmider".

5 Komplementaritet: En egenskab, der overføres af basesekvenserne af enkeltstrenget DNA, som tillader dannelsen af dobbeltstrenget DNA gennem hydrogenbinding mellem komplementære baser på de respektive strenge. Adenin (A) komplementerer thymin (T), medens guanin (G) komplementerer cytosin (C).

10

Fremskridt på det biokemiske område i de seneste år har ført til konstruktionen af "rekombinant"-kloningsbærere, hvori f.eks. plasmider laves til et bestemt eksogent DNA. I særlige tilfælde kan rekombinanten omfatte "heterologt" DNA, hvormed 15 menes DNA, som koder for polypeptider, som ikke normalt dannes af den organisme, som er modtagelig for transformation af den rekombinante bærer. Plasmider kløves således til dannelsen af lineær DNA med ender, der kan liggeres. Disse bindes til et eksogent gen med liggerbare ender til dannelsen af en biologisk 20 funktionel del med et intakt replikon og en ønsket phenotypegenskab. Rekombinantdelen indsættes i en mikroorganisme ved transformation, og transformanter isoleres og klones med henblik på opnåelse af store populationer, der er i stand til at udtrykke den nye genetiske information. Metoder og midler til 25 dannelsen af rekombinantkloningsbærere og transformering af organismer hermed er beskrevet indgående i litteraturen. Se f.eks. H.L. Heynecker et al., Nature 263, 748-752 (1976); Cohen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2110 (1972); *ibid.*, 70, 1293 (1973), *ibid.*, 70, 3240 (1973), *ibid.*, 71, 1030 (1974); 30 Morrow et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1743 (1974) og Jackson et al., *ibid.*, 69, 2904 (1972). En almen diskussion af emnet findes i S. Cohen, Scientific American 233,24 (1975). Disse og andre publikationer som omtales heri skal anses for inkorporeret i den foreliggende tekst ved henvisningen dertil.

35

Der er en række teknikker til rådighed for DNA-rekombination, ved hjælp af hvilke tilstødende ender af særskilte DNA-frag-

menter skræddersys på den ene måde eller den anden for at lette ligering. Sidstnævnte udtryk refererer til dannelsen af phosphodiesterbindinger mellem tilstødende nucleotider, oftes ved hjælp af enzymet T4 DNA-ligase. Stumpe ender kan således ligeres direkte. Fragmenter, som indeholder komplementære enkeltstrengene ved deres tilstødende ender, fremmes alternativt ved hydrogenbinding, der bringer de respektive ender i stilling til efterfølgende ligering. Sådanne enkeltstrengene, der betegnes som cohæsive termini, kan dannes ved addition af nucleotider til stumpe ender under anvendelse af terminal transferase og under tiden simpelt hen ved at tilbagetygge en streng af en stump ende med et enzym, såsom λ -exonuclease. Igen kan man, mest almindeligt, gribe til restriktionsendonucleaser, som kløver phosphodiesterbindinger i og omkring unikke sekvenser af nucleotider med en længde på ca. 4 - 6 baser. Mange restriktionsendonucleaser og deres genkendelsessteder kendes, idet den såkaldte Eco RI-endonuclease anvendes i størst omfang. Restriktionsendonucleaser, som kløver dobbeltstrenget DNA ved rotationssymmetriske "palindromer" efterlader cohæsive termini. Et plasmid eller anden kloningsbærer kan således kløves og efterlader termini, der hver omfatter halvdelen af restriktionsendonucleasegenkendelsesstedet. Et kløvningsprodukt af eksogent DNA vil have ender, der er komplementære med enderne af plasmidtermini. Som beskrevet nedenfor kan alternativt termini i det syntetiske DNA, der omfatter cohæsive termini, baseret på indføjelser af eksogent DNA, blive digesteret med alkalisk phosphatase under tilvejebringelse af molekylær selektion til lukninger, der inkorporerer det eksogene fragment. Inkorporering af et fragment med passende orientering i forhold til andre træk ved bæreren kan forøges, når fragmentet erstatter bærer-DNA, udkåret af to forskellige restriktionsendonucleaser og selv omfatter termini henholdsvis udgør halvdelen af genkendelsessekvensen af de forskellige endonucleaser.

35

En fremgangsmåde til dannelsen af hele CS-proteinet er beskrevet i den følgende almene metode. Denne metode byg-

ger på anvendelsen af havebønnenuclease under regulerede formamidkoncentrationsbetingelser og temperaturbetingelser til fortrinsvis kløvning af 5'- og 3'-enden af gener. DNA-fragmenter, der er opnået på denne måde, kan klones i forskellige ekspressionsvektorer, såsom vektoren λ gt11. Kloner, der er dannet f.eks. ved transformation med en kloningsbærer, screenes for ekspresion med antistof mod CS-proteinet. Den foreliggende opfindelse omfatter følgelig en i alt væsentligt ren DNA-sekvens, der koder for et peptid, som tidligere er blevet beskrevet. Sådanne DNA-sekvenser kan let syntetiseres under anvendelse af et automatiseret udstyr som nu er på markede. Den aktuelle DNA-sekvens kan let beregnes ud fra de tidligere givne aminosyresekvenser. Særligt foretrukne DNA-sekvenser omfatter fragmenter, der er afledt af den DNA-sekvens, der er angivet i fig. 2. De DNA-sekvenser, som i overensstemmelse med sammenhængen, der er vist i fig. 2, svarer til aminosyresekvenserne, som tidligere er blevet beskrevet heri som foretrukne, foretrækkes især.

En rekombinant kloningsbærer, som indeholder en af disse DNA-sekvenser, falder også inden for den foreliggende opfindelses omfang. Denne kloningsbærer kan være et mikrobielt plasmid eller gærplasmid eller en bakteriophag. En særligt foretrukket kloningsbærer er λ gt11. En encellet organisme, der indeholder en DNA-sekvens, som beskrevet ovenfor, der er i stand til at udtrykke et immunologisk aktivt peptid, der er i stand til i et menneske at fremkalde en immunreaktion, som krydsreageres med og er beskyttende mod en malariaparasit, falder følgelig indenfor den foreliggende opfindelses omfang, når DNA-sekvensen er blevet kunstigt indført i den encellede organisme. *E. coli* er den foretrukne vært.

Opfindelsen eksemplificeres ved hjælp af adskillige deponeringer, som er sket ved the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Mikroorganismene, der er identificeret som λ -mPf1, 3, 5, 8, 11 og 13 er henholdsvis identificeret ved hjælp af følgende ATCC-deponeringsnumre 39738, 39739, 39740, 39741, 39742, 39743 og 39744.

Selv om genetisk materiale til brug ved udøvelse af opfindelsen kan fremstilles syntetisk som beskrevet ovenfor, er det også muligt at opnå egnet genetisk materiale direkte fra *P. falciparum* protozoer under anvendelse af kendte teknikker.

5 Blandt de offentligt tilgængelige *P. falciparum* protozoer er der én, der er identificeret som 7G8, som er deponeret ved the American Type Culture Collection under deponeringsnummer ATCC 40123.

10 Med opfindelsen muliggøres en fremgangsmåde til fremkaldelse af immunisering mod malaria, ved hvilken fremgangsmåde en immunologisk effektiv mængde af et peptid ifølge opfindelsen gives til et menneske. Den passende, terapeutisk effektive dosis kan let bestemmes af fagfolk på området og vil sædvanligvis

15 ligge i intervallet fra ca. 0,01 µg/kg til ca. 100 µg/kg legemsvægt. Dosen er særligt fordelagtigt i intervallet fra ca. 0,1 til ca. 1,0 µg/kg.

Måden til indgift af peptider ifølge opfindelsen kan være en

20 hvilken som helst egnet vej, som leverer peptidet til det immunologiske system. Peptidet kan indgives intramuskulært, intravenøst, eller ved hjælp af en hvilken som helst anden metode, som gør det muligt at den aktive bestanddel når lymfocytter og fremkalder en immunreaktion.

25 Peptider ifølge opfindelsen kan formuleres til farmaceutiske midler, der indeholder den aktive bestanddel i en form, som er velegnet til fremkaldelse af en immunreaktion. Vandige suspensioner eller opløsninger, der indeholder det aktive stof i en

30 form, som er klar til injektion, foretrækkes. Hjælpestoffer kan anvendes til at forøge immunreaktionen om ønsket.

Det foretrækkes, at peptiderne ifølge opfindelsen, når de indgår i farmaceutiske præparater, foreligger i enhedsdosisformer. Til anvendelse til mennesker kan disse mængder let beregnes ud fra de dosismængder, som tidligere er angivet, ved

35 forudsætning af en legemsvægt på 70 kg. En foretrukket enheds-

dosis, der indeholder det farmaceutiske præparat, vil derfor indeholde fra ca. 7 til ca. 70 µg aktiv bestanddel. Det må imidlertid forstås, at den specifikke dosismængde til en bestemt patient vil afhænge af en række faktorer, herunder aktiviteten af den specifikke forbindelse, der anvendes, alderen, den almene helbredelsestilstand, kønnet og patientens kost, indgiftstidspunktet, indgiftsvejen, udskilleleshastigheden, mulige synergistiske virkninger med andre lægemidler, der indgives, og den tilstræbte beskyttelsesgrad.

10

I den foreliggende tekst anvendes standardnomenklatur og biokemiforkortelser for peptid- og DNA-sekvenser. Et eksempel på en publikation, som indeholder den anvendte standardnomenklatur vedrørende peptid- og DNA-sekvenser, er Lehninger, Biochemistry, Worth publishers, New York (1970), kapitlerne 4 og 5 (peptider) og 12 (DNA).

15

20

Opfindelsen, som nu er beskrevet generelt, vil kunne forstås bedre ved henvisning til visse specifikke eksempler, som udelukkende er medtaget til belysning af opfindelsen.

Eksempel.

Kloner fra det genome DNA-ekspressionsbibliotek.

25

30

P. falciparum genom-DNA-biblioteket i ekspressionsvektoren λgt11 (R.A. Young og R.W. Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1194 (1983)) blev fremstillet på følgende måde. Ekspressionsbiblioteket blev lavet ud fra DNA fra den offentligt tilgængelige 7G8-klon af IMTM22-isolatet af *P. falciparum* fra Brasilien.

35

To 10 µg prøver af genomt DNA fra *Plasmodium falciparum* klon 7G8 blev digesteret med 20 enheder havebønnenulease (P-L Biochemicals) i 30 minutter ved 50°C i 100 µl puffer (0,2M NaCl, 1 mM ZnSO₄, 30 mM natriumacetat, pH 4,6) indeholdende enten 35 eller 40% formamid. Opløsningen blev derpå fortyndet 4 gange

med 0,01M EDTA, ekstraheret med phenol og ethanol udfældet før efterfølgende behandling. DNA fra reaktionerne blev kombineret og anvendt som kilde for fragmenter til liggering i λ gt11. DNA blev behandlet med Klenow-fragment (BRL) under beskrevne reaktionsbetingelser (T. Maniatis, E.F. Fritsch og J. Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1982, side 394) og EcoR1-koblere (BRL) blev stump-endligeret til de behandlede fragmenter. DNA blev digesteret to gange med et overskud af EcoR1 og blev separeret fra fire koblere efter hver digestion på en 1,5 cm x 20 cm "Sephrose 4B"-kolonne. λ gt11 blev selv-ligeret og digesteret med EcoR1. 230 ng af *P. falciparum* DNA-fragmenterne blev ligeret til 500 ng af det fremstillede λ gt11-DNA natten over ved 4°C med T4 DNA-ligase (IBI) under de af leverandøren anbefalede betingelser. Halvdelen af liggeringsreaktionsprodukterne blev emballeret i infektiøs phag in vitro (Promega Biotec). 400.000 emballeringstilfælde blev målt ved påviselig afbrydelse af B-galactosidasegenet af λ gt11 på RY1090, der gror på LB-agar, der er suppleret med Xgal og IPTG.

20

Biblioteket blev udpladet ved en densitet på 25.000 plak pr. 150 mm plade på 27 plader. Nitrocelluloseplak-lifts blev fremstillet som beskrevet tidligere (R.A. Young og R.W. Davis Science 222, 778, 1983). En samling af 5 monoklone antistoffer, der er rettet mod *P. falciparum* 7G8 CS-protein (tabel 1), blev anvendt ved en fortynding på 1/10.000 til screening.

30

35

Tabel 1. Reaktion af monoklone anti-CS-protein-antistoffer med lysater af bakterier, der udtrykker klonet CS-proteingen.

5	Antigen	Monoklonal antistof				
		2E 6.4	2F 1.1	4D 9.1	4D 11.6	5G 5.3
	λ mPf1 (2.3 kb) ⁺	1,2 ⁺⁺	1,3	1,7	1,5	1,9
	λ mPf3 (2.3 kb)	1,3	1,1	1,9	1,4	1,8
10	λ mPf5 (1.3 kb)	1,1	0,9	1,5	1,2	1,4
	λ mPf8 (1.3 kb)	1,2	0,9	1,6	1,2	1,4
	λ mPf11 (2.3 kb)	1,1	0,9	1,6	1,3	1,4
	λ mPf13 (1.3 kb)	0,6	0,5	0,5	0,7	0,6
	λ mPf15 (1.35 kb)	1,1	1,1	>2,0	1,7	>2,0
15	λ gt11, IPTG induceret	0,5	0,5	0,4	0,6	0,4
	λ gt11, ikke induceret	0,5	0,4	0,4	0,6	0,4
	Y1089	0,4	0,5	0,3	0,6	0,3

20 + λ mPf, *P. falciparum* CS-proteingener i λ gt11. Størrelsen af det indsatte stykke *P. falciparum* DNA i λ gt11 er i parenteser. Alle bakterier blev induceret med IPTG.

25 ++ Dataene er udtrykt som middel-absorbans ved 414 nm for tre uafhængige bestemmelser af ELISA.

30 Bakterier, der er angivet i tabel 1, blev identificeret ved hjælp af den følgende screeningsmetode. En blanding af ascitesvæsker fra fem hybridomaer blev fortyndet 1/10.000 i 0,15 M NaCl, 0,05M Tris, pH 7,5 (TBS), der indeholder 0,05% Tween 20 og 3% BSA, og blev absorberet flere gange med et koncentreret lysat af λ gt11-inficerede RY1090-celler, lufttørret på nitrocellulose-filtre til fjernelse af antistoffer til *E. coli* og lambda. Nitrocelluloseplak-lifts fra *P. falciparum*-biblioteket
 35 blev vasket i 500 ml TBS indeholdende 0,3% Tween 20, 3% bovin serumalbumin, 5 mM MgCl₂ og 5 μ /ml DNase I ved stuetemperatur i 30 minutter. Nitrocelluloseplak-lifts blev inkuberet med den

absorberede blanding af monoklone antistoffer natten over ved 4°C. Alle yderligere manipulationer skete ved stuetemperatur. Efter dette og hvert af de efterfølgende to trin blev plak-liftene vasket successivt i TBS + 0,05% Tween-20, i TBS + 1% Tritron X-100 og 1n TBS + 0,5% Tween i 30 minutter i hver opløsning. Signalet for de monoklone museantistoffer blev forstærket ved inkubering af filtrene i 1 time i kanin-anti-muse-IgG (Cappel), som var blevet fortyndet 500 gange i TBS, der indeholder 0,05% Tween og 3% BSA, og forud absorberet som beskrevet ovenfor i forbindelse med ascitesvæsken. Antistoffer, der er bundet til plak-liftene, blev påvist ved inkubering af indtil 5 filtre i 30 ml TBS, der indeholder 0,05% Tween-20 og 1 µCi af ¹²⁵I-mærket protein A (Ameraham), efterfulgt af vask og autoradiografi.

35 positive kloner blev opnået ved den første screening efter 48 timers autoradiografi. 17 blev screenet igen ved en densitet på 100-800 plak pr. 85 mm plade. 11 af klonerne gav positive plak i den anden screening. Disse blev klonet uden immunoscreening fra 85 mm plader, der indeholdt færre end 50 plak. 10 af de 11 kloner var immunoreaktive, da de blev screenet.

Indsatte stykker i de ti kloner faldt inden for de følgende størrelsesklasser: 3 (λmPf1, 3,11) var 2,3 kb, 3 (λmPf5, 8,13) var 2,3 kb, λmPf15 var 1,35 kb, λmPf6 var 1,0 kb og λmPf9 var 0,5 kb. Klon λmPf18 indeholdt to indsatte stykker og blev ikke studeret nærmere. De indsatte stykker af kloner λmPf1, 3, 5, 8, 11, 13 og 15 kryds-hybridiserede. λmPf6 og 9 kryds-hybridiserede ikke, hvilket tyder på at de to mindre indsatte stykker, selv om de er valgt fra blandingen af 5 monoklone antistoffer, kom fra en del af genomet uden for 2,3 kb-fragmentet.

Klon λmPf5 blev nick-translateret og anvendt som sonde til at undersøge en Southern-plet (E.M. Southern, J. Mol. Biol. 98, 503 (1975)) af HindIII-digestioner af humant og *P. falciparum* genomt DNA. Et enkelt hybridiseringsbånd fandtes ved 14 kb i *P. falciparum*-banen (data ikke vist). Sonden hybridiserede ikke til humant DNA.

Ekspression af CS-proteinet i E. coli.

Klonerne i λ gt11 blev indført som lysogener i E. coli-stamme Y1089. Til dannelse af lysogener blev 10 μ l bakteriophag (10¹⁰/ml) blandet med 100 μ l E. coli Y1089 (10⁸/ml) dyrket, i medier, der indeholder 50 μ g/ml ampicillin og 0,2% maltose, pelleteret og suspenderet igen i 10 mM MgSO₄. Efter 20 minutter ved stuetemperatur blev cellerne fortyndet og fordelt på plader, der indeholdt 50 μ g/ml ampicillin og dyrket ved 32°C.

Individuelle kolonier blev undersøgt for lysogeni ved deres evne til at vokse ved 42°C. Lysogener blev dyrket i medier, der indeholdt 50 μ g/ml ampicillin ved 32°C, indtil absorbansen ved 550 nm var 0,4-0,8. Kulturerne blev derpå rystet forsigtigt ved 44°C i 20 minutter. IPTG blev derpå tilsat til en slutkoncentration på 2 mM, og kulturen blev rystet i yderligere 1 time ved 37°C. Phagen blev indført ved 44°C, og isopropylthiogalactosid (IPTG) blev derpå sat til medierne for at forøge ekspressionen af β -galactosidase og eventuellet fusionsproteiner. Lysater af de inducerede bakterier blev analyseret for reaktivitet over for hvert af de 5 monoklone antistoffer ved hjælp af den enzytbundne immunosorbentprøve (ELISA). Celler fra 50 kulturer, som blev dyrket og induceret som beskrevet ovenfor, blev suspenderet igen i 1,0 ml 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 mM phenylmethylsulfonylfluorid pr. 0,6 absorbans ved 550 nm. Suspensioner blev hurtigt frosset i et tøris/ethanol-bad og tøet 2 gange før fortynding med PBS. Lysater af kloner blev fortyndet 1/100 med fosfatpufret saltvand (PBS, 10 mM natriumphosphat, 150 mM NaCl). 50 μ l prøver blev pipetteret i brønde i en polyvinylchloridmikrotitreeringsplade (Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA) og holdt ved stuetemperatur. Ca. 18 timer senere blev brøndene vasket 4 gange med 0,1% (vægt/volumen) bovin serumalbumin i PBS (PBS-BSA). Brøndene blev derpå flydt med 1% PBS-BSA og holdt i 1 time ved stuetemperatur. 50 μ l ascitesvæske fra én af fem særskilte monoklone antistoffer blev fortyndet 1/500 med PBS, sat til den passende brønd og holdt i 1 time ved stuetemperatur. Ascitesvæsker fra disse fem monoklone anti-

stoffer var positive i immunofluorescent antistof (IFA) og circumsporozoitudfældnings-(CSP) reaktioner for *P. falciparum* sporozoiter. Brønde blev igen vasket som ovenfor, og 50 μ l peroxidase-konjugeret gedeanti-muse-antistof (Kirkegård & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) fortyndet 1/200 med PBS, blev sat til hver brønd og holdt ved stuetemperatur i 1 time. Brønde blev vasket med PBS-BSA, og 150 μ l substrat blev sat til hverbrønd. Substratet bestod af 1 mg 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonsyre) pr. ml af 0,1M citrat-phosphatpuffer, pH 4,0, med 0,003% hydrogenperoxid, tilsat umiddelbart før brug. Absorbans ved 414 nm blev bestemt ved 1 time med en "Titertek Multiskan"-pladelæser (Flow Laboratories, Inc., McLean, VA). Seks kloner bandt alle fem monoklone antistoffer (tabel 1). Absorbansværdierne for klon λ mPf13 var ikke signifikant over kontrollerne. Klon λ mPf9 bandt kun ét af de fem monoklone antistoffer, 4D11.6 (data ikke vist). Da klon λ mPf9 ikke hybridiserede med λ mPf1, som indeholder genet for CS-proteinet (se nedenfor), har dette monoklone antistof identificeret et gen, som ikke er beslægtet med genet for CS-proteinet. Proteinet, der er udtrykt ved λ mPf9, har en epitop, der krydsreagerer med dette ene monoklone antistof. Hope et al. identificerede et monoklont antistof til et asexuelt, erythrocytisk antigen af *P. falciparum* som kryds-reagerede med et antigen på overfladen af *P. falciparum* sporozoiter. I.A. Hope, R. Hall, D.Z. Simmons, et al., Nature, 308, 191 (1984). Hvorvidt λ mPf9 indeholder et gen, der koder for proteinet, der er beskrevet af Hope et al, eller et andet kryds-reaktivt protein, mangler endnu at blive bestemt.

Lysaterne, der blev anvendt til ELISA, blev også underkastet elektroforese på SDS-polyacrylamidgel (SDS-PAGE) og elektroblottet på nitrocellulose. Pelletterede celler fra 1 ml af hver lysogen kultur (se note 14) blev opløst i 200 μ l SDS gel-prøvepuffer (3% SDS, 10% glycerol, 10 mM dithiothreitol, 62 mM tris-HCl, pH 6,8) og opvarmet til 95°C i 5 minutter. Plasmodium falciparum sporozoiter blev isoleret fra spytkirtlerne af *An. freeborni* myg og konserveret som pellets ved

.80°C i PBS, der indeholdt 0,2% ovalbumin. Til antigenekstraktion blev 450 µl frisk fremstillet ekstraktionspuffer (0,5% NP40, 2 mM PMSF, 33 µg/ml leupeptin, 33 µg/ml antipain og 2 mg/ml bovin serumalbumin i PBS) sat til en pellet af $4,5 \times 10^5$ sporozoiter. Stoffet blev inkuberet ved stuetemperatur i 1 time med kraftig omhvirvling i 15-30 sekunder hvert 10 minut. De ekstraherede sporozoiter blev pelleteret ved centrifugering ved 13.000 g i 2 minutter. Supernatanten blev anbragt i SDS-prøvepuffer til elektroforese.

10

Western plet-analyse blev gennemført under anvendelse af en modifikation af metoden ifølge Towbin et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4350, (1979)). Proteiner blev separeret ved SDS-polyacrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE) i overensstemmelse med metoden ifølge Laemmli (Nature, 277, 680, (1970)) under anvendelse af en 4,5% stabelgel og en 8-12% gradientgel. Gelerne blev vasket to gange med 200 ml Towbin's puffer i 30 minutter pr. vask. Proteinerne, der blev adskilt på SDS-PAGE, blev som pletter afsat på et 0,22 µm nitrocellulosefilter ved en feltstyrke på 8 volt pr cm i 14-16 timer ved 4°C. Uomsatte bindingssteder på nitrocellulosen blev blokeret ved behandling af filteret med 5% BSA i PBS, der indeholder 0,05% Tween 20. Pletten blev derpå vasket 4 gange med 100 ml PBS, der indeholder 0,05% Tween, 20 minutter pr. vask. Filteret blev omsat med en blanding af 5 monoklone antistoffer (2E6,4, 2F1,1, 4D9,1, 4D11,6 og 5G5,3) i 90 minutter. Blandingen af monoklone antistoffer blev fremstillet ved at fortynde ascitesvæsker for hvert antistof 1:100.000 med PBS, der indeholder 0,05% Tween 20 og 20% føtal kalveserum (fortynding af samlet mængde ascitesvæske, 1:20.000). Pletterne blev vasket 4 gange som før og derpå behandlet med ^{125}I -mærket fåreantiserum, fremstillet mod helt museantistof. Antiserummet, der var behandlet med radioaktivt jod, blev fortyndet til 2×10^5 CPM/ml med PBS, der indeholder 0,05% Tween 20 og 20% føtal kalveserum. Filtrene blev derpå vasket 4 gange som før og tørret. Autoradiografi blev gennemført under anvendelse af Kodak XAR-2 film ved -80°C.

35

Proteinerne på nitrocellulosepapiret blev identificeret ved hjælp af monoklone anti-sporozoit-antistoffer. De monoklone anti-sporozoit-antistoffer mod proteinpletterne af λ MPf1, 3, 5, 8, 11 og 13, bandt til to dubletter af M_r 60.000/57.000 og 53.000/51.000 (ikke vist) selv om intensiteten for λ MPf13 blev reduceret kraftigt. Der optrådte ingen binding til λ gt11-vektoren uden et indsat stykke. Monoklone antistoffer, bandt til proteiner fra sporozoiter ved M_r 60.000, 53.000 og 51.000. Alle sporozoitgenerne for CS-proteinet i λ gt11 dannede således et protein af lignende mobilitet som det ubehandlede CS-protein, der blev syntetiseret ved hjælp af sporozoiten selv (M_r 60.000).

Ved induktion med IPTG blev der konstateret en udpræget forøgelse i ekspression af β -galactosidase M_r på 116.000 for λ gt11, og et fusionsprotein ved M_r 131.000 med β -galactosidase blev konstateret for λ MPf9 (data ikke vist). Klonerne med CS-proteingenet gav kun svage β -galactosidasebånd ved indføring. Der sås ingen fusionsproteiner (data ikke vist). Desuden bandt anti- β -galactosidase ikke til M_r 60.000 CA-proteinet, hvilket antyder, at dette protein ikke indeholder β -galactosidasefragmenter (data ikke vist).

λ gt11-vektoren er konstrueret til at udtrykke indsatte stykker som β -galactosidasefusionsproteiner ved induktion med IPTG. Det var således uventet, at ingen af klonerne, der udtrykker CS-proteinet, viste sig at være fusionsproteiner. Dette er forklaret for λ MPf1, 5, 8 og 15 på grund af, at de indsatte stykker er således orienterede, at deres transcriptioneretning er modsat β -galactosidases. Restriktionskortlægning af phag-DNA'et under anvendelse af *StuI*, *KpnI* og *StuI* + *KpnI* viser at det asymmetriske *StuI*-sted i det indsatte stykke (fig. 1) i hvert tilfælde er anbragt ~1,1 kb fra *KpnI*-stedet i λ gt11 ved 18,58 kb fra den venstre ende. Det vides ikke, hvorvidt *P. falciparum* DNA 5' til den kodende sekvens i kloner λ MPf1 og 15 indeholder sekvenser, der kan anvendes som promotorer af *E. coli* RNA-polymerasen, men der eksisterer ingen indlysende

bindingssteder for bakterielle ribosomer (fig. 2). Kloner λ MPf5 og 8 begynder kun 11 bp før genet. Det er således sandsynligt, at ekspresion af CS-proteinet i disse kloner er fra en sen λ mbd-promotor. Et lignende fænomen blev observeret i λ gt11-systemet med et indsat stykke gær-DNA. T. Goro og J.C. Wang, Cell, 36, 1073 (1984).

Restriktionskortlægning viser, at det indsatte stykke i λ MPf13 er orienteret korrekt med β -galactosidasegenet. Det er imidlertid 1 base ud af ramme til dannelse af et fusionsprotein med β -galactosidase (fig. 2). De lave mængder CS-protein, der dannes ved hjælp af denne klon, hvilket påvises ved Western-pletning, og dets manglende evne til at give signifikante data i ELISA (tabel 1) kan forstås, når henses til denne konstruktion. Skråsnittet (eng.: bias) blandt klonerne for enten omvendt orientering eller indsatte stykker uden for rammen antyder, at der er selektion mod de forventede fusionsproteiner (f.eks. λ MPf5 og 8 i den korrekte orientering), måske på grund af en toksisk virkning af CS-proteinet på E. coli.

Struktur af P. falciparumgenet for circumsporozoitproteinet.

Nucleotidsekvensen af 2,3 kb DNA-fragmentet, der er klonet i β MPf1, som indeholder genet, der koder for CS-proteinet af P. falciparum, er angivet i fig. 2. Den påviste aminosyresekvens for proteinet er vist nedenfor nucleotidsekvensen. Et restriktionskort over λ MPf1-klonen og sekventeringsstrategien er beskrevet i fig. 1. Denne sekvens indeholder en stor åben læseramme, som begynder med en ATG-initieringscodon i stilling 78 og slutter med en TAG-codon i stilling 1316. Multiple terminator-codoner blev set i de andre 5 læserammer. Den åbne læseramme, der er vist i fig. 1, kan kode for et polypeptid af 412 aminosyrer med en omtrentlig molekylmasse på 44.000 daltons. Som observeret for CS-proteinet af P. knowlesi afviger molekylvægten for CS-proteinet af P. falciparum ved SDS-PAGE (60.000) fra den beregnede molekylvægt (44.000).

Et vigtigt strukturelt træk ved dette protein er nærværelsen af 41 tandem-gentagelser af tetrapeptider. Den primære gentagelsesenhed er Asn-Ala-Asn-Pro, som optræder 37 gange. En anden form er Asn-Val-Asp-Pro, som optræder ved enhederne 2, 4, 6 og 22. Ændringen fra Ala-Asn til Val-Asp skyldes punktmutationer, hvor C er erstattet med T i den anden stilling af alanincodonen, og hvor A er erstattet med G i den første stilling af asparagincodonen.

10 Nucleinsyresekvensen, der koder for gentagelserne, er ikke så velkonserverede som aminosyresekvensen. Den gentagne region, som har 41 enheder, er sammensat af 11 forskellige nucleotidsekvenskombinationer. 18 af enhederne er én type (AATGCAAACCCA). 7 af gentagelserne afviger kun fra denne sekvens i én stilling, 12 afviger i to stillinger, to afviger i tre stillinger, 15 1 afviger i fire stillinger, og 1 afviger i fem stillinger. Ændringen i sekvensen kan stabilisere gentagelsen i det genome DNA fra at blive elimineret eller ommøbleret igen ved rekombination.

20 Ved proteinets aminoterminalende udgør en strækning på 16 aminosyrer en mulig signalsekvens (fig. 2). Mellem denne signalsekvens og den gentagende region optræder en kraftigt ladet region, som er karakteriseret ved nærværelsen af både basiske og sure aminosyrer. 27 af 53 aminosyrer fra aminosyre 66 til 25 aminosyre 118 er således ladede aminosyrer.

Efter gentagelsesregionen indeholder to andre segmenter af proteinet en stor mængde ladede aminosyrer. Disse regioner 30 findes mellem aminosyre 324 og 339 og mellem aminosyre 360 og 388. De indeholder henholdsvis 50% og 48% ladede aminosyrer. Ved carboxylterminalenden har proteinet en sekvens på 21 hydrofobe aminosyrer, som repræsenterer en ankersekvens for et integralt membranprotein.

35

Immunoreaktivitet af syntetiske peptider med antistoffer til gentagelsessekvensen.

5 For afgørende at bevise at den beslægtede nucleotidenhed af *P. falciparum* sporozoitgenet var korrekt, blev der syntetiseret peptider. Peptiderne blev fremstillet ved hjælp af peptidsyntese-fastfasemetoden (R.B. Merrifield og A. Marglin (1970) Annu. Rev. Biochem., 39, 841-866) under anvendelse af et Beckman 990 peptidsyntetiseringsapparat. De syntetiske peptider
10 blev kløvet fra den faste bærer med flydende HF (J.P. Tam, W.F. Heath og R. B. Merrifield, J. Am.Chem.Soc., 105, 6442 (1983)). De kløvede peptider blev afsaltet ved gelfiltrering på Bio Gel P-2 eller P-4. De isolerede peptiders renhed blev godtgjort ved omvendt fase HPLC, aminosyreanalyse og for 15 restpeptidet, aminosyresekvensanalyse.

Disse peptider blev så anvendt i en modificeret version af ELISA-prøven, der er beskrevet ovenfor, til bestemmelse af, hvorvidt de ville inhibere binding af det monoklone antistof
20 2F1,1 til λ MPf1. Syntesepeptiderne blev afprøvet på følgende måde. 50 μ l prøver af λ MPf1-lysate (14) fortyndet 1/100 med 0,01M phosphat i 0,15M NaCl, pH 7,4 (PBS), blev pipetteret i brønde i en polyvinylchloridmikrotitreringsplade (Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA) og holdt natten over ved
25 stuetemperatur. Ca. 18 timer senere blev brøndene vasket 4 gange med PBS-0,05% Tween-20 (PBS-TW), fyldt med 1,0% bovinserumalbumin (BSA) i PBS-TW og holdt i 1 time ved stuetemperatur. Lageropløsninger af syntetiske peptider, opløst i destilleret vand (5×10^{-2} M), blev fortyndet 1/10 med 1% BSA i
30 PBS og 100 μ l prøver, blandet med 30 μ l monoklont antistof 2F1,1 konjugeret til radiseperoxidase i 1,5 ml mikrocentrifugerør og holdt i 1 time ved stuetemperatur. Brønde fra mikrotitreringspladen blev tømt og 30 μ l af blandingen af peptid og monoklont antistof blev anbragt i hver brønd og holdt i 1
35 time ved stuetemperatur. Brøndene blev vasket igen som beskrevet ovenfor og 150 μ l substrat tilsat som tidligere beskrevet (P.K. Nakane og A. Kawzaoi, J. Hist. Cytochem., 11, 1084, (1974)).

Resultaterne, der er vist i fig. 3 viser, at 7, 11 og 15 rest-peptiderne signifikant inhiberer binding af 2F1,1 til λ MPf1. Inhibering af binding var helt klar ved $5 \times 10^{-7}M$ med 15 rest-peptidet. 7 rest-peptidet inhiberede også binding af monoklont antistof 2F1,1 til sporozoitantigenet, der anvendes i stedet for λ MP1,1 (data ikke vist). Desuden inhiberede det syntetiske peptid binding af de andre fire monoklone antistoffer til λ MPf1. Disse data indikerer, at sekvensen af gentagelseheden er korrekt. Den forøgede inhibering af bindingen, der ses med 11 og 15 rest-peptiderne, kan afspejle sekundære konformationsændringer. Dataene antyder ikke, at de indeholder to epitoper, da ingen kunne påvises i en dobbeltsidet prøve med 2F1,1 (data ikke vist).

15 Homologiregioner mellem CS-proteiner af P. falciparum og P. knowlesi.

CS-proteinet af P. falciparum og CS-proteinet af abemalaria, P. knowlesi, har en lignende samlet struktur, men har kun to korte homologiregioner. Begge proteiner viser sig at indeholde de samme hovedtræk ved at de har en gentagelsesregion midt i proteinet, flere regioner med en høj tæthed af ladede aminosyrer, en signalsekvens ved aminoterminalenden, og en hydrofob ankersekvens ved carboxylterminalenden. EDB-analyser for aminosyresekvenshomologien (25, K tuplestørrelse på 1. vinduestørrelse på 20, gap penalty på 1) viste begrænset sekvenshomologi over størstedelen af proteinet. Den gennemsnitlige homologi mellem de to proteiner i segmentet før gentagelsen er 37%; 37 af mulige 102 aminosyrer passer sammen. Gentagelserne deler 16% homologi, da én Pro og ét Ala står overfor hinanden ved hver 12 aminosyrer. Den gennemsnitlige homologi mellem segmenterne af de to proteiner efter gentagelserne er 42%; 50 af mulige 119 aminosyrer passer sammen. Da den sekundære og tertiære struktur af disse proteiner er ukendt, kan de have strukturelle og funktionelle ligheder til trods for forskellen i primærsekvens. Gentagelser i CS-proteiner er f.eks. immunodominerende efter vaccination med sporozoiter.

De to områder eller regioner med størst sekvenshomologi sås på hver side af gentagelsesregionerne. Når de to peptider er bragt på linie ses en homologiregion, hvor tre proliner er bragt på linie og fem sammenhængende aminosyrer (Lys-Leu-Lys-Gln-Pro) viser sig at passe perfekt sammen (region I, fig. 2 og 4).

Den anden homologiregion (region II, fig. 2 og 4) indeholder 13 aminosyrer, af hvilke 12 er konserveret. Den eneste aminosyre, som ikke var identisk, var erstatningen af serin med threonin ved den fjerde rest i *P. knowlesi*-sekvensen. Denne region indeholder to cysteinrester, som blev inddraget tidligere af Ozaki et al., L.S.Ozaki, P. Svec, R.S. Nussenzweig et al., Cell 34, 815 (1983) ved dannelsen af en intramolekylær løkke.

Nucleinsyresekvensen, der indkoder CS-proteinet af *P. falciparum* har også begrænset homologi med *P. knowlesi*-genet undtaget i region II. I delen af genet, der indkoder region II af proteinet, findes en 27 basesekvens, som kun afviger fra den sammenlignelige sekvens i *P. knowlesi*, i to positioner. Denne konserverede sekvens kan være nyttig som en sonde til klonegelerne, der indkoder CS-proteinerne af de andre plasmodiumarter.

Disse to aminosyresekvenshomologiregioner mellem *P. falciparum* og *P. knowlesi* indikerer sekvenskonservering for organismer som afviger meget med hensyn til evolution. Det antoges oprindeligt, at primat-malariaerne havde udviklet sig parallelt med evolutionen af primater. For nylig er det imidlertid blevet påvist, at DNA'et af *P. falciparum* ligner DNA'et af fugle- og gnaver-malaria, og at disse havde en anden DNA-struktur end primat malarierne (*P. knowlesi*, *P. fragile*, *P. vivax* og *P. cynomolgi*); *P. falciparum*, *P. lophurae* og *P. berghei* havde et lavere G+C-indhold end primat malariaerne inklusive *P. knowlesi*. Gensonderne, som hybridiserede til *P. falciparum*, *P. lophurae*, og *P. berghei*-DNA'er hybridiserede ikke til primat malarierne og sonder, som hybridiserede til primat malarierne, hybridiserede ikke til *P. falciparum*, *P. lophurae* og *P. berg-*

hei. Denne homologiregion mellem *P. falciparum* og *P. knowlesi* kan konserveres til en vigtig proteinfunktion, såsom modtagelse for celleinvasion. Det skal bemærkes, at både *P. falciparum*- og *P. knowlesi*-sporozoiter kan inficere leveren hos mennesker.

Til trods for mulige problemer med fælles epitoper blandt proteiner, er der væsentlige beviser på, at sporozoitgenet er blevet klonet. Ligheden mellem dette protein af *P. falciparum* og CS-proteinet af *P. knowlesi* er for det første slående. Begge har samme størrelse med begrenede molekylvægte på 44.426 og 36.792 for henholdsvis *P. falciparum* og *P. knowlesi*. Begge har analoge regioner, som omfatter en signalsekvens, ladet region, en region med gentagelsespeptider i midten af proteinet og en ankersekvens. Der er for det andet to regioner med aminosyrehomologi mellem de to proteiner (fig. 4). Fem monoklone antistoffer, der vides at reagere med overfladen af *P. falciparum* sporozoiter (11) genkendte for det tredje det i bakterien syntetiserede protein. Det krydsreaktive protein fra klon λ MPf9 reagerede kun med et af disse monoklone antistoffer. Proteinet, der blev syntetiseret i bakterien, var for det fjerde af lignende størrelse i SDS-PAGE, som proteinet fra *P. falciparum* sporozoiter. Syntetiske peptider fra denne gentagelse blokerede for det femte binding af et monoklont antistof til sporozoitproteinet i en ELISA.

Genet indkoder et protein med 412 aminosyrer, som består af en signalsekvens, en ladet region, en central region med 41 af fire aminosyrer baserende enheder (eng.: fourth amino acid units) (gentagelser) to andre ladede regioner, en sandsynlig cysteinløkke og en ankersekvens. 37 af gentagelserne i den centrale region er identiske (Asn-Ala-Asn-Pro); fire har en anden sekvens (Asn-Val-Asp-Pro).

Et analogt sæt af CS-proteiner findes på sporozoiter af alle Plasmodium-arter, der er studeret indtil dato. Monoklone antistoffer til CS-proteiner giver beskyttelse in vivo eller neu-

traliserer sporozoit-infektionsevne in vitro. A.H. Cochrane,
 F. Santoro, V. Nussenzweig et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
 79, 5651 (1982). Selv om monoklone antistoffer kan krydsreage-
 re blandt arter af primat malaria, viser antistofformidlet im-
 5 munitet sig at være artsspecifik, og i tilfældet med *P. know-*
lesi er beskyttende monoklone antistoffer rettet mod gentage-
 lsesepitopen. Disse data og påvisningen af, at monoklone anti-
 stoffer til sporozoiter reagerer i en prøve, som kræver to
 eller flere epitoper, førte Zavala et al., til at forslå, at
 10 monoklone antistoffer til CS-proteiner reagerer med en immuno-
 dominantregion, som har en gentagelsesepitop. Denne hypotese
 er blevet bekræftet ved at de fem monoklone antistoffer til
 CS-proteinet af *P. falciparum* er rettet mod gentagelsesenheder
 (Asn-Ala-Asn-Pro) i proteinet.

15 Den slående homologi af region II mellem to ellers udviklings-
 mæssigt forskellige malariaparasitter *P. falciparum* og *P.*
knowlesi antyder konservering af en sporozoitfunktion, såsom
 reception for leverinvasion. Hvis denne region konserveres i
 20 andre humane malariaer og udsættes for immunsystemet, kan
 immunisering med denne region fra *P. falciparum* give beskyt-
 telse mod andre arter af human malaria. Hvis denne homologire-
 gion desuden er involveret i reception for leverinvasion, kan
 malariaparasitten så være ude af stand til at variere sekven-
 25 sen i denne region.

P a t e n t k r a v .

30 1. Immunologisk aktivt i alt væsentligt rent syntetisk peptid,
 der er i stand til hos et menneske at fremkalde en immunreak-
 tion, og som er krydsreaktiv med og beskyttende mod infektio-
 ner af en malariaparasit, k e n d e t e g n e t ved, at
 peptidet indeholder en sekvens med formlen Thr-Glu-Trp-Z-Pro-
 35 Cys-Ser-Val-Thr-Cys-Gly-Asn-Gly, hvori Z er Ser eller Thr el-
 ler formlen Lys-Pro-S-T-S-Lys-Leu-Lys-Gln-Pro-U-V-Gly-W-Pro,
 hvori S er Lys eller Asn, T er His eller Glu, U er Gly eller
 Asn, V er Asp eller Glu, og W er Asn eller Gln.

2. Peptid ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at sekvensen er Thr-Glu-Trp-Z-Pro-Cys-Ser-Val-Thr-Cys-Gly-Asn-Gly.
- 5 3. Peptid ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at Z er Ser.
4. Malariamodvirkende immunogent stimulerende middel, k e n -
d e t e g n e t ved, at det omfatter et peptid ifølge krav 1
10 bundet til en immunogen bærer.
5. Anvendelse af et peptid ifølge krav 1 til fremstilling af et middel til at fremkalde immunisering mod malaria.
- 15 6. Anvendelse ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at peptidet er bundet til en immunogen bærer.
7. En i alt væsentligt ren DNA-sekvens, der koder for pepti-
det ifølge krav 1.
20
8. Rekombinant DNA-kloningsbærer, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter DNA-sekvensen ifølge krav 7.
9. E. coli organisme, der indeholder DNA-sekvensen ifølge krav
25 8, k e n d e t e g n e t ved, at DNA-sekvensen er blevet kunstigt indført i organismen, og at organismen er i stand til at udtrykke et immunologisk aktivt peptid, der er i stand til hos et menneske at fremkalde en immunreaktion, som er kryds-
reaktiv med og beskyttende mod en malariaparasit.

30

35

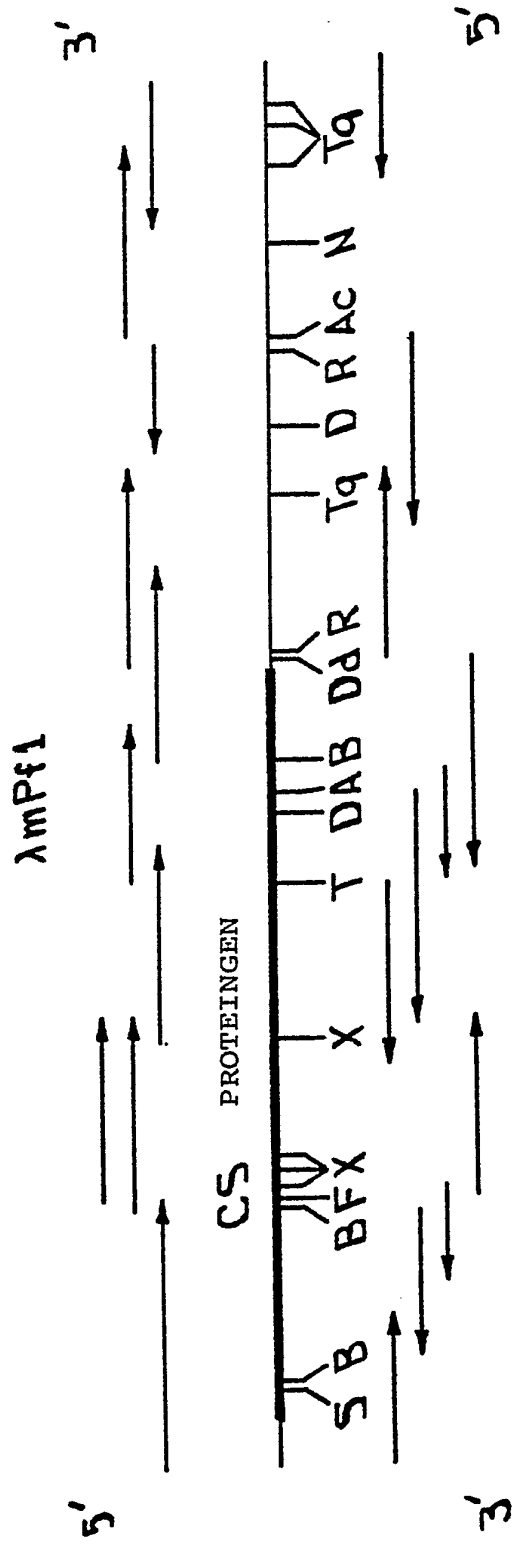


FIG. 1

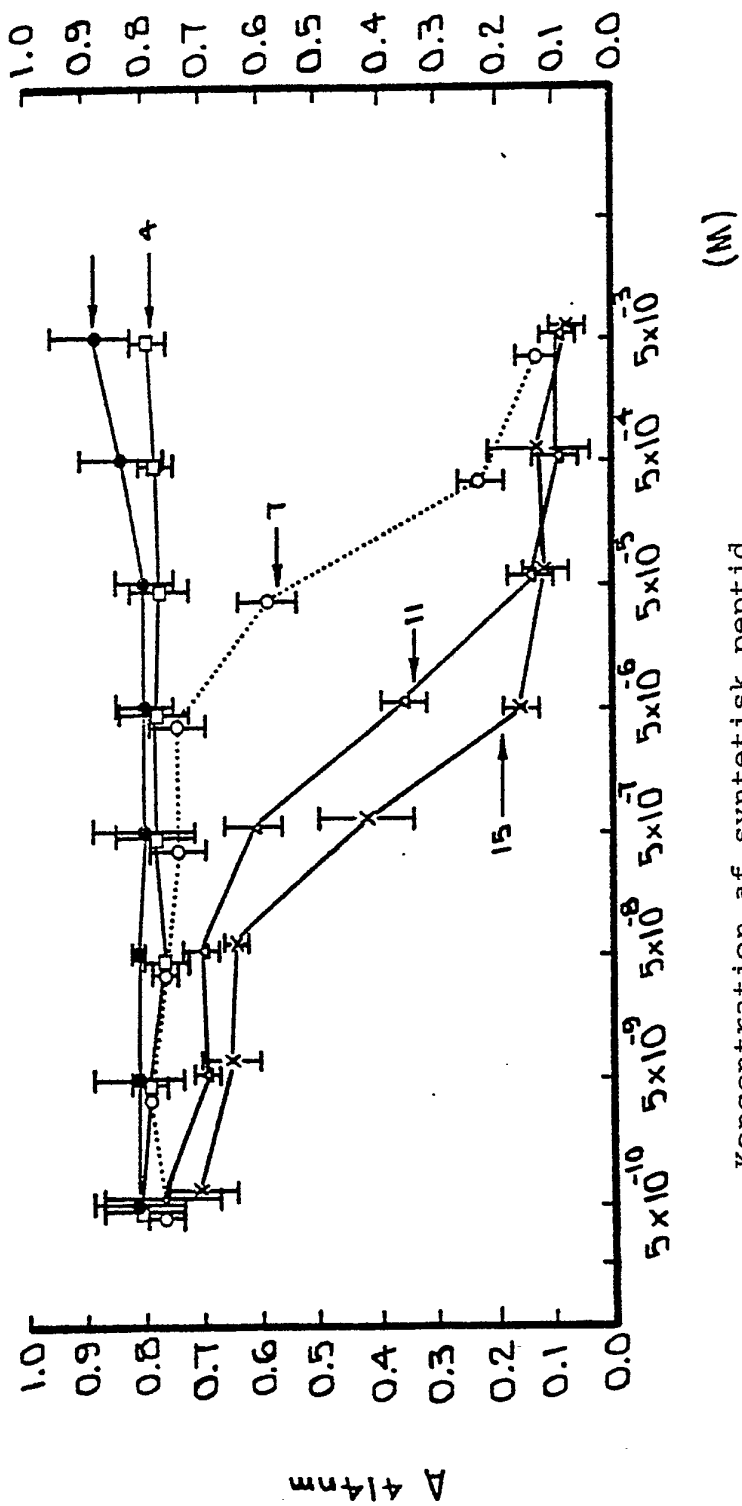


FIG. 3

