(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 692 33 271 T2** 2004.09.09

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 536 352 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 33 271.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP92/00735**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **92 907 420.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 92/017590**
(86) PCT-Anmeldetag: **02.04.1992**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **15.10.1992**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.04.1993**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **17.12.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.09.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/49**
A61K 39/21, G01N 33/569

(30) Unionspriorität:

681624	**02.04.1991**	**US**
837781	**14.02.1992**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, MC, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, Bronx, N.Y., US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
RUBINSTEIN, Arye, Monsey, US; BLOOM, R., Barry, Hastings-on-Hudson, US; DEVASH, Yair, Princeton Junction, US; CRYZ, Stanley, CH-3176 Neuenegg, CH

(54) Bezeichnung: **THERAPEUTISCHER- UND PRÄVENTIVIMPFSTOFF GEGEN HIV**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Diese Erfindung betrifft Impfstoffe und immuntherapeutische Behandlungen zur Verwendung bei der Inhibierung der Übertragung (Prävention der Übertragung) und Behandlung von HIV. Spezifisch betrifft sie Impfstoffe, die durch Konjugation von HIV-1-Peptiden und Trägern hergestellt werden. Diese Peptide können entweder einzelne oder wiederholte, lineare oder konformationelle Aminosäuresequenzen von der gp120 Principal Neutralizing Domain (PND) von HIV-1 sein. Beispiele von Aminosäuresequenzen von der gp120 PND von HIV sind KRIHIGPRAFYT, RHIHIGPGRAFYT, RRIHIGPGRAFYT, TRIHIGPGRAFYT, CTRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAHC, GPGRAFGPGRAFGPGRAFC, IYIGPGRAC, IAIGPGRAC, IHIGPGRAC, KRIHIGPGRAFYT, RSIHIGPGRAFYA, KSITKGPGRVIYA, KGIAIGPGRTLYA und SRVTLGPGRVWYT.
[0002] Die wirkungsvollsten Aminosäuresequenzen von dem gp120 PND von HIV sind GPGRAFGPGRAFGPGRAFC, IYIGPGRAC, IAIGPGRAC, IHIGPGRAC, KRIHIGPGRAFYT, RSIHIGPGRAFYA, KSITKGPGRVIYA, KGIAIGPGRTLYA und SRVTLGPGRVWYT. Der beste Träger ist gereinigtes Proteinderivat ("purified protein derivative" PPD) von Tuberculin von Mycobacterium tuberculosis. Entweder kann ein einzelnes Peptid-Träger-Konjugat allein oder mehrere verschiedene Peptid-Träger-Konjugate zusammen in einem "Cocktail" verwendet werden, um mit HIV-1 infizierte und nicht infizierte Personen zu impfen. Nachdem die Impfstoffe den Personen verabreicht wurden, wird Antikörper enthaltende Flüssigkeit von den geimpften Personen in einem Test zum Nachweis verwendet, ob neutralisierende und/oder schützende HIV-spezifische Antikörper mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit in der Flüssigkeit vorhanden sind. Der Test ist ein Antigen-beschränkter ELISA, der ein Thimerosal enthaltendes Verdünnungsmittel enthält und zum Nachweis von neutralisierenden und/oder schützenden HIV-spezifischen Antikörpern mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit in der Lage ist. Außerdem können die proliferative Antwort von Lymphocyten in vitro, die Sezernierung von IL-2 bei Inkubation mit PND und die Erzeugung von cytotoxischen Lymphocyten (CTL) verwendet werden, um zu bestimmen, ob die Impfstoffe gegen HIV wirkungsvoll sind. Die Konjugate, die die Produktion von Antikörpern induziert haben und/oder die Proliferation von PND-Lymphocyten, IL-2 oder CTL induziert haben, sind bei der Behandlung und der Verhinderung der Übertragung von HIV von Nutzen.

HINTERGRUNND DER ERFINDUNG

[0003] Es gab kürzlich Fortschritte bei der Verwendung von von Retroviren abgeleiteten Impfstoffen bei der Behandlung von HIV. Spezifisch wurde ein Formalin-inaktivierter gesamt-HIV-Impfstoff entwickelt, der bei Makaken Schutz verlieh. Die Immunisierung mit Impfstoffen, die mit Albumin verstärkt waren, resultierte im Schutz vor der klinischen Erkrankung bei acht von neun Affen, die infektiösen Dosen an HIV ausgesetzt wurden. Bemerkenswert ist, daß Schutz selbst in den Fällen erreicht werden konnte, bei denen der Eintritt von Viren nicht verhindert wird, was nahe legt, daß es nicht erforderlich sein muß, die Infektion vollständig zu blockieren, um einen erfolgreichen Impfstoff zu haben.
[0004] Abgetötete gesamt-HIV-Impfstoffe waren auch bei der Behandlung von Schimpansen von Nutzen, die zuvor mit HIV infiziert worden waren. Diese Schimpansen scheinen nach den Impfungen die HIV-Infektion aus ihrem Blutkreislauf entfernt zu haben. Bei Menschen wurde auch die Immunisierung nach der Infektion untersucht. Dieses Test legen nahe, daß die Immunisierung verwendet werden kann, um Menschen vor HIV-Infektionen zu schützen, und auch, um Menschen zu behandeln, die schon mit dem Virus infiziert sind. Gesamt-Virus-Impfstoffe können jedoch infektiöse Partikel enthalten. Als Ergebnis kann es sicherer sein, essentielle Komponenten des Virus zu verwenden, um Schutz zu verleihen. Epitope des Virus sind ein Beispiel einer sicheren, essentiellen Komponente des Virus. Kürzliche Untersuchungen haben bestätigt, daß ein partieller Schutz vor der Infektion auch durch von gp120 und gp160 abgeleiteten Impfstoffen erreicht werden kann. (Desrosiers, R. C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 6353 (1989); Kestler et al. Science, 248: 1109 (1990); Murphey-Corb, M. Science, 246: 1293 (1989)).
[0005] Es ist seit langem bekannt, daß Peptidepitope von Aminosäuren, die mit immunogenen Trägern konjugiert sind, hohe Niveaus von Antipeptid-Antikörpern hervorrufen können. (Vgl. Talwar, G. P., Bloom, B. et al. "Biological and Clinical Aspects of Reproduction", Exceptor Med. Series 394: 2224–2232 (1987), wo die beta-Kette von menschlichem chorionischem Gonadotropin mit Tetanus-Toxoid konjugiert wurde, um einen Antifertilitäts-Impfstoff zu produzieren). Die Träger, mit denen die Peptide bei dieser Erfindung konjugiert werden, wurden alle als immunogene Träger in Tieren verwendet, und einige wurden in Menschen verwendet.
[0006] Das gereinigte Proteinderivat (PPD) von Tuberculin von Mycobacterium tuberculosis ist ein einzigartiges immunologisches Reagens, weil praktisch jeder auf der Welt mit einer funktionellen Immunantwort, der Infektionen mit BCG oder M. tuberculosis ausgesetzt war, eine T-Zell-vermittelte Hypersensitivitäts-Antwort verzögerter Art auf winzige Mengen PPD haben wird. Tuberculin-PPD-Konjugate wurden in der Vergangenheit verwendet. Mäuse, die mit BCG prä-sensibilisiert oder "geprimed" wurden, können hohe Niveaus an Antikör-

pern gegen Peptid- oder Kohlenhydrat-Epitope produzieren, die mit PPD konjugiert sind. Von besonderem Interesse sind Untersuchungen mit dem NANP-wiederholenden Epitop des Circumsporozoit-Antigens von P. falciparum, das nur in zwei Mäusestämmen immunogen ist. Die Konjugation des NANP-wiederholenden Peptids mit PPD ruft die Produktion von Antikörper-Titern von mehr als 1 : 1000 in genetisch nicht gegen das NANP-Epitop reagierenden Stämmen hervor. Dieses Ausmaß an Antwort ist vergleichbar zu demjenigen, die in reagierenden Stämmen gesehen wurde, denen das Peptid-Konjugat in vollständigem Freund's Adjuvans gegeben wurde. (Vgl. Lussow et al., "Use of Tuberculin Purified Protein Derivative-Asn-Ala-Asn-Pro Conjugate in Bacillus Calmette-Guerin Primed Mice Overcomes H-2 Restriction of the Antibody Response and Avoids the Need for Adjuvants," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990)).

[0007] Exotoxin A (Toxin A) von Pseudomonas aeruginosa wurde wirkungsvoll als Träger in Konjugat-Impfstoffen verwendet. Konjugate, die mit diesem Träger hergestellt wurden, haben eine höhere Immunogenität, insbesondere wenn sie mit dem rekombinanten Protein R32 gekoppelt sind, um eine Immunantwort gegen das Sporozoiten-Stadium von Plasmodium falciparum zu erzeugen. Exotoxin A von Pseudomonas aeruginosa kann aus dem Überstand von im Fermentor gezüchteten Kulturen von Pseudomonas aeruginosa PA 103 gereinigt werden.

[0008] Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH) ist ein Protein mit hohem Molekulargewicht, das aus Megathura crenulata gereinigt wird. KLH hat viele primäre Amine von Lysinresten zur Verfügung, die die Proteinkonjugation erleichtern. KLH ist hoch immunogen und wegen der Verfügbarkeit von primären Aminen ist es ideal für die Proteinkonjugation.

[0009] Tetanus- und Diphtherie-Toxoide wurden ebenfalls erfolgreich als Proteinträger verwendet. Diphtherie-Toxoid wurde mit einem synthetischen N-terminalen Peptid mit 31 Aminosäuren verwendet. Tetanus-Toxoid und Diphtherie-Toxoid haben sich als wirksame Träger bei Menschen für das schwach immunogene Kohlenhydrat-Antigen von Hemophilus influenza b herausgestellt.

[0010] Das rekombinante Kernantigen von Hepatitis B hat die Fähigkeit der Selbstorganisation in Partikel von 27 Millimeter, die in Versuchstieren hoch immunogen sind. Diese HBV-Kernpartikel können unter Verwendung der rekombinanten DNA-Technik direkt mit Peptiden konjugiert werden. Es können Fusionsproteine zwischen dem HBV-Kernantigen und Peptiden mit definierter Sequenz mit hoher Epitopdichte produziert werden, welche zu Antikörpern mit hohem Titer führen und auch zu einer lang anhaltenden neutralisierenden antiviralen Immunität. Hepatitis B-Kernantigene und selbstorganisiertes HBc-HIV-Peptid-Fusionsprotein können als Proteinträger verwendet werden.

[0011] Es wurde bestätigt, daß die hauptsächlich antigene Komponente der mycobakteriellen Zellwand ein Protein ist, das aus einem Polypeptid-Monomeren von zwischen 10 und 16 Kd besteht, dessen Sequenz am Amino-Terminus offenbart, daß es mit dem GroES-Hitzeschockprotein verwandt ist, das in vielen Bakterien vorhanden ist. Es wurde angedeutet, daß die hauptsächlich antigene Komponente von Mycobakterien, die von CD4+-Zellen erkannt wird, mit der Zellwand assoziiert ist. BCG-Zellwand (gereinigt) kann als Proteinträger verwendet werden. BCG kann auch verwendet werden, um Tiere oder Mensche vor der Impfung zu primen. Priming mit BCG erhöht die humoralen und zellulären Antworten, die durch die Impfung induziert werden.

[0012] Zur Zeit ist Alumina das einzige Adjuvans, das zur Verwendung am Menschen zugelassen ist. In der vorliegenden Erfindung kann Alumina mit den Konjugaten verwendet werden, welche die Träger Exotoxin A von Pseudomonas aeruginosa, KLH und Tetanus- und Diphtherie-Toxoide umfassen. Auf Aluminium basierende Gele wie $Al(OH)_3$ und $AlPO_4$ ebenso wie Liposomen können mit dem Träger Exotoxin A von Pseudomonas aeruginosa in der vorliegenden Erfindung als Adjuvantien verwendet werden. PPD-Konjugate können in Salzlösung ohne weitere Adjuvantien Tuberculin-positiven Personen gegeben werden. Bei den BCG-Zellwand- und HBc-Antigen-Konjugaten ist es wahrscheinlich, daß Adjuvantien erforderlich sind. Das Ribi-Adjuvans, das Trehalose-dimycolat und 2% Squalen enthält, kann als Adjuvans verwendet werden. Wenn Untersuchungen über die Langzeit-Sicherheit von unvollständigem Freund's Adjuvans oder ISCOM's Adjuvans die Sicherheit und Wirksamkeit im Menschen zeigen, können alternativ auch diese Adjuvantien verwendet werden. Die Technik der Mikroverkapselung unter Verwendung von biologisch abbaubaren Polyactid/Polyglycolid-Polymeren kann auch als Adjuvans verwendet werden.

[0013] Keines der bisher entwickelten Verfahren einschließlich der Verwendung von Trägern war bei der Behandlung und Prävention der Übertragung von HIV erfolgreich. Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Peptid-Träger-Konjugat-Impfstoffe bereitzustellen, um HIV zu behandeln und die Übertragung zu inhibieren, und Verfahren für die Produktion solcher Impfstoffe bereitzustellen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0014] **Fig.** 1 stellt die Immunreaktivität von Mäusen dar, die mit Konjugaten von KLH und fünf verschiedenen Peptiden geimpft worden waren: 282 (GPGRAFGPGRAFGPGRAFC), 283 (IYIGPGRAC), 284 (IAIGPGRAC), 285 (IHIGPGRAC) und MN (KRIHIGPGRAFYT).

[0015] **Fig.** 2 stellt die Affinität/Avidität von Mäusen mit den höchsten Titern an Antikörper gegen Konjugate

von KLH und den Peptiden 282 (GPGRAFGPGRAFGPGRAFC), 283 (IYIGPGRAC), 284 (IAIGPGRAC) und 285 (IHIGPGRAC) dar.

[0016] **Fig.** 3 stellt die Ergebnisse der Konkurrenz zwischen den Peptiden 282 (GPGRAFGPGRAFGPGRAFC) und MN (KRIHIGPGRAFYT) mit dem Peptid 283 (IYIGPGRAC) in der Maus 283-5 dar. Das Peptid 282 konkurrierte wirksam und das Peptid MN tat es nicht. Die **Fig.** 3 stellt auch die Ergebnisse der Konkurrenz zwischen den Peptiden 282 und MN mit dem Peptid 284 (IAIGPGRAC) in der Maus 284-4 dar. Die Peptide 282 und MN konkurrierten wirksam.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0017] Diese Erfindung betrifft Konjugate, die aus (1) Peptiden mit Aminosäuresequenzen ähnlich der der Hauptsächlich Neutralisierenden Domäne ("principal neutralizing domain" PND) von HIV und (2) Trägern zur Erhöhung der Immunogenität hergestellt sind, wobei solche Konjugate bei Impfstoffen zur Behandlung und Prävention der Übertragung von HIV verwendet werden sollen.

[0018] In einer Ausführungsform dieser Erfindung sind die Peptide KRIHIGPRAFYT, RHIHIGPGRAFYT, RRIHIGPGRAFYT, TRIHIGPGRAFYT, CTRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAHC, GPGRAFGPGRAFGPGRAFC, IYIGPGRAC, IAIGPGRAC, IHIGPGRAC, KRIHIGPGRAFYT, RSIHIGPGRAFYA, KSITKGPGRVIYA, KGIAIGPGRTLYA und SRVTLGPGRVWYT.

[0019] In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung sind die Peptide GPGRAFGPGRAFGPGRAFC, IYIGPGRAC, IAIGPGRAC, IHIGPGRAC, KRIHIGPGRAFYT, RSIHIGPGRAFYA, KSITKGPGRVIYA, KGIAIGPGRTLYA und SRVTLGPGRVWYT.

[0020] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist der Träger PPD. Personen, die geimpft werden sollen und die PPD-negativ sind, werden vier bis sechs Wochen vor der Impfung mit den Konjugaten mit BCG geprimed, um die Immunreaktion zu verstärken, die durch die Impfung mit den Peptid-Träger-Konjugaten induziert wird. Wenn eine Person PPD-positiv ist, ist es nicht notwendig, diese Person mit BCG zu primen.

[0021] Der Impfstoff kann entweder ein einzelnes Peptid-Träger-Konjugat allein oder einen Cocktail mehrerer verschiedener Peptid-Träger-Konjugate enthalten. Der Impfstoff kann in flüssiger Form einmal oder mehrmals verabreicht werden, oder er kann mit einem Mechanismus der Freisetzung über die Zeit oder der gepulsten Freisetzung verabreicht werden. Nach der Impfung mit dem Konjugat wird Antikörper enthaltende Flüssigkeit von der geimpften Person extrahiert und in einem Antigen-beschränkten ELISA getestet, der ein Thimerosal enthaltendes Verdünnungsmittel enthält und neutralisierende und/oder schützenden HIV-spezifische Antikörper mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit selektiert. Außerdem können die proliferative Antwort von Lymphocyten in vitro, die Sezernierung von IL-2 bei Inkubation mit PND und die Erzeugung von cytotoxischen Lymphocyten (CTL) verwendet werden, um zu bestimmen, ob die Impfstoffe gegen HIV wirkungsvoll sind. Die Konjugate, die die Produktion von solchen Antikörpern induziert haben und/oder die Proliferation von PND-Lymphocyten, IL-2 oder CTL induziert haben, sind bei der Behandlung und der Verhinderung der Übertragung von HIV von Nutzen.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0022] Diese Erfindung betrifft Peptid-Träger-Konjugat-Impfstoffe zur Verwendung bei der Behandlung und der Verhinderung der Übertragung von HIV. Sie umfaßt die Konjugation von Peptiden mit Aminosäuresequenzen ähnlich denen des gp120 PND von HIV und Trägern, um Impfstoffe zu bilden, das Priming von Tieren mit BCG, die Immunisierung von Tieren mit den Impfstoffen, die Extraktion von Antikörper enthaltender Flüssigkeit von den immunisierten Tieren und Test in einem Antigen-beschränkten ELISA, der ein Thimerosal enthaltendes Verdünnungsmittel enthält und neutralisierende und/oder schützende HIV-spezifische Antikörper mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit selektiert. Die Impfstoffe, die die Produktion von neutralisierenden und/oder schützenden HIV-spezifische Antikörpern mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit induziert haben und/oder proliferative Antworten und/oder bei Zusammentreffen mit PND die Sezernierung von IL-2, sind bei der Behandlung und der Verhinderung der Übertragung von HIV von Nutzen.

[0023] Träger, die bei der Konjugation mit den Peptiden dieser Erfindung verwendet werden können, umfassen gereinigtes Proteinderivat (PPD) von Tuberculin von Mycobacterium tuberculosis, Exotoxin A von Pseudomonas aeruginosa, Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH), Tetanus-Toxoid, Diphtherie-Toxoid, Hepatitis B-Kernantigen und Bacillus Calmette-Guerin (BCG)-Zellwand. Der bevorzugte Träger dieser Erfindung ist PPD. Außerdem kann ein Adjuvans wie Alumina, Ribi, Freunds, Iscoms oder das Adjuvans der Technik der Mikroverkapselung mit allen diesen Trägern verwendet werden.

[0024] Um die Peptide dieser Erfindung herzustellen, ist es erforderlich festzustellen, welche Stämme von HIV Personen infizieren und welche Peptide von jedem Stamm am wirksamsten die Produktion von neutralisierenden und/oder schützenden HIV-spezifischen Antikörpern mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit induziert. Es gibt viele verschiedene Stämme von HIV und verschiedene Stämme herrschen in verschiedenen geogra-

phischen Regionen vor. Daher können die Peptide in den Impfstoffen dieser Erfindung geographisch spezifisch sein. Zum Beispiel hat der MN-Stamm von HIV in den Vereinigten Staaten ein hohes Maß an Verbreitung. Daher sind Peptide vom MN-Stamm von HIV bei Konjugaten wirksam, die zur Impfung von Personen in den Vereinigten Staaten verwendet werden. Diese speziellen Peptide und Konjugate können in anderen geographischen Gegenden nicht wirksam sein, wo andere HIV-Stämme verbreitet sind und müssen an die am meisten verbreiteten Stämme angepaßt werden, die sich in gewissen geographischen Gegenden entwickeln. Ein anderes Beispiel ist, daß neutralisierende und/oder schützende HIV-spezifische Antikörper mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit gegen das gp120 des MN-Stamms von HIV mit dem Schutz vor der Mutter-Fötus-Übertragung in den Vereinigten Staaten assoziiert wurde. Daher können Peptide vom MN-Stamm von HIV bei Konjugaten verwendet werden, um die Mutter-Fötus-Übertragung in den Vereinigten Staaten zu verhindern.

[0025] Die Peptide dieser Erfindung stammen vom pg120 PND von HIV. Die ausgesuchten Peptide können die Aminosäuren 116–131, 307–319 und 470–490 vom pg120 PND von MN-HIV umfassen. Die wirkungsvollsten Sequenzen zur Induktion der Produktion von neutralisierenden und/oder schützenden HIV-spezifischen Antikörpern mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit, welche die bevorzugten Peptidsequnezen für die Konjugate dieser Erfindung sind, sind wie folgt:

SEQ. ID. NR: 1	GPGRAFGPGRAFGPGRAFC
SEQ. ID. NR: 2	IYIGPGRAC
SEQ. ID. NR: 3	IAIGPGRAC
SEQ. ID. NR: 4	IHIGPGRAC
SEQ. ID. NR: 5	KRIHIGPGRAFYT
SEQ. ID. NR: 6	RSIHIGPGRAFYA
SEQ. ID. NR: 7	KSITKGPGRVIYA
SEQ. ID. NR: 8	KGIAIGPGRTLYA
SEQ. ID. NR: 9	SRVTLGPGRVWYT

[0026] Weil lösliche Peptide wegen des Fehlens von reaktiven T- und B-Zell-Epitopen und ihres niedrigen Molekulargewichts schlechte Immunogene sind, sind die Peptide dieser Erfindung Konjugate mit verschiedenen Trägern zur Erhöhung ihrer Immunogenität. Die Verfahren, mit denen diese Peptide mit den Trägern konjugiert werden, umfassen Disulfidbindungen durch eine C-terminale Peptid-Cystein-Bindung, zwei Stunden Kopplung mit Glutaraldehyd-Lösung, Kopplung mit Tyrosin oder Kopplung mit wasserlöslichem Carboddimid.

[0027] Wenn der Träger PPD ist, sollten PPD-negative Personen vor der Impfung mit dem Konjugat mit BCG geprimed werden. Um zu bestimmen, ob eine Person PPD-negativ oder PPD-positiv ist, kann die Testung der proliferativen Antwort oder der Haut durchgeführt werden. Für die Testung der proliferativen Antwort, wenn eine Person in vitro proliferative Antworten auf periphere Lymphocyten gegen PPD zeigt, dann reagiert diese Person auf PPD. Für die Testung der Haut sollte eine Person intradermal 5 TU PPD ausgesetzt werden, uns wenn negativ 20 TU PPD. Wenn eine Person PPD-positiv ist besteht keine Notwendigkeit des Primens mit BCG. Wenn eine Person als PPD-negative betrachtet wird, sollte diese Person vor der Impfung mit Konjugat vier bis sechs Wochen lang eine Immunisierung mit BCG erfahren. Nach der Immunisierung mit BCG sollte die wiederum eine Testung auf PPD durchgeführt werden. Wenn die Ergebnisse des PPD-Test positiv sind, dann wird der Person der Konjugatimpfstoff verabreicht.

[0028] Wenn Personen HIV-negativ und PPD-negativ sind gibt es keine Einschränkungen beim BCG-Primen. Wenn Personen jedoch HIV-positiv und PPD-negativ sind müssen sie nur dann mit BCG geprimed werden, wenn sie noch ohne Symptome sind und/oder ihre Zahl an CD4-T-Zellen 200 übersteigt. Personen, die HIV-positiv und PPD-negativ sind und vorgeschrittene Symptome zeigen, sollten nicht mit BCG geprimed werden. Außerdem wird empfohlen, daß zum Primen britische oder japanische Standard-BCG-Impfstoffe verwendet werden, da diese Impfstoffe selten nachteilige Reaktionen bei Personen induzieren.

[0029] Die Peptid-Träger-Konjugate dieser Erfindung können in einer Impfstoffform verabreicht werden, in der Form von Zäpfchen, intradermal, subkutan, oral oder mittels jedes andern geeigneten Wegs. Die Impfstoffe können entweder ein einzelnes Peptid-Träger-Konjugat oder einen Cocktail mehrere verschiedener Peptid-Träger-Konjugate, und sie können in flüssiger Form oder mit einem Mechanismus der Freisetzung über die Zeit, der gepulsten oder der langsamen Freisetzung, wie bei Virosomen, verabreicht werden. Virosomen umhüllen Virus-spezifische Antigene in ihren Systemen und reagieren dann stark Macrophagen. Solche Virosomen können 1–10 µg PND-Peptid umfassen, das an PPD oder Influenza-Hemagglutinin (HA) gekoppelt ist, oder PND in einem freien Zustand, assoziiert, aber nicht kovalent gekoppelt, mit PPD oder HA, 1–10 µg HA, isoliert aus einem menschlichen Influenzavirus-Stamm, 0,1–1 µg Neuraminidase (NA), isoliert aus einem menschlichen Influenzavirus-Stamm, 0,25–0,75 mg Kephalin und 100–140 mg Lecithin.

[0030] Es können eine einzelne Impfung oder vielfache Impfungen mit dem Peptid-Träger-Konjugaten verwendet werden, um die Produktion von neutralisierenden und/oder schützenden HIV-spezifischen Antikörpern mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit zu induzieren. Der bevorzugte Dosisbereich ist 50–500 µg Peptid pro

Konjugat. Zu einem späteren Zeitpunkt wird Antikörper enthaltende Flüssigkeit von den geimpften Personen extrahiert. Die Antikörper enthaltende Flüssigkeit wird dann in einem Test getestet. Der Test ist ein Antigen-limitierter ELISA, der neutralisierende und/oder schützende HIV-spezifische Antikörper mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit selektiert.

[0031] Um diesen Test zu produzieren werden Mulden von Mikroplatten mit dem Antigen beschichtet, mit dem die Antikörper reagieren, wie MN-PND oder ein anderes PND-Antigen, das von andern im Serum verbreiteten HIV-Stämmen abgeleitet ist, in einer Serie von abnehmenden Beschichtungskonzentrationen, wie folgt:

Reihe A –	500 ng/ml
Reihe B –	100 ng/ml
Reihe C –	50 ng/ml
Reihe D –	10 ng/ml
Reihe E –	5 ng/ml
Reihe F –	1 ng/ml
Reihe G –	0,5 ng/ml
Reihe H –	0 ng/ml

[0032] Wenn der Impfstoff einen Cocktail von verschiedenen Peptiden umfaßt, die mit einem Träger konjugiert sind, werden alle Mulden in der Platte mit allen Peptiden im Impfstoff beschichtet, um zu bestimmen, ob eine Induktion der Produktion von neutralisierenden und/oder schützenden HIV-spezifischen Antikörpern mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit war. Wenn solche Antikörper produziert wurden, wurde ein zweiter ELISA durchgeführt, wobei jede Reihe der Platte mit einem getrennten Peptid vom Cocktail beschichtet war.

[0033] Als nächstes wird Antikörper enthaltende Flüssigkeit von der geimpften Person entnommen, mit einem Verdünnungsmittel für Antikörper enthaltende Flüssigkeit mit einem Verhältnis von 1 : 21 (Probe: Verdünnungsmittel) verdünnt und zu der Serie von Mulden zugegeben. Das Verdünnungsmittel für Antikörper enthaltende Flüssigkeit umfaßt eine Formulierung von Zusatzstoffen in einer gepufferten Lösung, die Thimerosal enthält. Ein Beispiel für ein Verdünnungsmittel für eine solche Antikörper enthaltende Flüssigkeit ist 0,1– 0,5% Caesin in PBS, das 0,05% Tween-20 (pH 7,4), 0,001% Rhodamin und Thimerosal enthält. Es kann jede Antikörper enthaltende Flüssigkeit verwendet werden. Beispiele für Antikörper enthaltende Flüssigkeit sind Serum, Plasma, cerebrale Flüssigkeiten und mucosale Flüssigkeiten. Eine negative Kontrolle, wie ein anti-HIV-negatives menschliches Serum, und eine positive Kontrolle, wie ein anti-HIV-positives menschliches Serum oder ein monoclonaler anti-HIV-MN-PND-Antikörper, sollten auch zu den Mulden in der ELISA-Platte zugegeben werden. Die Platte sollte dann bedeckt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert werden.

[0034] Nach der Inkubation sollte die Platte 5–6 Mal unter Verwendung von Waschlösung für Verdünnungsplatten (phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,4, mit 0,05% Tween-20, verdünnt mit entionisiertem Wasser, das 1 : 10 Chloracetamid enthält) gewaschen werden. Die Verwendung einer automatischen Plattenwaschvorrichtung wird empfohlen. Nach dem Waschen werden pro Mulde 100 µl anti-Mensch-Konjugat wie Peroxidase-konjugiertes (Ziege) Fab1 anti-Mensch-IgG, anti-Mensch-IgA oder anti-Mensch sekretorische Komponente (SC), 1 : 100.000 mit Konjugat-Verdünnungsmittel verdünnt, zu den Mulden zugegeben. Jedes Konjugat-Verdünnungsmittel kann verwendet werden. Das Konjugat-Verdünnungsmittel kann zum Beispiel eine Formulierung von Zusatzstoffen in einer gepufferten Lösung umfassen, die üblicherweise durch den Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet zu den Antikörper-Konjugat-Lösungen zugegeben wird. Anschließend werden die Mulden 60 Minuten bei 37°C inkubiert und unter Verwendung der Waschlösung für Verdünnungsplatten 5–6 Mal gewaschen. (Die Verwendung einer automatischen Plattenwaschvorrichtung wird wiederum empfohlen).

[0035] Nach dem Waschen werden 200 µl Substrat wie O-Phenylendiamin (o-PD)-Tabletten, mit Wasserstoffperoxid in einem Citratpuffer verdünnt (1 Tablette pro 12 ml Verdünnungsmittel), pro Mulde zugegeben. Die Mulden werden dann im Dunkeln 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl 4 N Schwefelsäure pro Mulde wird die Reaktion dann gestoppt. Die Platte kann dann in einem Mikroplatten-Spektrophotometer bei einer Absorption von 492 nm ausgelesen werden. (Die Verwendung eines Referenzfilters von 620 nm wird empfohlen).

[0036] Für die Kontrollen sollten die Werte der menschlichen negativen Kontrollen im Mittel bei etwa 0,050 liegen. Die Ausschlußgrenze sollte bei etwa 0,100 sein. Die menschlichen positiven Kontrollen sollten mindestens bis zur fünften Mulde (5 ng/ml) herausgefiltert werden.

[0037] Wenn der Absorptionswert größer ist als die Ausschlußgrenze in der vierten Reihe oder darunter, gilt für Antikörper enthaltenden Flüssigkeit, daß der Antikörper in der Flüssigkeit von niedriger Affinität ist. Wenn der Absorptionswert größer ist als die Ausschlußgrenze in der fünften Reihe (5 ng/ml) oder darüber, dann ist der Antikörper von mittlerer Affinität. Wenn der Absorptionswert größer ist als die Ausschlußgrenze in der fünften Reihe (weniger als oder gleich 5 ng/ml) oder darüber, dann ist der Antikörper von hoher Affinität. Ein Verdrängungstest kann dann durchgeführt werden, um sich der Antikörper von hoher Affinität zu versichern.

[0038] Die Affinität der hervorgerufenen Antikörper (in vivo und in vitro) kann weiterhin unter Verwendung des

PHARMACIA BIACORI-Systems bewertet werden, welches eine auf Biosensor beruhende Technologie (Biospezifische Wechselwirkungsanalyse (BIA), die die Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen bis zum picomolaren Bereich ohne die Notwendigkeit der Markierung (radioaktiv oder fluoreszierend) bewertet) ist. BIA mißt den KA und KD von Molekülen, die an eine Oberfläche gebunden sind, mit Molekülen in freier Lösung. Durch Reflektion eines Lichtstrahls an einer miniaturisierten Sensoroberfläche ist es möglich, quantitative kinetische Ergebnisse über die Bindung Antigen/Antikörper (Assoziations-Dissoziations-Zwänge) zu erhalten.

[0039] Die Konjugat-Impfstoffe, die die Produktion von neutralisierenden und/oder schützenden HIV-spezifischen Antikörpern mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit induziert haben, wobei solche Antikörper mittels ELISA selektiert werden, können dann bei der Behandlung und der Verhinderung der Übertragung von HIV verwendet werden.

BEISPIEL I – Immunisierung von Mäusen mit Konjugaten von Peptiden, gekoppelt an die Träger KLH, PPD, Avidin und Tetanus.

[0040] Mäuse wurden mit dem Peptid KRIHIGPGRAFYT (MN-Peptid oder MN-PND) immunisiert, gekoppelt an verschiedene Träger. Fünf Mäuse wurde mit dem an Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH) gekoppelten MN-Peptid immunisiert, wie beschrieben in Methods Enymol., 70: 159 (1980). Den Mäusen wurde Blut entnommen und mit einem für MN-PND spezifischen ELISA die Titer von Antikörpern bestimmt, die gegen MN-PND gerichtet waren. Bei einer Verdünnung von 1 : 1400 hatte Serum, das von Mäusen gewonnen wurde, die mit dem KLH-MN-PND-Konjugat immunisiert worden waren, optische Dichten von 3,85 (K0), 0,598 (K1), 1,762 (K2), 0,282 (K3) und 0,356 (K4) mit einem Hintergrund von weniger als 0,1. Vier Monate später wurden die Mäuse mit KLH-MN-PND verstärkt und dann wurden die Seren auf Reaktivität getestet. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Alle immunisierten Mäuse hatten hohe Titer und Antikörper gegen MN-PND mit hoher Affinität.

[0041] Die Maus K4 wurde getötet. Ihre Milz wurde entnommen und verwendet, um monoclonale Antikörper gegen MN-PND zu entwickeln. Monoclonale Antikörper, die MN-PND erkennen, wurden erzeugt, von denen einige neutralisierend waren. Andere Mäuse wurden mit PPD-MN-PND-, mit Avidin-MN-PND- und mit Tetanus-MN-PND-Konjugaten immunisiert. Serum von diesen Mäusen hatte keine signifikante Aktivität, die gegen MN-PND gerichtet war.

Tabelle 1. Reaktivität von Mäusen, immunisiert mit MN-PND gekoppelt an KLH

	Kontrolle		K0		K1		K2		K3		K4
	4/11/90	4/20/90	4/11/90	4/20/90	4/11/90	4/20/90	4/11/90	4/20/90	4/11/90	4/20/90	4/11/90
MN-PND (ng/ml)					-						
10000	0.086	0.058	0.099	2.277	0.604	2.26	0.145	0.89	0.096	2.714	0.166
5000	0.054	0.056	0.151	1.946	0.173	2.098	0.076	0.279	0.075	1.704	0.108
1000	0.093	0.056	0.073	1.096	0.1312	1.79	0.125	0.405	0.075	2.054	0.165
500	0.094	0.056	0.073	1.231	0.105	1.23	0.111	0.268	0.101	1.729	0.135
100	0.055	0.053	0.07	0.229	0.069	0.423	0.084	0.149	0.091	1.018	0.118
50	0.062	0.057	0.112	0.477	0.108	0.389	0.107	0.254	0.094	0.748	0.144
10	0.059	0.059	0.083	0.14	0.094	0.239	0.45	0.093	0.105	0.578	0.136
1	0.061	0.057	0.074	0.11	0.091	0.091	0.171	0.099	0.078	0.261	0.161

BEISPIEL II – Immunisierung von Mäusen mit Konjugaten von Peptiden, gekoppelt an den Träger Toxin A

Produktion von PND – Toxin A-Konjugaten

[0042] Ein Gramm festes Carbodiimid wurde zu 100 mg Toxin A, derivatisiert mit Adipinsäuredehydrazid

(TA-ADH, 5,9 mg/ml in phosphatgepufferter Salzlösung, pH 7,4; PBS), zugegeben. Der pH wurde durch Zugabe von 0,3 N HCl auf 4,8 eingestellt. Zu diesem Gemisch wurden langsam unter ständigem Rühren 50 mg MN-PND-Peptid in 2,5 ml Pyrogen-freies Wasser zugegeben. Das Gemisch wurde 3 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt. Das Gemisch wurde unter Verwendung einer Filtereinheit von 0,45 µm Filter-sterilisiert und durch eine Sephadex G75-Säule gegeben, um das Konjugat von den Reaktanden zu trennen. Die das Konjugat enthaltende Fraktion, die im Leervolumen eluierte, wurde konzentriert, gegen PBS dialysiert und Filter-sterilisiert. Das Konjugat wurde auf 200 µg Gesamtprotein/ml in PBS verdünnt und an $Al(OH)_3$ absorbiert.

Immunisierungsuntersuchungen

[0043] Eine Gruppe von 3 Meerschweinchen wurde am Tag 0 und 14 intramuskulär mit 50 µg absorbiertem Konjugat geimpft. Serumproben wurden an den Tagen 0, 14 und 28 entnommen. Ein anti-MN-PND-Peptid-ELISA wurde durchgeführt durch Beschichten von Platten mit MN-PND-Peptid, Reaktion der Mulden mit seriellen Verdünnungen von Antiseren und, nach Waschen, Reaktion der Platten mit einem anti-Meerschweinchen-IgG-Antikörper. Wie in Tabelle 2 nachstehend gezeigt stimulierte dieses Konjugat nicht eine anti-MN-PND-Antikörper-Antwort.

TABELLE 2

Tag	mittlerer ELISA-Titer
0	1,4
14	1,8
28	1,0

BEISPIEL III – Immunisierung von Mäusen, Kaninchen und Meerschweinchen mit Konjugaten von Peptiden, die an den Träger Toxin A gekoppelt sind.

[0044] Mäuse, Kaninchen und Meerschweinchen wurden mit MN-PND immunisiert, das mit dem Exotoxin A von Pseudomonas aeruginosa (Toxin A) mit einem Verhältnis von Peptid zu Träger von 3 : 1 gekoppelt war. Zusätzlich fehlte dem MN-PND ein Tyrosinrest in der Nähe des Carboxy-Terminus. Die Tiere wurden an den Tagen 0 und 14 immunisiert. An den Tagen 0, 14 und 28 wurden Seren entnommen. Die verwendeten Dosen waren 5 und 25 µg bei den Meerschweinchen, 5, 10 und 50 µg bei den Kaninchen und 2 und 10 µg bei den Mäusen. Die Immunisierungen wurden entweder mit Konjugat allein oder in Alum vorgenommen. Keines der bei diesen Immunisierungen erhaltenen Seren hatte irgendeine Reaktivität mit MN-PND. Der Grund war wahrscheinlich entweder die Immunogenität von Toxin A, Kopplungsprobleme oder die verwendete Dosis.

BEISPIEL IV – Immunisierung von Meerschweinchen mit Konjugaten von Peptiden, die an den Träger PPD gekoppelt sind.

Herstellung von PPD-MN-PND-Konjugat

[0045] 4 mg MN-PND in 400 µl sterilem destilliertem H_2O wurden mit 4 ml sterilem PPD-RT23 (1 mg/ml) gemischt. Der Träger PPD-RT23 wurde vom Statens Serum Institute, Copenhagen, Dänemark, erhalten. Der Träger PPD-298 wurde von den Connaught Laboratories, Willowdale, Toronto, erhalten. PPD-298-H_2O bedeutet, daß die Konjugation des PND-MN-Peptids und des PPD-298-Trägers in Wasser durchgeführt wurde. PPD-298-PBS bedeutet, daß die Konjugation des PND-MN-Peptids und des PPD-298-Trägers in PBS durchgeführt wurde. 45 µl an 0,2%-igem Glutaraldehyd wurden dann zu der PPD-MN-PND-Lösung zugegeben, mit einer Vortex gemischt und im Dunkeln bei 22°C 30 Min. inkubiert. Es wurden zusätzlich 20 µl an 0,2%-igem Glutaraldehyd zugegeben und die Lösung wurde 90 Min. inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt erschien die Lösung opaleszierend. Das Reaktionsgemisch wurde aseptisch in einen sterilen Dialyseschlauch übertragen und bei 4°C 24 Stunden gegen einen Liter steriles PBS dialysiert. Die Konzentration an PPD wurde durch Division der Gesamtmenge an dem Reaktionsgemisch zugegebenem PPD durch das Endvolumen der Probe nach der Dialyse berechnet. Eine Teilmenge des Konjugats wurde mit sterilem Pyrogen-freiem PBS auf 20 µg PPD pro ml (~1000 E/ml) verdünnt, um die Sterilität und die allgemeine Sicherheit der Impfstoffherstellung gemäß den Richtlinien der European Pharmacopea zu bestimmen. Der Rest der Probe wurde in unverdünnter Form bei 4°C aufbewahrt.

Immunogenität von PPD-MN-PND-Konjugaten in Meerschweinchen

[0046] Gruppen von 5 Meerschweinchen wurden mit 10^6 CFU BCG oder Salzlösung geprimed. Die Tiere wurden dann 14 und 28 Tage nach dem Primen mit 10 oder 50 µg PPD-MN-PND-Konjugat in 0,1 ml PBS immunisiert. Den Tieren wurde 14, 28 und 42 Tage nach dem Primen Blut entnommen. Die Seren wurden dann in einem MN-PND-ELISA getestet, um die Immunogenität des PPD-MN-PND-Konjugats zu bestimmen.

Protokoll für den MN-PND-HIV-ELISA

[0047] Polystytene-Platten von Dynatech wurden mit 100 µl von 1,0 µg/ml MN-PND (in Carbonatpuffer, pH 9,6) bei 22°C übernacht beschichtet. Die Lösung wurde entfernt und dann mit 100 µl einer Lösung von 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) in PBS (pH 7,4) 1 Stunde bei 22°C blockiert. 100 µl von 2-fachen seriellen Verdünnungen von Seren in PBS-Tween (pH 7,4), beginnend mit 1 : 20, wurden in jede Mulde verteilt und die Platten wurden 3 Stunden inkubiert. Die Platten wurden 3 mal mit 300 µl PBS-Tween gewaschen. 100 µl Peroxidase-konjugiertes Kaninchen-anti-Meerschweinchen IgG (1 : 2500 in PBS Tween, Nordic Immunology, Tilburg, Niederlande) wurden zu jeder Mulde zugegeben und die Platten wurden 2 Stunden inkubiert. Die Platten wurden 3 mal mit PBS-Tween gewaschen und 100 µl p-Nitrophenylphosphat (Merck) wurden zu den Mulden zugegeben. Die Platten wurden dann 60 Min. bei 22°C inkubiert. Die Absorptionen bei 405 nm wurden unter Verwendung eines Dynatech MR5000 Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Dynatech, Schweiz) gemessen. Die Serumverdünnungen im linearen Teil der Titrationskurve (zwischen 0,15 und 0,6) wurden mit der entsprechenden reziproken Verdünnung des Serums multipliziert und in ELISA-Einheiten ausgedrückt.

[0048] Wie nachstehend in Tabelle 3 gezeigt induzierte das Primen der Meerschweinchen mit BCG und die anschließende Immunisierung mit dem PPD-MN-PND-Konjugat die Produktion von neutralisierenden und/oder schützenden HIV-spezifischen Antikörpern mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit. Die Antikörpertiter der Meerschweinchen, die mit BCG geprimed worden waren, waren viel höher als die Titer der Meerschweinchen, die nicht mit BCG geprimed worden waren, was anzeigt, daß das Primen mit BCG vor der Immunisierung mit dem Konjugat das Immunsystem veranlaßt, besser auf die Immunisierung mit dem Konjugat zu antworten, wobei die Produktion von neutralisierenden und/oder schützenden HIV-spezifischen Antikörpern mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit wirkungsvoller induziert wird. Die Antikörpertiter der Meerschweinchen, die nicht mit BCG geprimed worden waren (Gruppe d), waren statistisch nicht höher als Meerschweinchen, die nicht mit dem PPD-MN-PND-Konjugatimpfstoff immunisiert worden waren (Gruppe a).

TABELLE 3

Immunogenität von PND-MN-PPD-Konjugaten in Meerschweinchen, geprimed mit BCG oder nicht geprimed

Impfstoff	Dosis (µg)	Geometrischer Mittelwert Elisa-Einheit (Bereich)
--	--	1.6 (1.2-2.7)[a]
PPD-MN-PND	10	2.4 (2.14-2.78)[d]
PPD-MN-PND	50	6.0 (5.68-6.12)[d]
PPD-MN-PND	10	121.1 (5.40-462.1)[b]
PPD-MN-PND	50	14.1 (5.56-25.68)[c]
RT23	10	21.0 (6.7-70.8)[b]
RT23	50	180.5 (49.4-692.5)[b]
PPD-298-H20	10	31.1 (4.9-181.9)[b]
PPD-298-H20	50	142.2 (31.0-393.0)[c]
PPD-298-PBS	10	22.8 (6.3-232.0)[c]
PPD-298-PBS	50	63.2 (9.6-858.9)[c]

[a]Geometrischer Mittelwert der ELISA-Einheiten von prä-Immunisierungsseren von 4 Meerschweinchen
[b]Geometrischer Mittelwert der ELISA-Einheiten von Seren nach der Immunisierung von 4 Meerschweinchen
[c]Geometrischer Mittelwert der ELISA-Einheiten von Seren nach der Immunisierung von 3 Meerschweinchen
[d]Meerschweinchen ohne Priming mit BCG

BEISPIEL V – Immunisierung von Meerschweinchen und Mäusen mit Konjugaten von Peptiden, die an den Träger PPD gekoppelt sind.

[0049] Meerschweinchen und Mäuse wurden mit MN-PND immunisiert, das mit zwei Arten von PPD gekoppelt war. Einige der mit PPD immunisierten Tiere wurden zuerst mit BCG geprimed. Tabelle 4 zeigt die Immunreaktivität der Tiere gegen MN-PND. Tabelle 5 zeigt die Titration der Serumreaktivität gegen MN-PND. Tabelle 6 zeigt die Affinität zu MN-PND, gemessen mittels Antigen-limitiertem ELISA. Die Probe #6474 und die Probe #6469 wurden auf ihre neutralisierende Aktivität getestet. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, daß keines der Seren eine neutralisierende Aktivität zu MN-HIV hatte.

Tabelle 4. Reaktivität von Mäusen und Meerschweinchen, immunisiert mit MN-PND gekoppelt an PPD

	MEERSCHWEINCHEN					MÄUSE		
	PROBE	TAG	O.D.			PROBE	TAG	O.D.
	0	0	0.15					
	0	0	0.119			1/2/3/4	0	0.01
MN-PND-PPD 10ug	7281	28	0.14		MN-PND-PPD 2ug	GRUPPE # 1	28	0.026
	7282	28	0.62			GRUPPE # 1	28	0.018
	7284	28	0.312			GRUPPE # 1	28	0.023
	7285	28	0.43		MN-PND-PPD 10ug	GRUPPE # 2	28	0.026
MN-PND-PPD 50ug	7286	28	2.4			GRUPPE # 2	28	0.02
	7287	28	2.9			GRUPPE # 2	28	0.043
	7288	28	1.448			GRUPPE # 2	28	0.02
BCG/MN-PND-PPD 10ug	7291	42	3.6		BCG/MN-PND-PPD 2ug	GRUPPE # 3	28	0.026
	7292	28	0.27			GRUPPE # 3	42	0.075
	7293	42	3.6			GRUPPE # 3	42	0.469
	7294	42	3.1			GRUPPE # 3	42	1.7
	7295	42	3.3			GRUPPE # 3	42	2.4
BCG/MN-PND-PPD 50ug	7296	42	3.39		BCG/MN-PND-PPD 10ug	GRUPPE # 4	28	0.098
	7298	42	3.5			GRUPPE # 4	42	1.3
	7299		0.275			GRUPPE # 4	42	2.1
	7300	42	3.96					

DE 692 33 271 T2 2004.09.09

Tabelle 5. Titration von Meerschweinchen-anti-MN-PND-Serum

VERDÜNNUNG	PROBE	TAG	1:20	1:100	1:500	1:1000	1:2500
MN-PND-PPD 50ug	0	0	0.15	0.07	0.05	0.05	0.04
	7286	28	2.40	0.36	0.09	0.07	0.05
	7287	28	2.90	0.40	0.12	0.09	0.07
	7288	28	1.45	0.17	0.07	0.08	0.06
BCG/MN-PND-PPD 10ug	7291	42	3.60	3.71	3.67	3.30	1.61
	7292	28	0.27				
	7293	42	3.60	0.52	0.12	0.08	0.07
	7294	42	3.10	1.30	0.27	0.18	0.10
	7295	42	3.30	1.50	0.03	0.18	0.13
BCG/MN-PND-PPD 50ug	7296	42	3.39	1.17	0.27	0.15	0.10
	7298	42	3.50	0.24	0.09	0.06	0.04
	7299		0.28				
	7300	42	3.96	3.76	3.81	2.48	0.95

Tabelle 6. Antigen-beschränkter MN-PND-ELISA von Meerschweinchenproben

MN-PND (ng/Mulde)	PROBE	IMMUNISIERUNG										
		0	MN-PND-PPD 50ug			BCG/HIV-PPD-PND 10ug				BCG/MN-PND-PPD 50ug		
			7286	7287	7288	7291	7293	7294	7295	7296	7298	7300
500		0.21	2.13	2.84	0.98	3.95	3.64	3.99	3.99	3.49	3.50	3.84
100		0.32	2.47	2.89	1.08	3.50	3.30	3.51	3.59	3.60	3.21	3.75
50		0.31	1.97	2.49	0.77	3.96	3.08	3.53	3.46	3.41	2.18	3.82
10		0.22	0.86	0.63	0.50	3.96	1.35	1.16	2.60	0.82	0.52	3.01
5		0.26	0.45	0.37	0.16	3.53	0.46	0.56	1.59	0.44	0.29	1.28
1		0.21	0.18	0.26	0.10	0.73	0.11	0.25	0.29	0.25	0.24	0.24
0.5		0.18	0.16	0.23	0.24	0.72	0.33	0.21	0.24	0.23	0.22	0.22

BEISPIEL VI – Immunisierung von Menschen mit Konjugaten von Peptiden, gekoppelt mit dem Träger PPD.

[0050] Basierend auf der Immunogenität der PPD-MN-PND-Konjugate in Meerschweinchen, dargestellt in BEISPIEL V, wurden fünf PPD-positive Menschen mit diesem Konjugat immunisiert. Die Reaktivität der Seren von den fünf menschlichen Freiwilligen wurde einen Monat nach der Immunisierung mit PPD-MN-PND getes-

tet. Es wurde kein signifikantes IgG oder IgM gegen MN-PND nachgewiesen. Die Seren wurden zwei Monate nach der Immunisierung wieder getestet. Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse des Tests.

Tabelle 7. Reaktivität von menschlichen Freiwilligen gegen MN-PPD-PND 2 Monate nach der Immunisierung

	Spezifische Absorption (410 nm)									
Negative Kontrolle	0.067	0.054	0.063							
Negative Kontrolle	0.099	0.059	0.096							
Positive Kontrolle	0.3	0.434	0.357							
Freiwilliger #1	0.229	0.463	0.388							
Freiwilliger #2	0.054	0.068	0.068							
Freiwilliger #3	0.096	0.114	0.105							
Freiwilliger #4	0.055	0.065	0.071							
Freiwilliger #5	0.049	0.055	0.076							

[0051] Die Freiwilligen wurden ein zweites Mal immunisiert. Es wurden Serumproben etwa 14 Tage und 28 Tage nach jeder Immunisierung und vor der Immunisierung erhalten. Wie in Tabelle 8 nachstehend gezeigt, war nach der zweiten Immunisierung eine Person ein sehr stark Reagierender, eine war ein Reagierender „an der Grenze" und 2 waren nicht-Reagierende.

TABELLE 8

[0052] Der Test auf Reaktivität auf MN-PND wurde dreifach mit den Proben durchgeführt, die 44 Tage nach der Immunisierung erhalten worden waren.

Probe #1 –	0,370 ± 0,057
Probe #2 –	0,063 ± 0,038
Probe #3 –	0,105 ± 0,004
Probe #4 –	0,063 ± 0,004
Positiv	0,363 ± 0,031
Negativ #1	0,084 ± 0,10
Negativ #2	0,061 ± 0,003

[0053] Die Probe #1 ist signifikant unterschiedlich von den negativen Kontrollen ($p < 0,001$) und Probe #3 kann signifikant unterschiedlich von der negativen Kontrolle ($p < 0,05$) sein.

[0054] Die Freiwilligen wurden ein drittes Mal immunisiert. Nach der dritten Immunisierung mit dem PPD-MN-PND-Konjugat hatte das Serum von einem Freiwilligen einen hohen Titer an HIV-spezifischen Antikörpern mit hoher Affinität/Bindungsstärke. Nach Begegnung mit MN-PND reagierten die Lymphocyten in vitro durch Proliferation und Sekretion von Interleukin-2. Dies zeigt, daß eine vollständige Immunantwort induziert wurde. Die humorale B-Zell-Immunität wurde induziert, offenbart durch die Produktion von Antikörpern. Die T-Zell-Immunantwort wurde auch induziert, wie gezeigt durch die Proliferation von T-Zellen bei Begegnung mit dem Konjugat, und wie gezeigt durch die Sekretion von Interleukin-2, das ein Vermittler der Immunantwort ist. Die andern drei Serumproben zeigten keine signifikante Immunantwort. Die Tatsache, daß die HIV-spezifischen Antikörpern mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit häufiger in mit HIV infizierten Personen ohne Symptome gefunden werden, zeigt an, daß solche Antikörper schützend sind.

[0055] Die folgenden Beispiele VII und VIII werden von den vorliegenden Ansprüchen nicht umfaßt und werden zum Zwecke der Illustration beibehalten:

BEISPIEL VII – Synthese von Peptiden und Immunisierung von Mäusen mit Konjugaten von synthetisierten Peptiden, gekoppelt an den Träger KLH

[0056] Zusätzlich zu MN-PND wurden vier andere Peptide synthetisiert. Diese Peptide sind 282 (GPGRAFGPGRAFGPGRAFC), 283 (IYIGPGRAC), 284 (IAIGPGRAC) und 285 (IHIGPGRAC). Diese Peptide wurden wie vorstehend beschrieben mit KLH gekoppelt. Fünf Mäuse wurden mit jedem Peptid-Konjugat immunisiert und 2 Monate später verstärkt. Es wurde Serum entnommen. **Fig.** 1 zeigt die Reaktivität gegen jedes der Peptide. **Fig.** 2 zeigt die Affinität/Bindungsfestigkeit der Mäuse mit den höchsten Antikörperlitern. Es gab eine unterschiedliche Immunogenität der Peptide. 284 war das am meisten immunogene, und 285 war überhaupt nicht immunogen. Einige Mäuse, die mit 283 und 284 immunisiert worden waren, hatten eine sehr niedrige Reaktivität gegenüber MN-PND. Dies war nicht nur ein ELISA-Artefakt, wie gezeigt durch die Tatsache, daß wenn Peptid 282 mit Serum von der Maus 283-5 vor der Durchführung des ELISA inkubiert wurde, Peptid 282 an die Antikörper im Mausserum band (damit konkurrierte), während das MN-Peptid nicht mit den Antikörpern im Mausserum konkurrierte, wenn es damit inkubiert wurde. Im Gegensatz dazu waren die Peptide 282 und MN beide in der Lage, mit den Antikörpern im Serum von Maus 284-4 zu konkurrieren (daran zu binden).

BEISPIEL VIII – Immunreaktivität von Menschen gegenüber synthetisierten Peptiden

[0057] Basierend auf der Beobachtung der verschiedenen Immunogenität der PND-Peptide, wurden Seren von 20 HIV-positiven Personen auf ihre Reaktivität mit den 5 angezeigten Peptiden bewertet. (Vgl. Tabelle 9). Acht Proben reagierten mit mindestens 4 von 5 Peptiden, eine Probe mit 3 von 5, eine Probe mit 2 von 5 Peptiden und sechs Proben nur mit 1 von 5 Peptiden. Eine Probe war negativ und drei Proben hatten einen hohen Hintergrund. Von acht Personen, die Antikörper mit hoher Affinität zu MN-PND hatten, hatten zwei Personen Antikörper mit hoher Affinität zu 282. Zusätzlich erkannten 5 von den acht Personen, die Antikörper mit hoher Affinität zu MN-PND hatten, 5 von 5 Peptiden, eine erkannte 4 von 5 Peptiden, eine erkannte 3 von 5 Peptiden und eine erkannte 1 von 5 Peptiden. Dies zeigt, daß innerhalb der Gruppe von Personen mit Antikörpern mit hoher Affinität/Bindungsfestigkeit zu MN-PND Untergruppen existieren, von denen einige einen höheren Schutz gegen HIV verleihen können. Außerdem kann das eine klinische prognostische Signifikanz haben, was den Einschluß von Peptiden in einem Vielfachimpfstoff beeinflussen kann.

TABELLE 9

PROBE	PEPTID	REAKTIVITÄT	+/-	AFFINITÄT/AVIDITÄT (mg/ml)	KONZENTRATION (mg/ml) 5000	1000	500	100	50	10	5	0
Negativ	KRIHIGPGRAFYT				0.014							
	"				0.018							
	(GPGRAF)3C				0.02							
	"				0.035							
	IYIGPGRAC				0.03							
	"				0.018							
	IAIGPGRAC				0.025							
	"				0.021							
	IHIGPGRAC				0.033							
					0.019							
2207	KRIHIGPGRAFYT	+			2.949	3.089	2.909	2.426	1.828	0.857	0.608	0.469
	(GPGRAF)3C	+			1.544	0.579	1.123	0.607	0.861	0.486	0.617	0.775
	IYIGPGRAC	+			2.884	2.444	2.544	0.422	0.787	0.496	0.776	0.711
	IAIGPGRAC	+			3.039	2.78	1.985	0.484	0.894	0.677	0.832	0.965
	IHIGPGRAC	+			3.126	2.981	2.789	0.773	1.047	0.634	1.115	1.083
2434	KRIHIGPGRAFYT	+			1.808	1.517	0.828	0.298	0.3	0.272	0.178	0.324
	(GPGRAF)3C	+			3.392	2.979	2.857	2.03	1.899	0.097	0.842	1.14
	IYIGPGRAC	+			1.661	1.425	1.32	0.184	0.746	0.358	0.628	0.96
	IAIGPGRAC	+			3.128	2.872	2.028	0.41	0.677	0.355	0.32	0.859
	IHIGPGRAC	+			2.136	1.913	1.512	0.55	0.367	0.334	0.632	0.453
2477	KRIHIGPGRAFYT	+	+	50	2.709	2.415	2.606	1.365	0.715	0.158	0.103	0.095
	(GPGRAF)3C	+	+	50	3.2	2.137	2.212	0.323	0.385	0.041	0.074	0.152
	IYIGPGRAC	+	-	1000	0.776	0.688	0.1	0.055	0.021	0.027	0.053	0.091
	IAIGPGRAC	+	-	500	2.366	0.856	0.983	0.053	0.091	0.023	0.046	0.136
	IHIGPGRAC	+	-	500	1.169	1.454	1.415	0.138	0.115	0.022	0.045	0.155
2529	KRIHIGPGRAFYT	+	+	50	1.668	1.326	1.284	0.358	0.223	0.059	0.061	0.084
	(GPGRAF)3C	+	-	500	2.29	1.23	0.666	0.038	0.049	0.04	0.052	0.108
	IYIGPGRAC	+	-	1000	0.789	0.303	0.169	0.038	0.051	0.031	0.047	0.079
	IAIGPGRAC	+	-	1000	2.243	0.432	0.124	0.014	0.04	0.036	0.047	0.073
	IHIGPGRAC	+	-	500	1.214	2.023	1.35	0.073	0.063	0.055	0.046	0.092
2234	KRIHIGPGRAFYT	+	+	10	3.049	2.932	2.547	1.705	1.334	0.204	0.111	0.075
	(GPGRAF)3C	+	-	500	0.564	0.482	0.303	0.038	0.039	0.028	0.05	0.042
	IYIGRGRAC	+	-	5000	0.218	0.118	0.091	0.027	0.029	0.026	0.039	0.039
	IAIGPGRAC	+	-	1000	2.34	0.389	0.116	0.016	0.044	0.036	0.03	0.049
	IHIGPGRAC	+	-	500	2.361	0.525	1.042	0.023	0.049	0.033	0.048	0.057

TABELLE 9 (Fortsetzung)

PROBE	PEPTID	REAKTIVITÄT	+/-	AFFINITÄT/AVIDITÄT (mg/ml)	KONZENTRATION (mg/ml) 5000	1000	500	100	50	10	5	0
2488	KRIHIGPGRAFYT	+	+	1	2.983	3.131	3.012	2.367	1.777	0.531	0.307	0.241
	(GPGRAF)3C	+	+	50	1.282	0.983	0.91	0.536	0.43	0.088	0.131	0.144
	IYIGPGRAC	+	-	1000	0.269	0.226	0.155	0.092	0.052	0.079	0.095	0.126
	IAIGPGRAC	+	-	500	1.204	0.254	0.223	0.072	0.028	0.063	0.054	0.123
	IHIGPGRAC	+	-	500	2.968	2.829	2.338	0.135	0.129	0.077	0.1	0.115
2535	KRIHIGPGRAFYT	+	-	500	0.584	0.26	0.237	0.162	0.124	0.08	0.182	0.075
	(GPGRAF)3C	+	-	500	2.244	1.274	0.685	0.071	0.079	0.076	0.075	0.082
	IYIGPGRAC	-	-	-	0.115	0.091	0.077	0.07	0.07	0.06	0.086	0.099
	IAIGPGRAC	+	-	5000	0.347	0.119	0.162	0.063	0.085	0.067	0.087	0.097
	IHIGPGRAC	+	-	500	2.244	1.943	1.339	0.141	0.1	0.144	0.08	0.094
2126	KRIHIGPGRAFYT	+	+	10	2.136	1.877	1.627	0.603	0.485	0.308	0.177	0.135
	(GPGRAF)3C	+	-	500	0.673	0.517	0.333	0.055	0.108	0.054	0.096	0.091
	IYIGPGRAC	+	-	500	2.633	2.049	1.857	0.077	0.14	0.037	0.089	0.053
	IAIGPGRAC	+	-	5000	0.266	0.132	0.099	0.026	0.03	0.025	0.041	0.09
	IHIGPGRAC	+	-	500	2.964	2.612	2.099	0.106	0.125	0.049	0.099	0.02
2146	KRIHIGPGRAFYT	+	-	100	0.3	0.238	0.221	0.251	0.188	0.092	0.051	0.06
	(GPGRAF)3C	?	?	?	0.055	0.096	0.072	0.22	0.333	0.281	0.349	0.574
	IYIGPGRAC	?	?	?	0.469	0.423	0.435	0.201	0.275	0.258	0.28	0.489
	IAIGPGRAC	?	?	?	0.525	0.255	0.278	0.24	0.296	0.231	0.279	0.405
	IHIGPGRAC	?	?	?	1.002	0.806	0.683	0.295	0.45	0.301	0.442	0.7
2115	KRIHIGPGRAFYT	+	-	100	1.325	1.367	1.263	0.374	0.235	0.135	0.063	0.224
	(GPGRAF)3C	+	-	5000	0.254	0.13	0.11	0.071	0.042	0.084	0.092	0.135
	IYIGPGRAC	+	-	5000	0.237	0.16	0.254	0.037	0.042	0.045	0.046	0.07
	IAIGPGRAC	+	-	5000	0.783	0.143	0.11	0.06	0.065	0.062	0.091	0.12
	IHIGPGRAC	+	-	5000	0.346	0.187	0.166	0.058	0.07	0.058	0.081	0.168
2270	KRIHIGPGRAFYT	+	-	5000	0.339	0.137	0.104	0.044	0.044	0.045	0.038	0.074
	(GPGRAF)3C	+	-	500	0.7	0.528	0.34	0.04	0.043	0.035	0.034	0.065
	IYIGPGRAC	-	-	-	0.096	0.074	0.052	0.022	0.026	0.026	0.026	0.033
	IAIGPGRAC	-	-	-	0.089	0.096	0.12	0.056	0.071	0.043	0.075	0.073
	IHIGPGRAC	-	-	-	0.062	0.071	0.076	0.061	0.08	0.053	0.08	0.101

TABELLE 9 (Fortsetzung)

PROBE	PEPTID	REAKTIVITÄT	+/-	AFFINITÄT/AVIDITÄT (mg/ml)	KONZENTRATION (mg/ml) 5000	1000	500	100	50	10	5	0
2125	KRIHIGPGRAFYT	+	+	10	2.683	2.704	2.652	1.748	1.416	0.244	0.124	0.063
	(GPGRAF)3C	+	-	500	1.904	0.947	0.905	0.046	0.045	0.049	0.071	0.107
	IYIGPGRAC	-	-	-	0.07	0.071	0.079	0.043	0.067	0.036	0.068	0.069
	IAIGPGRAC	+	-	5000	0.266	0.132	0.099	0.026	0.03	0.025	0.041	0.039
	IHIGPGRAC	+	-	5000	0.291	0.185	0.097	0.028	0.038	0.031	0.034	0.031
2335	KRIHIGPGRAFYT	+	+	10	1.839	1.194	2.062	1.533	1.186	0.313	0.174	0.1
	(GPGRAF)3C	+	-	1000	0.426	0.349	0.183	0.032	0.05	0.021	0.068	0.126
	IYIGPGRAC	-	-	-	0.148	0.073	0.031	0.022	0.047	0.026	0.055	0.098
	IAIGPGRAC	-	-	-	0.184	0.123	0.129	0.043	0.034	0.034	0.043	0.098
	IHIGPGRAC	+	-	5000	0.209	0.102	0.149	0.03	0.047	0.042	0.056	0.088
2232	KRIHIGPGRAFYT	+	+	50	1.148	1.083	0.979	0.537	0.281	0.078	0.065	0.075
	(GPGRAF)3C	-	-	-	0.12	0.064	0.053	0.03	0.041	0.025	0.037	0.047
	IYIGPGRAC	-	-	-	0.044	0.046	0.024	0.019	0.028	0.017	0.026	0.047
	IAIGPGRAC	-	-	-	0.063	0.055	0.043	0.021	0.034	0.027	0.033	0.059
	IHIGPGRAC	-	-	-	0.158	0.033	0.048	0.027	0.035	0.027	0.035	0.045
2436	KRIHIGPGRAFYT	+	-	500	1.306	0.98	0.579	0.093	0.057	0.025	0.026	0.022
	(GPGRAF)3C	-	-	-	0.05	0.025	0.029	0.039	0.032	0.015	0.018	0.022
	IYIGPGRAC	-	-	-	0.023	0.034	0.017	0.015	0.016	0.012	0.02	0.019
	IAIGPGRAC	-	-	-	0.033	0.019	0.021	0.023	0.016	0.024	0.026	0.018
	IHIGPGRAC	-	-	-	0.084	0.051	0.031	0.018	0.015	0.016	0.02	0.023
2205	KRIHIGPGRAFYT	-	-	-	0.094	0.049	0.064	0.042	0.055	0.051	0.055	0.071
	(GPGRAF)3C	+	-	500	1.037	0.475	0.223	0.046	0.042	0.054	0.043	0.059
	IYIGPGRAC	-	-	-	0.113	0.067	0.065	0.042	0.045	0.04	0.041	0.046
	IAIGPGRAC	-	-	-	0.111	0.034	0.058	0.042	0.044	0.053	0.057	0.051
	IHIGPGRAC	-	-	-	0.143	0.105	0.072	0.023	0.043	0.042	0.049	0.063
2236	KRIHIGPGRAFYT	-	-	-	0.035	0.026	0.025	0.028	0.032	0.024	0.028	0.032
	(GPGRAF)3C	-	-	-	0.141	0.079	0.057	0.016	0.021	0.019	0.025	0.038
	IYIGPGRAC	-	-	-	0.043	0.031	0.032	0.017	0.017	0.021	0.016	0.02
	IAIGPGRAC	+	-	1000	2.335	0.914	0.137	0.018	0.021	0.023	0.032	0.033
	IHIGPGRAC	-	-	-	0.095	0.049	0.04	0.019	0.023	0.024	0.033	0.04
2128	KRIHIGPGRAFYT	-	-	-	0.173	0.158	0.113	0.066	0.058	0.056	0.051	0.057
	(GPGRAF)3C	-	-	-	0.196	0.119	0.08	0.029	0.035	0.031	0.043	0.045
	IYIGPGRAC	-	-	-	0.125	0.087	0.072	0.026	0.026	0.021	0.026	0.049
	IAIGPGRAC	-	-	-	0.078	0.034	0.044	0.025	0.034	0.027	0.019	0.049
	IHIGPGRAC	+	-	500	1.824	1.262	1.456	0.059	0.073	0.026	0.036	0.071

DE 692 33 271 T2 2004.09.09

TABELLE 9 (Fortsetzung)

PROBE	PEPTID	REAKTIVITÄT	AFFINITÄT/AVIDITÄT +/-	(mg/ml)	KONZENTRATION (mg/ml) 5000	1000	500	100	50	10	5	0
2332	KRIHIGPGRAFYT	-	-	-	0.043	0.04	0.029	0.034	0.031	0.028	0.025	0.028
	(GPGRAF)3C	-	-	-	0.087	0.048	0.04	0.021	0.026	0.022	0.028	0.051
	IYIGPGRAC	-	-	-	0.024	0.026	0.031	0.022	0.023	0.021	0.025	0.034
	IAIGPGRAC	-	-	-	0.03	0.04	0.041	0.027	0.024	0.025	0.033	0.038
	IHIGPGRAC	-	-	-	0.036	0.039	0.032	0.026	0.027	0.021	0.026	0.048
2437	KRIHIGPGRAFYT	-	-	-	0.059	0.052	0.117	0.121	0.036	0.036	0.125	0.098
	(GPGRAF)3C	+	-	1000	0.261	0.138	0.115	0.049	0.042	0.035	0.045	0.066
	IYIGPGRAC	-	-	-	0.032	0.09	0.077	0.036	0.044	0.035	0.054	0.07
	IAIGPGRAC	-	-	-	0.057	0.043	0.046	0.036	0.062	0.047	0.053	0.078
	IHIGPGRAC	-	-	-	0.103	0.087	0.075	0.042	0.051	0.04	0.05	0.07

[0058] Wie in Tabelle 10 gezeigt band Probe #2234 an MN-PND, wenn vor dem ELISA mit MN-PND inkubiert wurde, aber nicht mit dem Peptid 282. Das Peptid 282 umfaßt $(GPGRAF)_3C$ und das MN-Peptid enthält GPGRAF, zwischen zwei flankierenden Sequenzen (KRIHIGPGRAFYT). Dies legt nahe, daß die Reaktivität gegenüber MN-PND überwiegend auf den flankierenden Sequenzen beruht. Die Unfähigkeit von Probe #2232, an Peptid 282 zu binden, impliziert, daß es nur eine Reaktivität gegenüber den flankierenden Sequenzen gibt

und nicht gegenüber GPGRAF. Die Probe #2434 ist wegen ihres hohen Hintergrunds schwierig zu interpretieren. Die Probe #2270 hat eine starke Reaktivität mit dem Peptid 282 in einem Konjugat, aber keine Reaktivität mit dem löslichen Peptid 282. Dies legt die Möglichkeit nahe, daß das gebundene Peptid 282 ein Epitop exprimieren könnte, das von den Seren erkannt wird und das im löslichen Peptid 282 nicht vorhanden ist. Eine andere Möglichkeit ist, daß zwischen der Affinität, die mittels des Amtigen-limitierten ELISA gemessen wird, und der, die mittels Konkurrenz gemessen wird, eine Diskrepanz besteht.

TABELLE 10

PROBE	PEPTID	Platte	KONZENTRATION (mg/ml) 5000	1000	500	100	50	10	5	1	0
2234	0	MN	1.803	2.597	2.201	1.416	0.679	0.118	0.091	0.048	
	MN		0.28	0.437	0.335	0.061	0.056	0.036	0.047	0.031	
	282		1.887	2.191	1.96	1.51	0.795	0.139	0.109	0.046	
	0	282	0.704	0.567	0.469	0.182	0.163	0.077	0.086		0.085
	282		0.222	0.152	0.106	0.058	0.05	0.091	0.04		0.07
	MN		0.116	0.057	0.125	0.069	0.068	0.058	0.074		0.073
2232	0	MN	1.352	1.36	1.159	0.788	0.434	0.114	0.092	0.088	
	MN		0.952	0.927	0.727	0.286	0.15	0.069	0.068	0.089	
	282		1.507	1.45	1.309	0.824	0.433	0.267	0.08	0.1	
	0	282	0.131	0.104	0.106	0.085	0.097	0.086	0.074		0.053
	282		0.124	0.103	0.103	0.083	0.108	0.093	0.074		0.084
	MN		0.114	0.083	0.097	0.107	0.091	0.099	0.098		0.09
2434	0	MN	1.14	0.584	0.669	0.173	0.254	0.311	0.202	0.282	
	MN		1.029	0.926	0.488	0.294	0.745	0.408	0.341	0.392	
	282		0.644	0.598	0.35	0.234	0.266	0.332	0.287	0.372	
	0	282	3.133	3.144	2.959	1.544	0.699	0.693	0.611		0.361
	282		3.238	3.117	2.356	0.666	0.405	0.654	0.598		0.556
	MN		3.375	3.317	3.052	1.626	1.021	0.754	0.55		0.588
2270	0	MN	0.07	0.095	0.066	0.044	0.056	0.071	0.071	0.051	
	MN		0.097	0.076	0.105	0.055	0.05	0.089	0.058	0.097	
	282		0.103	0.105	0.087	0.051	0.066	0.086	0.059	0.093	
	0	282	1.506	0.778	0.141	0.05	0.087	0.083	0.082		0.073
	282		1.458	0.809	0.163	0.07	0.088	0.073	0.081		0.068
	MN		1.313	0.838	0.159	0.088	0.069	0.079	0.077		0.066

DE 692 33 271 T2 2004.09.09

Sequenzprotokoll

(1) ALLGEMEINE INFORMATION

(i) ANMELDER: Arye Rubinstein
Barry Bloom
Yair Devash
Stanley Cryz

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Therapeutische und Präventivimpfstoffe gegen HIV

(iii) ZAHL DER SEQUENZEN: 9

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:
(A) ADRESSAT: Amster, Rothenstein & Ebenstein
(B) STRASSE: 90 Park Avenue
(C) STADT: New York
(D) STAAT: New York
(E) LAND: U.S.A.
(F) PLZ: 10016

(v) COMPUTERLESBARE FORM
(A) MEDIUMART: 3,5 Inch 1,44 Mb Speicherdiskette
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS
(D) SOFTWARE: Word Processor (ASCII)

(vi) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:
(A) ANMELDUNGSNUMMER: noch nicht zugeteilt
(B) ANMELDEDATUM: noch nicht zugeteilt
(C) KLASSIFIKATION: noch nicht zugeteilt

(vii) DATEN DER VORHERGEHENDEN ANMELDUNG: Teilfortführungsanmeldung der Anmeldung Serien-Nr. 07/681,624, angemeldet am 2. April 1991 mit dem Titel: THERAPEUTISCHE UND PRÄVENTIVIMPFSTOFFE GEGEN HIV

(viii) ANWALTS-/AGENTENINFORMATION:
(A) NAME: Pasqualina, Patricia A.
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 34,894
(C) REFERENZ-/DOCKETNUMMER: 96700/188

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION
(A) TELEPHON: (212) 697-5995
(B) TELEFAX: (212) 286-0854 oder 286-0082
(C) TELEX: TWX 710-581-4766

(2) INFORMATION FÜR SEQ. ID NR: 1

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear und circulär

(ii) MOLEKÜLART:
- (A) BESCHREIBUNG: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(v) FRAGMENTTYP: internes Fragment

(vi) ORIGINALQUELLE:
- (A) ORGANISMUS: HIV
- (B) STAMM: MN-Familie
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: nicht anwendbar
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: nicht anwendbar
- (E) HAPLOTYP: nicht anwendbar
- (F) GEWEBEART: nicht anwendbar
- (G) ZELLTYP: nicht anwendbar
- (H) ZELLLINIE: nicht anwendbar
- (I) ORGANELLE: nicht anwendbar

(vii) UNMITTELBARE QUELLE: nicht anwendbar

(viii) POSITION IM GENOM:
- (A) CHROMOSOMSEGMENT: Teil des V3 Loopfragments der Hülle

(ix) EIGENSCHAFT:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
- (B) LAGE: PND von HIV
- (C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: nicht anwendbar
- (D) ANDERE INFORMATION: nicht anwendbar

(x) PUBLIKATIONSINFORMATION: keine
- (A) AUTOREN: keine
- (B) TITEL: keiner
- (C) ZEITSCHRIFT: keine
- (D) BAND: keiner
- (F) SEITEN: keine
- (G) DATUM keines
- (H) DOKUMENTENNUMMER: keine
- (I) EINREICHUNGSDATUM: keines
- (J) PUBLIKATIONSDATUM: keines
- (K) RELEVANTE RESTE: keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQUENZ ID NR: 1

```
Gly Pro Gly Arg Ala Phe Gly Pro Gly Arg Ala Phe Gly Pro Gly Arg
 1               5                  10                  15
Ala Phe Cys
```

(3) INFORMATION FÜR SEQ. ID NR: 2

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear und circulär

(ii) MOLEKÜLART:
- (A) BESCHREIBUNG: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(v) FRAGMENTTYP: internes Fragment

(vi) ORIGINALQUELLE:
- (A) ORGANISMUS: HIV
- (B) STAMM: MN-Familie
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: nicht anwendbar
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: nicht anwendbar
- (E) HAPLOTYP: nicht anwendbar
- (F) GEWEBEART: nicht anwendbar
- (G) ZELLTYP: nicht anwendbar
- (H) ZELLLINIE: nicht anwendbar
- (I) ORGANELLE: nicht anwendbar

(vii) UNMITTELBARE QUELLE: nicht anwendbar

(viii) POSITION IM GENOM:
- (A) CHROMOSOMSEGMENT: Teil des V3 Loopfragments der Hülle

(ix) EIGENSCHAFT:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
- (B) LAGE: PND von HIV
- (C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: nicht anwendbar
- (D) ANDERE INFORMATION: nicht anwendbar

(x) PUBLIKATIONSINFORMATION: keine
- (A) AUTOREN: keine
- (B) TITEL: keiner
- (C) ZEITSCHRIFT: keine

(D) BAND: keiner
(F) SEITEN: keine
(G) DATUM keines
(H) DOKUMENTENNUMMER: keine
(I) EINREICHUNGSDATUM: keines
(J) PUBLIKATIONSDATUM: keines
(K) RELEVANTE RESTE: keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQUENZ ID NR: 2

Ile Tyr Ile Gly Pro Gly Arg Ala Cys
1 5

(4) INFORMATION FÜR SEQ. ID NR: 3

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear und circulär

(ii) MOLEKÜLART:
(A) BESCHREIBUNG: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(v) FRAGMENTTYP: internes Fragment

(vi) ORIGINALQUELLE:
(A) ORGANISMUS: HIV
(B) STAMM: MN-Familie
(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: nicht anwendbar
(D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: nicht anwendbar
(E) HAPLOTYP: nicht anwendbar
(F) GEWEBEART: nicht anwendbar
(G) ZELLTYP: nicht anwendbar
(H) ZELLLINIE: nicht anwendbar
(I) ORGANELLE: nicht anwendbar

(vii) UNMITTELBARE QUELLE: nicht anwendbar

(viii) POSITION IM GENOM:
(A) CHROMOSOMSEGMENT: Teil des V3 Loopfragments der Hülle

(ix) EIGENSCHAFT:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
(B) LAGE: PND von HIV
(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: nicht anwendbar
(D) ANDERE INFORMATION: nicht anwendbar

(x) PUBLIKATIONSINFORMATION: keine
- (A) AUTOREN: keine
- (B) TITEL: keiner
- (C) ZEITSCHRIFT: keine
- (D) BAND: keiner
- (F) SEITEN: keine
- (G) DATUM keines
- (H) DOKUMENTENNUMMER: keine
- (I) EINREICHUNGSDATUM: keines
- (J) PUBLIKATIONSDATUM: keines
- (K) RELEVANTE RESTE: keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQUENZ ID NR: 3

Ile Ala Ile Gly Pro Gly Arg Ala Cys
1 5

(5) INFORMATION FÜR SEQ. ID NR: 4

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear und circulär

(ii) MOLEKÜLART:
- (A) BESCHREIBUNG: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(v) FRAGMENTTYP: internes Fragment

(vi) ORIGINALQUELLE:
- (A) ORGANISMUS: HIV
- (B) STAMM: MN-Familie
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: nicht anwendbar
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: nicht anwendbar
- (E) HAPLOTYP: nicht anwendbar
- (F) GEWEBEART: nicht anwendbar
- (G) ZELLTYP: nicht anwendbar
- (H) ZELLLINIE: nicht anwendbar
- (I) ORGANELLE: nicht anwendbar

(vii) UNMITTELBARE QUELLE: nicht anwendbar

(viii) POSITION IM GENOM:
- (A) CHROMOSOMSEGMENT: Teil des V3 Loopfragments der Hülle

(ix) EIGENSCHAFT:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
- (B) LAGE: PND von HIV
- (C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: nicht anwendbar
- (D) ANDERE INFORMATION: nicht anwendbar

(x) PUBLIKATIONSINFORMATION: keine
- (A) AUTOREN: keine
- (B) TITEL: keiner
- (C) ZEITSCHRIFT: keine
- (D) BAND: keiner
- (F) SEITEN: keine
- (G) DATUM keines
- (H) DOKUMENTENNUMMER: keine
- (I) EINREICHUNGSDATUM: keines
- (J) PUBLIKATIONSDATUM: keines
- (K) RELEVANTE RESTE: keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQUENZ ID NR: 4

Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Cys
1 5

(6) INFORMATION FÜR SEQ. ID NR: 5

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear und circulär

(ii) MOLEKÜLART:
- (A) BESCHREIBUNG: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(v) FRAGMENTTYP: internes Fragment

(vi) ORIGINALQUELLE:
- (A) ORGANISMUS: HIV
- (B) STAMM: MN-Familie
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: nicht anwendbar
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: nicht anwendbar
- (E) HAPLOTYP: nicht anwendbar
- (F) GEWEBEART: nicht anwendbar
- (G) ZELLTYP: nicht anwendbar
- (H) ZELLLINIE: nicht anwendbar
- (I) ORGANELLE: nicht anwendbar

(vii) UNMITTELBARE QUELLE: nicht anwendbar

(viii) POSITION IM GENOM:
(A) CHROMOSOMSEGMENT: Teil des V3 Loopfragments der Hülle

(ix) EIGENSCHAFT:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
(B) LAGE: PND von HIV
(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: nicht anwendbar
(D) ANDERE INFORMATION: nicht anwendbar

(x) PUBLIKATIONSINFORMATION: keine
(A) AUTOREN: keine
(B) TITEL: keiner
(C) ZEITSCHRIFT: keine
(D) BAND: keiner
(F) SEITEN: keine
(G) DATUM keines
(H) DOKUMENTENNUMMER: keine
(I) EINREICHUNGSDATUM: keines
(J) PUBLIKATIONSDATUM: keines
(K) RELEVANTE RESTE: keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQUENZ ID NR: 5

Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr
1 5 10

(7) INFORMATION FÜR SEQ. ID NR: 6

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear und circulär

(ii) MOLEKÜLART:
(A) BESCHREIBUNG: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(v) FRAGMENTTYP: internes Fragment

(vi) ORIGINALQUELLE:
(A) ORGANISMUS: HIV
(B) STAMM: MN-Familie
(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: nicht anwendbar
(D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: nicht anwendbar
(E) HAPLOTYP: nicht anwendbar
(F) GEWEBEART: nicht anwendbar

(G) ZELLTYP: nicht anwendbar
(H) ZELLLINIE: nicht anwendbar
(I) ORGANELLE: nicht anwendbar

(vii) UNMITTELBARE QUELLE: nicht anwendbar

(viii) POSITION IM GENOM:
(A) CHROMOSOMSEGMENT: Teil des V3 Loopfragments der Hülle

(ix) EIGENSCHAFT:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
(B) LAGE: PND von HIV
(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: nicht anwendbar
(D) ANDERE INFORMATION: nicht anwendbar

(x) PUBLIKATIONSINFORMATION: keine
(A) AUTOREN: keine
(B) TITEL: keiner
(C) ZEITSCHRIFT: keine
(D) BAND: keiner
(F) SEITEN: keine
(G) DATUM keines
(H) DOKUMENTENNUMMER: keine
(I) EINREICHUNGSDATUM: keines
(J) PUBLIKATIONSDATUM: keines
(K) RELEVANTE RESTE: keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQUENZ ID NR: 6

```
Arg Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala
 1               5                  10
```

(8) INFORMATION FÜR SEQ. ID NR: 7

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear und circulär

(ii) MOLEKÜLART:
(A) BESCHREIBUNG: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(v) FRAGMENTTYP: internes Fragment

(vi) ORIGINALQUELLE:
(A) ORGANISMUS: HIV

(B) STAMM: MN-Familie
(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: nicht anwendbar
(D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: nicht anwendbar
(E) HAPLOTYP: nicht anwendbar
(F) GEWEBEART: nicht anwendbar
(G) ZELLTYP: nicht anwendbar
(H) ZELLLINIE: nicht anwendbar
(I) ORGANELLE: nicht anwendbar

(vii) UNMITTELBARE QUELLE: nicht anwendbar

(viii) POSITION IM GENOM:
(A) CHROMOSOMSEGMENT: Teil des V3 Loopfragments der Hülle

(ix) EIGENSCHAFT:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
(B) LAGE: PND von HIV
(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: nicht anwendbar
(D) ANDERE INFORMATION: nicht anwendbar

(x) PUBLIKATIONSINFORMATION: keine
(A) AUTOREN: keine
(B) TITEL: keiner
(C) ZEITSCHRIFT: keine
(D) BAND: keiner
(F) SEITEN: keine
(G) DATUM keines
(H) DOKUMENTENNUMMER: keine
(I) EINREICHUNGSDATUM: keines
(J) PUBLIKATIONSDATUM: keines
(K) RELEVANTE RESTE: keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQUENZ ID NR: 7

```
Lys Ser Ile Thr Lys Gly Pro Gly Arg Val Ile Tyr Ala
 1               5                  10
```

(9) INFORMATION FÜR SEQ. ID NR: 8

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear und circulär

(ii) MOLEKÜLART:
(A) BESCHREIBUNG: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(v) FRAGMENTTYP: internes Fragment

(vi) ORIGINALQUELLE:
- (A) ORGANISMUS: HIV
- (B) STAMM: MN-Familie
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: nicht anwendbar
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: nicht anwendbar
- (E) HAPLOTYP: nicht anwendbar
- (F) GEWEBEART: nicht anwendbar
- (G) ZELLTYP: nicht anwendbar
- (H) ZELLLINIE: nicht anwendbar
- (I) ORGANELLE: nicht anwendbar

(vii) UNMITTELBARE QUELLE: nicht anwendbar

(viii) POSITION IM GENOM:
- (A) CHROMOSOMSEGMENT: Fragment der Hülle

(ix) EIGENSCHAFT:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
- (B) LAGE: PND von HIV
- (C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: nicht anwendbar
- (D) ANDERE INFORMATION: nicht anwendbar

(x) PUBLIKATIONSINFORMATION: keine
- (A) AUTOREN: keine
- (B) TITEL: keiner
- (C) ZEITSCHRIFT: keine
- (D) BAND: keiner
- (F) SEITEN: keine
- (G) DATUM keines
- (H) DOKUMENTENNUMMER: keine
- (I) EINREICHUNGSDATUM: keines
- (J) PUBLIKATIONSDATUM: keines
- (K) RELEVANTE RESTE: keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQUENZ ID NR: 8

```
Lys Gly Ile Ala Ile Gly Pro Gly Arg Thr Leu Tyr Ala
 1               5                  10
```

(10) INFORMATION FÜR SEQ. ID NR: 9

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear und circulär

(ii) MOLEKÜLART:
- (A) BESCHREIBUNG: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(v) FRAGMENTTYP: internes Fragment

(vi) ORIGINALQUELLE:
(A) ORGANISMUS: HIV
(B) STAMM: MN-Familie
(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: nicht anwendbar
(D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: nicht anwendbar
(E) HAPLOTYP: nicht anwendbar
(F) GEWEBEART: nicht anwendbar
(G) ZELLTYP: nicht anwendbar
(H) ZELLLINIE: nicht anwendbar
(I) ORGANELLE: nicht anwendbar

(vii) UNMITTELBARE QUELLE: nicht anwendbar

(viii) POSITION IM GENOM:
(A) CHROMOSOMSEGMENT: Teil des V3 Loopfragments der Hülle

(ix) EIGENSCHAFT:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid
(B) LAGE: PND von HIV
(C) IDENTIFIKATIONSVERFAHREN: nicht anwendbar
(D) ANDERE INFORMATION: nicht anwendbar

(x) PUBLIKATIONSINFORMATION: keine
(A) AUTOREN: keine
(B) TITEL: keiner
(C) ZEITSCHRIFT: keine
(D) BAND: keiner
(F) SEITEN: keine
(G) DATUM keines
(H) DOKUMENTENNUMMER: keine
(I) EINREICHUNGSDATUM: keines
(J) PUBLIKATIONSDATUM: keines
(K) RELEVANTE RESTE: keine

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQUENZ ID NR: 9

```
Ser Arg Val Thr Leu Gly Pro Gly Arg Val Trp Tyr Thr
 1               5                  10
```

Patentansprüche

1. Impfstoff zur Verwendung in der Behandlung von HIV-infizierten und nicht infizierten Individuen und/oder zur Vermeidung der Übertragung von HIV, wobei der Impfstoff mindestens das folgende an einen Träger gebundene Peptid umfasst:
(a) KRIHIGPGRAFYT.

2. Impfstoff nach Anspruch 1, wobei der Impfstoff ein Gemisch mehrerer verschiedener Peptide umfasst, die an einem Träger gebunden sind, wobei die Peptide des Gemisches ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:

(a) KRIHIGPRAFYT
(b) RHIHIGPGRAFYT
(c) RRIHIGPGRAFYT
(d) TRIHIGPGRAFYT
(e) CTRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAHC
(f) GPGRAFGPGRAFGPGRAFC
(g) IYIGPGRAC
(h) IAIGPGRAC
(i) IHIGPGRAC
(j) RSIHIGPGRAFYA
(k) KSITKGPGRVIYA
(l) KGIAIGPGRTLYA; und
(m) SRVTLGPGRVWYT.

3. Impfstoff nach Anspruch 1, wobei der Impfstoff ein Gemisch von 5 oder mehr verschiedenen Peptiden umfasst, die an Träger gebunden sind, wobei die Peptide des Gemisches ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:
(a) RHIHIGPGRAFYT
(b) RRIHIGPGRAFYT
(c) TRIHIGPGRAFYT
(d) CTRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAHC
(e) GPGRAFGPGRAFGPGRAFC
(f) IYIGPGRAC
(g) IAIGPGRAC
(h) IHIGPGRAC
(i) RSIHIGPGRAFYA
(j) KSITKGPGRVIYA
(k) KGIAIGPGRTLYA; und
(l) SRVTLGPGRVWYT.

4. Impfstoff nach Anspruch 2, wobei die Peptide des Gemisches ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:
(a) GPGRAFGPGRAFGPGRAFC
(b) IYIGPGRAC
(c) IAIGPGRAC
(d) IHIGPGRAC
(e) RSIHIGPGRAFYA
(f) KSITKGPGRVIYA
(g) KGIAIGPGRTLYA; und
(h) SRVTLGPGRVWYT.

5. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Träger Pseudomonas aeruginosa-Exotoxin A, KLH, Tetanus-Toxoid, Diphteria-Toxoid, gereinigtes Protein-Derivat (PPD) von Tuberculin von Mycobacterium tuberculosis, Bacillus Calmette-Guerin (BCG) oder Hepatitis -B-Kern-Antigen ist.

6. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Peptid an das Trägerprotein konjugiert ist über
(a) eine Disulfidbindung über eine C-terminale Peptid-Cystein-Bindung,
(b) Reaktion des Peptids und des Trägerproteins in Anwesenheit von Glutaraldehyd; oder
(c) Reaktion des Peptids und des Trägerproteins in Anwesenheit eines wasserlöslichen Carbodiimids mit oder ohne Spacer-Molekül.

7. Impfstoff nach Anspruch 6, wobei der Spacer ein Adipinsäuredihydrazid oder ein bifunktioneller Spacer ist, der 2 bis 24 Kohlenstoffatome zwischen den endständigen Reaktionsgruppen besitzt.

8. Impstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Impstoff mit einem Adjuvans kombiniert ist.

9. Impfstoff nach Anspruch 8, wobei das Adjuvans Aluminiumoxid, Ribi, vorzugsweise Monophosphoryl-Lipid A, Freundsches, ISCOM's, ein Virosom oder eine Mikroverkapselung ist.

10. Impfstoff nach Anspruch 9, wobei die Mikroverkapselung durch Verwendung von Polylactid-Polyglyco-

lid bewirkt wird.

11. Impfstoff nach Anspruch 9, wobei das Aluminiumoxid entweder $Al(OH)_3$ oder $AlPO_4$ umfasst.

12. Verwendung eines Peptids oder Gemisches von Peptiden, die an Träger gebunden sind wie in einem der Ansprüche 1 bis 4 definiert, zur Herstellung eines Impfstoffs zur Verwendung in der Behandlung von HIV-infizierten und nicht infizierten Individuen und/oder zur Vermeidung der Übertragung von HIV.

13. Impfstoff-Kit umfassend:
(a) einen Impfstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 11; und
(b) eine Zusammensetzung zum Primen des Individuums, das es nötig hat, vor dem Verabreichen des Impfstoffs als kombinierte Zubereitung zur sequentiellen Verwendung für die Prophylaxe, Therapie und/oder Vermeidung der Übertragung von HIV.

14. Impfstoff-Kit nach Anspruch 13, wobei das Individuum (i) PPD-negativ und HIV-negativ oder (ii) PPD-negativ und HIV-positiv ist, jedoch keine AIDS-Symptome zeigt und eine CD4-Zellzahl [Zellen/µl] hat, die 200 überschreitet.

15. Impfstoff-Kit nach Anspruch 13, wobei die Zusammensetzung BCG umfasst.

16. Impfstoff-Kit nach einem der Ansprüche 13 bis 15, wobei die Zusammensetzung zum Primen 4 bis 6 Wochen vor der Impfung der Individuen mit dem Impfstoff dient.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

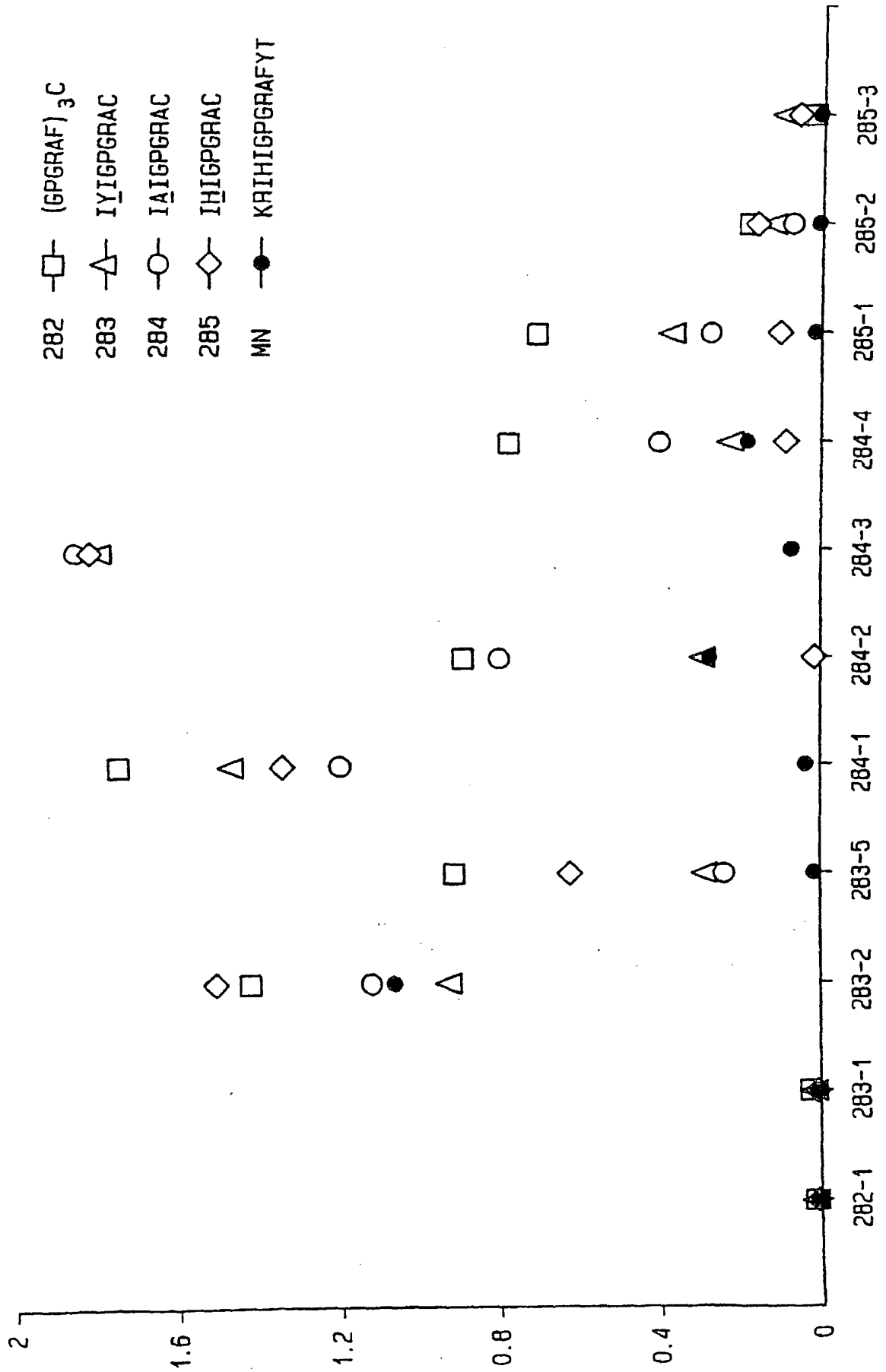


Fig. 1

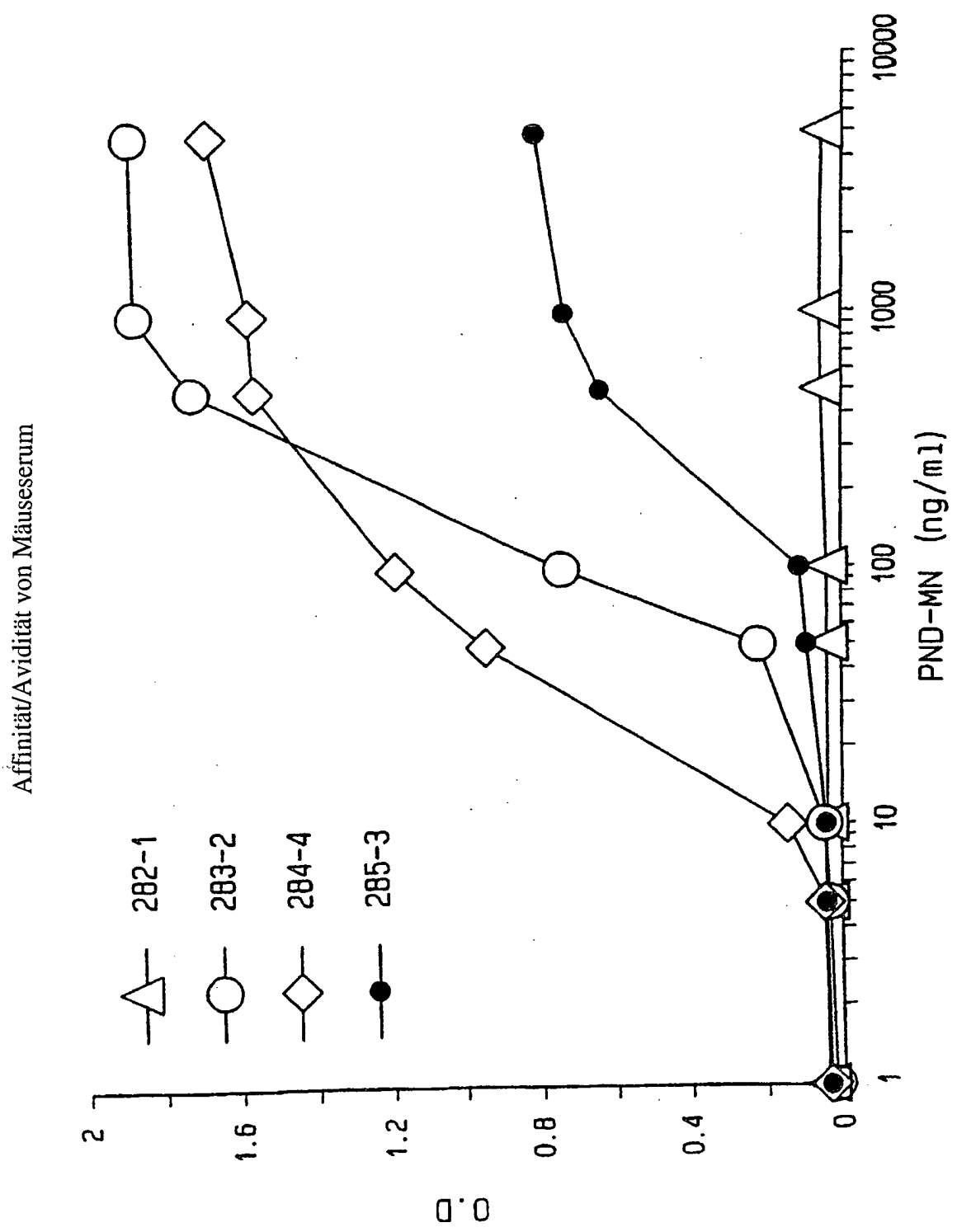
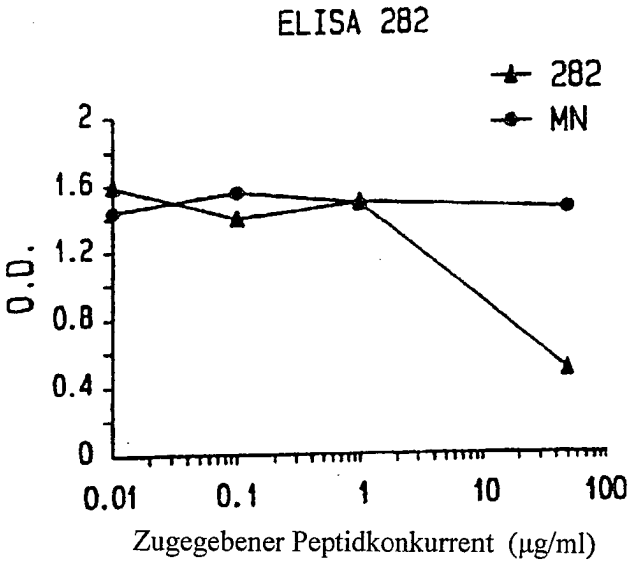

Affinität/Avidität von Mäuseserum
O.D
2
1.6
1.2
0.8
0.4
0
1
10
100
1000
10000
PND-MN (ng/ml)
282-1
283-2
284-4
285-3

Fig.2

Maus 283-5



Maus 284-4

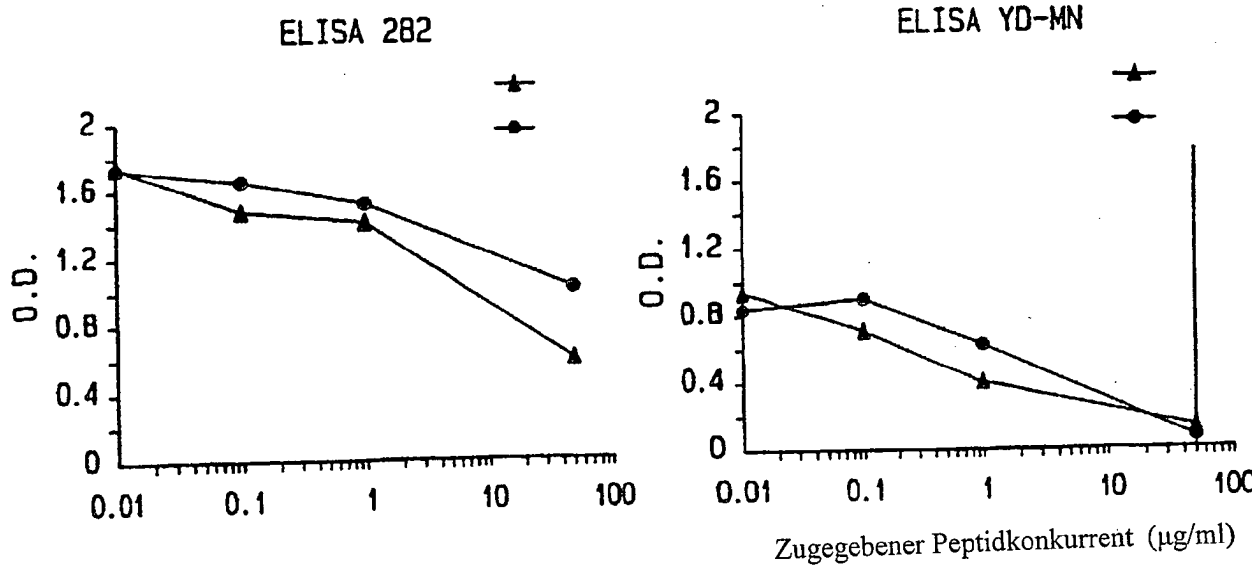


Fig.3