SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

1162-94

(22) Dátum podania: 23.03.93

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 861 701

(32) Dátum priority: 01.04.92

(33) Krajina priority: US

(40) Dátum zverejnenia: 06.11.96

(86) Číslo PCT: PCT/US93/02629, 23.03.93

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6] :

A 61K 39/42
C 07K 16/08

(71) Prihlasovateľ: MERCK & CO., INC., Rahway, NJ, US; Med-Immune, Inc., Gaithersburg, MD, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Emini Emilio A., Paoli, PA, US;
Conley Anthony J., Exton, PA, US;
Mark George E., Princeton Junction, NJ, US;
Johnson L., Syd, Germantown, MD, US;
Pfarr David S., Gaithersburg, MD, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Rekombinantné ľudské protilátky proti HIV, kazeta na expresiu, hostiteľská bunka a farmaceutický prostriedok proti HIV**

(57) Anotácia:
Boli pripravené rekombinantné ľudské molekuly imunoglobínu, neutralizujúce HIV-1, je opísaný spôsob výroby týchto imunoglobulínov a ich použitie vo forme farmaceutických prostriedkov na prevenciu a liečenie infekcie HIV. Ďalej sú opísané konštrukcie DNA s obsahom komplementárnych oblastí CDR a rámce FR kódujúce natívnu ľudskú protilátku a expresiu príslušnej kazety v rekombinantných hostiteľských bunkách.

Rekombinantné ľudské protilátky proti HIV, kazeta na expresiu, hostiteľská bunka a farmaceutický prostriedok proti HIV

Oblasť techniky

Vynález sa týka rekombinantnej ľudskej neutralizačnej protilátky proti vírusu HIV-1, spôsobu výroby príslušných imunoglobulínov na prevenciu infekcie HIV-1 a tiež kazety na expresiu, hostiteľskej bunky, v ktorej k expresii dochádza a farmaceutického prostriedku na prevenciu a liečenie infekcie vírusom HIV-1 in vivo.

Doterajší stav techniky

Bolo dokázané, že oblasť gp120 V3 je uzavretá slučka približne 30 zvyškov aminokyselín, viazaných disulfidovou väzbou, ako bolo opísané v Leonard a ďalší, 1990, J. Biol. Chem., 265, str. 10373 až 82. Táto slučka v styku s neporušenou oblasťou gp120 alebo ako syntetický peptidový fragment sa viaže na neutralizačné protilátky, špecifické pre vírus typu HIV-1, ako bolo opísané v publikáciách Goudsmit a ďalší, 1988, AIDS, 2, str. 157 až 164, Goudsmit a ďalší, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, str. 4478 až 4482, Ho a ďalší, 1987, J. Virol. 61, str. 2024 až 2028, Javaherian a ďalší, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, str. 6768 až 6772, Kenealy a ďalší, 1989, AIDS Res., 5, str. 173 až 182, Rusche a ďalší, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, str. 3198 až 3202. Oblasť V3 sa teda volá základnou neutralizačnou determinantou. Vlastnosti protilátky proti V3 in vitro zahrňujú pomerne vysokú neutralizačnú činnosť proti vírusu, schopnosť neutralizovať nasledujúcu väzbu vírusu na receptor CD4 hostiteľskej bunky a schopnosť zabrániť fúzii bunky, infikovanej vírusom s neinfikovanými bunkami, ako bolo opísané v Linsley a ďalší, 1988, J. Virol., 62, str. 3695 až 3702, Skinner a ďalší, 1988, J. Virol., 62, str. 4195 až 4200. Berman a ďalší imunizovali šimpanzov oblasťou gp120, po expresii tejto oblasti rekombinantnými bunkami cicavca alebo

prekurzorom tejto oblasti, oblasťou gp160 podľa publikácie Berman a ďalší, 1990, Nature, 345, str. 622 až 625. V prípade, že sa takto imunizovaní šimpanzi dostali do styku s vírusom, bolo možné pozorovať dostatočnú ochranu len u tých opíc, ktoré boli očkované gp120. Jedinou sledovanou imunologickou odpoveďou, ktorá bola v korelácii s dosiahnutou ochranou, bola protilátka proti V3. Girard a ďalší očkovali niekoľko šimpanzov radom imunogénnych látok, jednou z nich boli syntetické imunogény, špecifické pre slučku V3, ako bolo opísané v Girard a ďalší, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, str. 542 až 546. Podstatnejšiu účinnosť v zmysle neutralizácie vírusu bolo možné pozorovať len po očkovaní uvedenými látkami. Po styku s vírusom nedošlo k infekcii vôbec alebo k nej došlo oveľa neskoršie. Ďalej bola opísaná neutralizácia in vitro, pri ktorej bola ochrana pred infekciou alebo oneskorenie infekcie taktiež v korelácii s prítomnosťou protilátok, neutralizujúcich vírus v mieste slučky V3 podľa publikácie Emini a ďalší, 1990, J. Virol., 64, str. 3647 až 3678.

V poslednej dobe dokázali Vart a ďalší, že chimérna molekula, zložená z oblasti Fc ľudského IgG a oblasti vírusu pre väzbu na receptor CD4 môže taktiež chrániť šimpanzov proti infekcii HIV-1 v prípade, že je podaná pred naočkovaním vírusom, ako bolo opísané v publikácii Vard a ďalší, 1991, Nature, 352, str. 434 až 436. Avšak na rozdiel od protilátok proti slučke V3 sú látky, ktoré blokujú väzbu vírusu na receptor CD4 slabými látkami na neutralizáciu infektivity vírusu HIV-1 in vitro a ich účinok je okrem toho možné ľahko znížiť zmenami afinity väzby gp120-CD4, ako bolo opísané v publikácii Layne a ďalší, 1991, J. Virol., 65, str. 3293 až 3300, Kang a ďalší, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, str. 6171 až 6175, Thali a ďalší, 1991, J. Virol., 65, str. 5507 až 5012.

V súčasnej dobe dokázali Emini a ďalší, že chimérne myši a ľudská monoklonálna protilátka, špecifická pre jediný kmeň HIV-1 IIIb, môže zabrániť infekcii vírusom HIV-1 IIIb u šimpanzov a to v prípade, že je podaná pred expozíciou aj

po expozícii vírusu, ako bolo opísané v Emini a ďalší, 1992, Nature, 355, str. 728 až 730.

Vynález si kladie za úlohu pripraviť nové rekombinantné ľudské imunoglobulíny, ktoré by neutralizovali HIV-1 a nové rekombinantné časti Fab a Fv neutralizačného ľudského imunoglobulínu proti HIV-1. Vynález si taktiež kladie za úlohu pripraviť nové reťazce DNA, ktoré sú kódovými reťazcami pre ľudský neutralizačný imunoglobulín proti HIV-1 a vektormi na expresiu, obsahujúce tieto nové kódové reťazce DNA pre uvedený imunoglobulín. Vynález sa týka aj prípravy hostiteľských buniek, obsahujúcich vektory na expresiu s novými kódovými reťazcami DNA pre imunoglobulín a prípravy nového rekombinantného ľudského neutralizačného imunoglobulínu proti HIV-1 s modifikovanými konštatnými oblasťami. Vynález si kladie sa úlohu navrhnúť uvedené látky tak, aby bolo možné predchádzať infekcii HIV-1 podaním rekombinantného neutralizačného ľudského imunoglobulínu proti HIV-1 a dosiahnuť tak ochranu proti uvedenej infekcii.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoria rekombinantné neutralizačné ľudské imunoglobulíny proti HIV-1 a spôsoby na klonovanie a expresiu týchto rekombinantných imunoglobulínov v hostiteľských bunkách. Kódové reťazce pre neutralizačné ľudské imunoglobulíny proti HIV-1 alebo pre komplementárnu determinačnú oblasť CDR týchto imunoglobulínov, rekombinantne spojené s konštantnou ľudskou kódovou DNA sa klonujú a uložením do vektora na expresiu sa dosiahne expresia v rekombinantných hostiteľských bunkách.

Vynález sa týka neutralizačných ľudských imunoglobulínov proti HIV-1 a rekombinantnej konštrukcie a expresie špecifických imunoglobulínov. Tieto špecifické rekombinantné imunoglobulíny obsahujú neutralizačné imunoglobulíny pre komplementárne determinačné oblasti CDR. Imunoglobulíny, obsahujúce komplementárne determinačné oblasti CDR pre rekombinantný HIV-1 je možné modifikovať rekombinantným

spôsobom tak, aby v dlhom a/alebo krátkom reťazci obsahovali oblasti, ktoré sú odlišné od zodpovedajúcich oblastí v pôvodnom prírodnom imunoglobulíne.

Rekombinantný modifikovaný imunoglobulín je napríklad možné previesť na izotop IgG1 z akéhokoľvek iného izotypu IgG alebo akejkoľvek inej skupiny imunoglobulínu.

Infekcii HIV je možné predchádzať tak, že sa rekombinantné neutralizačné imunoglobulíny proti HIV-1 podávajú buď pred infekciou HIV-1 alebo po tejto infekcii. V prípade podania po infekcii už teda nejde o prevenciu, ale o liečenie infekcie HIV-1 podaním rekombinantného neutralizačného imunoglobulínu proti HIV-1.

Podstatu vynálezu tvorí aj spôsob konštrukcie a expresie modifikovanej protilátky, tento postup spočíva v tom, že sa

i) prevedú príslušné mutácie a zostavia sa variabilné oblasti vrátane CDR a základných konštrukčných oblastí FR,

ii) skonštruuje sa vektor na expresiu, obsahujúci aspoň jednu variabilnú oblasť, ktorá má po transfekcii buniek za následok sekréciu bielkoviny, u ktorej je možné stanoviť jej špecifickosť a

iii) uskutoční sa súčasná amplifikácia vektora na expresiu dlhého a krátkeho reťazca za použitia príslušných bunkových línií.

Vynález sa taktiež týka rekombinantných metód na uloženie oblasti CDR z iných monoklonálnych protilátok iných živočíchov do konštrukcie ľudského imunoglobulínu tak, aby výsledná rekombinantná ľudská protilátka bola pri podaní človeku len slabo imunogénna alebo neimunogénna. Pri podaní na liečebné účely je výhodné, aby takto pripravené rekombinantné bielkoviny boli rozpoznané organizmom ako vlastné bielkoviny. Tento postup "humanizácie" spôsobí, že takto skonštruované rekombinantné protilátky budú na liečebné účely použiteľné vzhľadom na to, že po podaní človeku budú len slabo imunogénne alebo budú neimunogénne. Vynález ďalej zahrňuje rekombinantnú premenu monoklonálnej protilátky aké-

hokoľvek živočícha na ľudskú rekombinantnú monoklonálnu protilátku, postup je možné uskutočniť za predpokladu, že je možné identifikovať vhodnú oblasť na uskutočnenie tejto konštrukcie, ako bude ďalej podrobnejšie opísané. Vynález sa podrobne zaoberá prípravou nukleotidových reťazcov a reťazcov aminokyselín pre oblasti CDR u človeka a u iných živočíchov, pričom súčasne sú pripravované aj ľudské konštrukčné oblasti oddelene alebo v kombinácii ako krátke alebo dlhé reťazce alebo ako intaktný imunoglobulín, zahrnuté sú taktiež akékoľvek konzervatívne modifikované varianty. Monoklonálne protilátky z iných živočíchov sú napríklad myšie monoklonálne protilátky, schopné sa viazať na HIV-1 a príslušné mMAb, ktoré sú produkované hybridómami, uložené v zbierke hybridómových buniek vo verejnej zbierke kultúr American Type Culture Collection, ATCC a sú opísané v katalógu ATCC Catalog of Cell Lines and Hybridomas, č. 6, 1988.

V opise prihlášky sa používa pre aminokyseliony označenie tromi písmenami a označenie jedným písmenom, ide o štandardné označenie v danej oblasti techniky, skratky pre jednotlivé aminokyseliny sú ďalej uvedené:

alanín	Ala	A	leucín	Leu	L
arginín	Arg	R	lyzín	Lys	K
asparagín	Asn	N	metionín	Met	M
kyselina asparagová	Asp	D	fenylalanín	Phe	F
cysteín	Cys	C	prolín	Pro	P
kyselina glutamová	Glu	E	serín	Ser	S
glutamín	Gln	Q	treonín	Thr	T
glycín	Gly	G	tryptofan	Trp	W
histidín	His	H	tyrozín	Tyr	Y
izoleucín	Ile	I	valín	Val	V

Vynález sa týka aj spôsobu a prostriedkov na konštrukciu a expresiu špecifickej protilátky, ktorá je schopná neutralizovať HIV-1. Zdrojom periférnych buniek B, u ktorých

dochádza k expresii neutralizujúcich protilátok boli vzorky krvi, odobrané od HIV-1 pozitívnych jednotlivcov. Uvedené bunky potom boli imortizované pomocou infekcie vírusom Espstein-Barr, EBV, potom boli jednotlivé klony B-buniek sledované na svoju schopnosť vylučovať protilátku, ktorá by sa viazala na peptidový reťazec, reprezentujúci slučku V3 kmeňa MN vírusu HIV-1 pri vykonávaní skúšky ELISA na tuhej fáze. Klony B-buniek, ktoré boli pri tejto skúške pozitívne, potom boli stabilizované fúziou s bunkovou líniou SHM-D33 (myší x ľudský heterohybridóm, ATCC CRL 1668). Výsledné klony heterohybridómu B-buniek boli sledované na svoju schopnosť produkovať protilátku, ktorá by rozpoznávala peptid zo slučky MN V3 pri vykonávaní skúšky ELISA na tuhej fáze. Týmto spôsobom je možné stanoviť kritéria na identifikáciu a izoláciu stálych buniek, produkujúcich ľudskú protilátku, pričom produkovaná protilátka je potenciálne použiteľná pre ďalší vývoj prostriedkov, použiteľných na predchádzanie infekcie HIV, a to v prípadoch, kedy sa predpokladá ohrozenie infekciou HIV-1 a tiež na liečebné účely u jednotlivcov, ktorí už sú HIV-1 pozitívni.

Na molekulárne klonovanie kódovej DNA pre protilátku proti HIV-1 je možné použiť ktorýkoľvek z celého radu známych postupov. Tieto postupy zahrňujú napríklad priamu funkčnú expresiu génu pre protilátku s následnou konštrukciou banky cDNA v príslušnom systéme vektora ne expresiu. Ďalší postup spočíva v tom, že sa systematicky sleduje banka cDNA s obsahom protilátky, skonštruovaná v bakteriofágu alebo vo vektore, napríklad v plazmide za použitia značenej oligonukleotidovej sondy, skonštruovanej z reťazcov aminokyselín ako fragmentov protilátky.

Ďalej budú opísané niektoré výhodné postupy na prípravu rekombinantných reťazcov DNA pre variabilné oblasti protilátky, krátke reťazce a dlhé reťazce z vyššie opísaných ľudských línií B-buniek v spojení so stálymi oblasťami ľudského pôvodu. Tieto rekombinantné DNA je možné použiť na transfekciu buniek cicavcov tak, aby u nich dochádzalo k expresii rekombinantných ľudských protilátok, ktoré si uchovávajú

svoju antigénnu špecifickosť, to znamená špecifickosť človeka ako darcu protilátky, odvodenej od B-bunky. Je zvlášť výhodné, aby v prípade podania na liečebné účely boli rekombinantné imunoglobulíny rozpoznané ako bielkoviny vlastného tela. Celková RNA sa extrahuje z ľudských heterohybridómov, napríklad z buniek ľudského heterohybridómu tak, ako bolo vyššie opísané, za použitia štandardných metód, ktoré zahrňujú napríklad solubilizáciu spracovaných buniek pôsobením guanidíniumizotiokyanátu spôsobom podľa publikácie Chirgwin a ďalší, Biochem., 18, 5294 až 5299, 1979.

Je zrejmé, že aj iné bunky, produkujúce protilátky proti HIV-1 budú použiteľné na prípravu rekombinantných molekúl DNA, ktoré budú kódovými molekulami pre časť alebo pre celú molekulu protilátky proti HIV-1. Takéto bunky, produkujúce protilátky proti HIV-1 boli opísané napríklad v publikáciách Gorney M. K. a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:3238 až 3242, 1991, Robinson J. E. a ďalší, AIFS Res. Hum. Retrovir., 6:567 až 579, 1990, Posner M. R. a ďalší, J. Immunol., 146:5325 až 4331, 1991, Ho D. D. a ďalší, J. Virol., 65:489 až 493, 1991, Tilley S. A. a ďalší, Research Virol., 142: 247 až 259, 1991 a tiež ATCC katalóg, Catalogue of Cell Lines And Hybridomas, 7. vydanie, 1992. Heterohybridóm 447-52D tak, ako bude ďalej opísaný, je možné uviesť ako primárny príklad opísaného postupu.

Odborníkom bude zrejmé, že ľudský imunoglobulín Ig môže obsahovať ľahké reťazce kapa alebo lambda alebo môže ísť o akýkoľvek z nasledujúcich izotypov dlhých reťazcov alfa (IgA), delta (IgD), epsilon (IgE), gama (IgG) a μ (IgM).

Každý z piatich uvedených izotypov dlhých reťazcov protilátky svojou prítomnosťou mení vlastnosti celej molekuly protilátky. Napríklad IgA je hlavnou skupinou protilátok v sekretoch, napríklad v mlieku, v slinách, v slzách a v sekretoch dýchacích ciest a zažívacej sústavy, tieto protilátky je teda možné bežne nájsť na povrchu epiteliálnych buniek, ktoré tvoria výstelku črevných ciest, priedušiek, pohlavných orgánov alebo vývodov mliečnej žľazy, slinných žliaz a slzných žliaz. IgM je hlavnou skupinou protilá-

tok, k sekrécii ktorých do krvi dochádza v priebehu raného obdobia primárnej tvorby protilátok ako odpovede na styk s antigénom, ide o multivalentnú protilátku, ktorá má zvyčajne celkom 10 väzbových miest pre väzbu antigénu. Typ IgE má vysokú afinitu pre receptory väčšiny buniek a pre bazofilné leukocyty a zvyčajne sa zúčastňuje pri alergických reakciách. Typ IgD sa zvyčajne nachádza na povrchu B-buniek v ich kľudovom stave, funkcia tohto typu protilátok je zatiaľ nejasná. Typ IgG je hlavnou skupinou imunoglobulínu v krvi a je vo veľkom množstve produkovaný pri sekundárnej imunologickej odpovedi, oblasť Fc sa môže viazať na fagocytárne bunky a tak napomáhať fagocytóze, oblasť Fc môže aktivovať komplementárny systém, rovnako ako tomu je pri type IgE a ide o jedinú protilátku, ktorá môže prechádzať placentou a dostať sa tak do krvného obehu plodu.

Normálny ľudský imunoglobulín skupiny G obsahuje štyri podskupiny, ktorých biologické vlastnosti a biochemické vlastnosti sú odlišné. Normálny IgG obsahuje približne 70 % IgG1, 18 % IgG2, 8 % IgG3 a 3 % IgG4. Spôsob a trvanie styku s antigénom, typ antigénu a aj genetické pozadie môžu podstatným spôsobom ovplyvniť podskupiny protilátky IgG, ktoré budú produkované. Vzhľadom na to, že ide o hlavnú skupinu imunoglobulínu, má úloha IgG a podskupín tejto protilátky veľkú dôležitosť pre imunitu a pre rôzne ochorenia.

Môže byť žiaduce pripraviť rekombinantnú protilátku proti HIV, ktorá má odlišný dlhý reťazec alebo podtyp tohto reťazca než prírodná protilátka pri použití rekombinantnej DNA. Je napríklad možné postupovať tak, že natívnou protilátkou môže byť IgM alebo iná skupina imunoglobulínu, ktorá je menej žiaduca než IgA na prípravu molekuly rekombinantnej protilátky, ktorá by mala byť vylučovaná do dýchacích ciest, do črevného systému alebo do pohlavných orgánov. Pri použití rekombinantnej DNA spôsobom, ktorého princíp je v danej oblasti techniky známy, je možné nahradiť stálu oblasť dlhého reťazca protilátky typu IgM dlhým reťazcom protilátky IgA a dosiahnuť expresiu takto získanej rekombinantnej protilátky. Okrem toho je možné natívnu protilátku IgG3 rekombi-

nantne pozmeniť za vzniku protilátky IgG1 v prípadoch, v ktorých je žiaduce získať protilátku s vyššou schopnosťou pre komplementárny systém.

Premena molekuly protilátky z jednej podskupiny IgG na inú podskupinu IgG rekombinantnou technikou je v priebehu prihlášky formou príkladu dokázaná za použitia protilátky 447-52D proti HIV. Protilátka 447-52D v svojej prírodnej forme je protilátka typu IgG3, ktorá bola premenená na protilátku IgG1 postupmi, ktoré budú ďalej uvedené. Odborníkom bude zrejmé, že uvedený rekombinantný postup je možné použiť na premenu dlhých reťazcov imunoglobulínu, ktoré sú odlišné od protilátky IgG a tiež na premenu jednej podskupiny IgG na ďalšiu podskupinu, avšak odlišnú od podskupiny IgG1.

Páry oligodeoxynukleotidových primérov, ktoré sú znázornené na obr. 1 a ktoré predstavujú reťazce v oblasti ľudského VH signálneho reťazca a ľudského C-gama 3'-zakončenia a signálne reťazce ľudských protilátok V-lambda a tiež 3'-zakončenie ľudského reťazca C-lambda je možné syntetizovať na automatickom syntetizátore DNA, Applied Biosystem 381A, získaný materiál sa oddelí od živice pôsobením koncentrovaného hydroxidu amónneho, zbaví sa solí na NAP-5, elúcia sa vykonáva vodou rovnako ako v prípade všetkých ďalej opísaných oligodeoxynukleotidových primérov. Celková RNA v množstve približne 1 mikrogram sa podrobí reverznej transkripcii po dobu približne 30 minút pri teplote 42 °C za použitia približne 200 jednotiek reverznej transkriptázy AMV (Boehringer Mannheim Biochemicals) a približne 10 pmolov komplementárnych primérov pre dlhý alebo pre ľahký reťazec. Reverzná transkriptáza sa inaktivuje teplom približne 5 minút pri teplote 95 °C a reakčná zmes sa doplní tak, že obsahuje 100 mikrolitrov PCR-pufra, približne 50 pmolov každého z párových primérov a 25 jednotiek Taq-polymerázy. Potom sa vykoná približne 45 cyklov amplifikácie (1 minúta pri 94 °C, 2 minúty pri 55 °C a 2 minúty pri 72 °C), výsledný produkt sa čistí na géli za získania predpokladaných fragmentov DNA, približne 1400 párov báz vo fragmente DNA pre dlhý reťazec a 700 párov báz vo fragmente DNA krátkeho reťazca. Pred sub-

klonovaním v príslušných plazmidoch sa takto získaná DNA rozštiepi pôsobením EcoRI v prípade dlhého reťazca alebo pôsobením EcoRI a SalI v prípade krátkeho reťazca a vzniknuté fragmenty sa čistia elektroforézou na agarozovom géli. Potom sa cDNA pre dlhý reťazec klonuje za použitia derivátu plazmidu pUC18, v ktorom boli predbežne vytvorené miesta pôsobenia enzýmov NcoI a NotI medzi už vopred existujúcimi miestami pôsobenia enzýmu KpnI a BamHI. Krátky reťazec bol klonovaný za použitia plazmidu pUC18. Mnohopočetné klony, ktoré predstavujú reťazce, amplifikované pomocou PCR sa pestujú a potom sa analyzujú reťazce týchto klonov. Špecifický reťazec DNA, ktorý predstavuje reťazec pre variabilnú oblasť dlhého ľudského reťazca, je možné pripraviť analýzou vopred určeného reťazca aminokyselín, obdobným spôsobom je možné získať aj variabilnú oblasť ľudského krátkeho reťazca lambda. Reťazec klonovanej cDNA pre protilátku 447-52D tak, ako bude ďalej uvedený, dokazuje, že dlhý reťazec je veľmi blízko príbuzný variabilnej oblasti dlhého reťazca podskupiny III, viazanej na konštantnú oblasť gama 3, kým variabilná oblasť krátkeho reťazca je veľmi blízko príbuzná variabilnej oblasti podskupiny I, viazanej na konštantnú oblasť lambda. Rekombinantná protilátka 447-53D tak, ako je v priebehu prihlášky opísaná, je skonštruovaná tak, aby obsahovala V-oblasť, ktorá tvorí časť heterohybridómu 447-52D a ľudskú oblasť gama 1 (namiesto natívnej oblasti gama 3) a oblasť lambda 2, ide o konštantné oblasti, reťazec úplného rekombinantného imunoglobulínu 447-52D je znázornený na obr. 2A a 2B.

Pre cDNA pre klonovanú protilátku tak, ako je získaná vyššie opísanými postupmi, je možné dosiahnuť rekombintnú expresiu pomocou molekulárneho klonovania vo vektore na expresiu, ktorý obsahuje vhodný promótor a ďalšie príslušné regulačné prvky, nutné na uskutočnenie transkripcie, takto pripravený vektor je potom možné preniesť do prokaryotických alebo eukaryotických hostiteľských buniek, ktoré potom môžu produkovať zodpovedajúce rekombinantné protilátky. Postupy, ktorými je možné tieto genetické manipulácie uskutočniť, sú

podrobne opísané vo vyššie uvedenej publikácii Maniatis T. a ďalší a sú v danej oblasti techniky vykonávané.

Vektory, ktoré je možné použiť na expresiu v eukaryotických bunkách, je možné skonštruovať pomocou postupov, ktoré budú ďalej uvedené. Vektory na expresiu je možné všeobecne považovať za reťazce DNA, ktoré sú nevyhnutné na uskutočnenie transkripcie klonovaných kópií génov a na transláciu ich príslušných mRNA do príslušného hostiteľa. Vektory tohto typu je možné použiť na expresiu eukaryotických génov u celého radu hostiteľov, ako sú baktérie, modrozelené riasy, rastlinné bunky, bunky kvasiniek, hmyzu a rôznych živočíchov. Expresiu imunoglobulínu je možné dosiahnuť aj za použitia rôznych systémov na báze vírusov.

Špecificky skonštruované vektory dovoľujú prenos DNA medzi jednotlivými hostiteľmi, napríklad medzi baktériami a kvasinkami alebo medzi baktériami a živočíšnymi bunkami. Príslušne skonštruovaný vektor na expresiu by mal obsahovať nasledujúce prvky: začiatok replikácie na autonómnu replikáciu v hostiteľských bunkách, označenie na uľahčenie selekcie, obmedzený počet použiteľných miest pôsobenia reštrikčných enzýmov, dostatočný potenciál na zaistenie vysokého počtu kópií a silné promótory. Promótor je možné všeobecne definovať ako taký reťazec DNA, ktorý napomáha uskutočniť väzbu RNA-polymerázy na DNA a tým pomáha uskutočniť syntézu RNA. Silný promótor je taký promótor, ktorý spôsobuje začiatok tvorby mRNA s vysokou frekvenciou. Vektory na expresiu môžu obsahovať vektory rôzneho typu, je možné použiť napríklad bežné vektory na klonovanie, modifikované vektory na klonovanie, špecificky konštruované plazmidy alebo vírusy.

Na expresiu rekombinantných protilátok proti HIV-1 v bunkách cicavcov je možné použiť celý rad vektorov na expresiu u cicavcov. Z bežne dostupných a dodávaných vektorov na expresiu u cicavcov, ktoré môžu byť vhodné na použitie pri expresii rekombinantných protilátok, je možné uviesť napríklad vektory pMClneo (Stratagene), pXTI (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37593),

pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUTCag (ATCC 37460) a lambdaZD35 (ATCC 37565).

Kódová DNA pre protilátku proti HIV-1 môže byť tiež klonovaná za použitia vektora na expresiu v rekombinantnej hostiteľskej bunke. Ako rekombinantnú hostiteľskú bunku v tomto prípade je možné použiť prokaryotické alebo eukaryotické bunky, môže ísť napríklad o bunky baktérií, kvasiniek alebo cicavcov, v prípade cicavcov môže ísť napríklad o bunkové línie človeka, hovädzieho dobytka, ošípaných, opíc alebo hlodavcov alebo tiež hmyzu, v tomto prípade môže napríklad ísť o bunkové línie, odvodené od Drosophila. Bunkové línie, odvodené od rôznych čeľadí cicavcov, ktoré sú použiteľné a ktoré sú bežne komerčne dostupné zahrňujú napríklad bunkové línie CV-1 (ATCC CCL 70), COS-1 (ATCC CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), C127I (ATCC CRL 1616), BS-C1 (ATCC CCL 26) a MRC-5 (ATCC CCL 171).

Vektor na expresiu je možné do hostiteľských buniek uložiť ktorýmkoľvek z veľkého počtu známych postupov, ako je napríklad transformácia, transfekcia, fúzia protoplastov alebo otvorenie pórov pôsobením elektrického prúdu. Bunky, obsahujúce vektor na expresiu je možné klonovať a jednotlivo analyzovať tak, aby bolo možné stanoviť, či u nich dochádza k produkcii protilátky proti HIV-1. Identifikáciu klonov hostiteľských buniek, u ktorých dochádza k expresii príslušnej protilátky je možné uskutočniť celým radom spôsobov, ide napríklad o stanovenie imunologickej reaktivity za použitia protilátok proti protilátkam a o dôkaz protilátky proti HIV-1, prítomnej v hostiteľskej bunke.

Expresiu DNA pre protilátku je možné dosiahnuť aj pomocou syntetickej mRNA, ktorá bola produkovaná in vitro. Túto syntetickú mRNA je možné s vysokou účinnosťou preniesť do rôznych bezbunkových systémov, môže ísť napríklad o extrakciu z pšeničných klíčkov alebo o extrakty z retikulocytov, účinnú transláciu je však možné dosiahnuť aj v rôznych sys-

témoch s obsahom buniek, je napríklad možné previesť mikroinjekcie do žabích vajíčok, pričom z uvedených metód je výhodným postupom práve mikroinjekcia do žabích vajíčok.

Ako je zrejmé z obr. 3, bolo syntetizovaných približne osem oligodeoxynykleotidových primérov, ide o priméry, potrebné na uskutočnenie polymerázovej reťazovej reakcie, PCR-reakcie pre amplifikáciu piatich fragmentov DNA. Do všetkých týchto primérov, s výnimkou posledného oligodeoxynukleotidového priméru boli uložené tie reťazce heterohybridómu 447-52D alebo reťazce, komplementárne k signálnemu reťazcu a fragmentom intrónov, ktoré sú určené na spojenie v V-oblasti 447-52D a aspoň 15 báz 5'-terminálneho komplementárneho reťazca tak, aby mohlo dôjsť k nasledujúcej PCR-riadenej rekombinácii uvedených troch fragmentov spôsobom podľa publikácie Daugherty B. L. a ďalší, DNA 9, 453 až 459, 1990. Príslušný pár primérov, S1 a S2, H1 a H2 a I1 a I2, približne 50 pmolov každého z týchto reťazcov sa uvedie do reakcie s približne 10 ng DNA plazmidu, predstavujúci úsek pre dlhý reťazec 446-52D, približne 2,5 jednotkami Taq DNA-polymerázy a potom sa uskutoční približne 25 cyklov PCR-amplifikácie (jeden cyklus: 1 minúta pri 94 °C, 1 minúta pri 55 °C a 2 minúty pri 72 °C). Produkty z piatich reakcií tohto typu sa potom čistia za použitia elektroforézy na agarozovom géli, potom sa spoja, ide o približne 10 ng každého fragmentu DNA spolu s terminálnymi oligodeoxynukleotidovými primérmi (A1 a A2, z obr. 3) a o Taq DNA-polymerázu (obr. 4). Spojené fragmenty sa amplifikujú pomocou PCR (25 cyklov: 2 minúty pri 94 °C, 2 minúty pri 55 °C, 2 minúty pri 72 °C). Po rozštiepení pôsobením reštrikčných endonukleázy, pri ktorom dôjde k rozštiepeniu dlhého reťazca V-oblasti DNA v blízkosti signálneho reťazca a reťazca intrónu pôsobením enzýmu HidIII a XhoI sa amplifikovaná DNA čistí za použitia elektroforézy na agarozovom géli a potom sa klonuje v kompaktných miestach vektora p9103, ktorý obsahuje stálu oblasť dlhého reťazca gama 1 človeka, ako je znázornené na obr. 5. Tento vektor je možné skonštruovať nasledujúcim spôsobom. Príslušná DNA sa čistí z klonu kozmidu cosIg9, opísaného

v publikácii Flanagan a Rabbits, Nature 300, 709 až 713, 1982 a použije sa ako matrica pre PCR-amplifikáciu ľudskej konštantnej oblasti gama 1. Príslušný pár primérov (G1 a G2, z obr. 1), približne 50 pmolov každého z týchto primérov sa naviaže na približne 10 ng DNA-kozmidu, ktorá obsahuje exóny konštantnej ľudskej oblasti gama 1, približne 2,5 jednotkami Taq DNA polymerázy a potom sa uskutoční približne 25 cyklov PCR-amplifikácie (jeden cyklus: 1 minúta pri 94 °C, 1 minúta pri 55 °C a 2 minúty pri 72 °C). Produkt reakcie sa rozštiepi reštrikčnými enzýmami XhoI a EcoRI, čistí sa elektroforézou na agarozovom géli a klonuje vo vektore p9102, ktorý obsahuje fragment promótora HIV-1 (v rozsahu párov báz -117 až +80, ide o pCD23, opísaný v Siekevitz a ďalší, Science 238, 1575, 1987. Signálny peptid a V-oblasť krátkeho reťazca v susedstve intrónu sa rozštiepi za použitia reštrikčných enzýmov HindIII a XbaI a amplifikovaná DNA sa čistí za použitia elektroforézy na agarozovom géli a potom sa klonuje vo vektore FFFF, ktorý bude ďalej opísaný a ktorý bol vopred rozštiepený za použitia reštrikčných enzýmov HindIII a EcoRI, súbežne s fragmentom DNA, ktorý predstavuje kódový reťazec pre exón konštantnej oblasti ľudského krátkeho reťazca. Tento posledne uvedený fragment je možné získať PCR-amplifikáciou 10 ng DNA plazmidu # 208 a obsahom fragmentu EcoRI/HindIII, ktorý zahrňuje časť konštantnej oblasti ľudského úseku lambda 2. Príslušný pár primérov (C1 a C2, z obr. 1), približne 50 pmolu každého z týchto primérov sa uvedie do reakcie s DNA plazmidu a približne 2,5 jednotkami Taq DNA polymerázy a potom sa uskutoční približne 25 cyklov PCR-amplifikácie (1 cyklus: 1 minúta pri 94 °C, 2 minúty pri 55 °C a 2 minúty pri 72 °C). Produkt reakcie s veľkosťou 620 párov báz sa rozštiepi pomocou reštrikčných enzýmov XbaI a EcoRI a rozštiepený materiál sa čistí elektroforézou na agarozovom géli a potom sa použije na vyššie opísanú väzbu troch fragmentov. Pri analýze výsledných klonov pre expresiu je možné dokázať prítomnosť uloženého ľahkého reťazca s veľkosťou približne 1,2 kb po rozštiepení materiálu pôsobením reštrikčných enzýmov

HindIII a EcoRI s následnou elektroforézou na agarozovom géli.

Molekuly imunoglobulínu s obsahom dlhého reťazca a krátkeho reťazca sa podrobia transkripcii z plazmidov, ktoré sú totožné až na to, že obsahujú kódové reťazca pre iný imunoglobulín. Výhodným prekurzorom pre vektor na expresiu imunoglobulínu je vektor, ktorý bol vyššie opísaný a ktorý obsahuje časť LTP promótora z HIV-1 (bázy -177 až +80, vztiahnuté na začiatok), miesto na klonovanie a polyadenylačný signál SV40, ako je znázornené na obr. 7. Plazmid pEE14 (Celltech, Ltd.) je zdrojom pre väčšinu reťazcov DNA v uvedenom vektore, ktorý bol označený pSZ9015. Promótor CMVIE vektora pEE14 bol odstránený rozštiepením pomocou reštrikčných enzýmov MluI a HindIII. DNA vektora bez uvedeného promótora s veľkosťou 8 kb sa čistí za použitia elektroforézy na agarozovom géli a potom sa naviaže na fragment DNA s veľkosťou približne 250 párov báz po PCR-amplifikácii, obsahujúci 197 párov báz promótora LTR z HIV (-117 až +80) a zakončenie po pôsobení enzýmov MluI a HindIII (fragment bol získaný za použitia párov primérov z obr. 1 a DNA plazmidu pCD23CAT ako matrica). Konštantná oblasť gama 1 dlhého reťazca potom bola uložená do vektora p9015 ako fragment XbaI/EcoRI s veľkosťou 2,0 kb spolu s V-oblasťou dlhého reťazca odlišného pôvodu, čím vznikol vektor pSP72/58.2/L16VH/gama1MRC.

DNA plazmidu s obsahom variabilnej oblasti dlhého reťazca 447 a konštantnej oblasti IgG1 a s obsahom ľahkého reťazca 447 (jeho variabilnej oblasti) a konštantnej oblasti lambda 2 sa potom pestuje a čistí na transfekciu hostiteľskej bunky cicavca. Rovnaké množstvo približne 10 mikrogramov kódového plazmidu pre dlhý reťazec a kódového plazmidu pre krátky reťazec lambda sa použije na transfekciu, ktorá sa uskutoční bežným postupom za použitia zrážania fosforečnanom vápenatým, ako hostiteľská bunka sa použije ľudská bunková línia 293 embryonálnych buniek obličiek (ATCC CRL 1573). Supernatanty kultúry boli skúmané skúškou ELISA na tuhej fáze tak ako bude ďalej podrobnejšie opísané a bolo

preukázané, že obsahujú ľudský krátky reťazec lambda/ľudský imunoglobulín IgG+. Platne Immulon-2 (Dynatech. Labs.) s 96 vyhĺbeninami sa cez noc opatria povlakom približne 10 mikrogramov/ml roztoku myšej monoklonálnej protilátky proti konštantnej oblasti ľudského reťazca lambda (číslo v katalógu 05-4101, Zymed Laboratories, Inc.) vo fyziologickom roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrom (PBS) pri teplote približne 4 °C a potom sa pridá na jednu hodinu pri teplote 37 °C približne 1 % sérového albumínu hovädzieho dobytka (BSA) v PBS. Po opakovanom premytí za použitia PBS sa vzorky (upravené prostredie, obsahujúce rekombinantnú protilátku 447-52D alebo ľudský lambda/IgG1, Sigma Chemical) zriedené v PBS s obsahom 1 % BSA pridajú a zmes sa inkubuje jednu hodinu pri teplote 37 °C, každá skúška sa uskutoční v dvojakom uskutočnení. Skonštruujú sa štandardné kalibračné krivky za použitia koncentrácií IgG1 v rozmedzí približne 7,8 až 500 ng/ml. Viazaný a voľný ľudský IgG1 sa dokazujú za použitia podielu po 50 mikrolitroch pri riedení 1:400, riedi sa myšia monoklonálna protilátka proti ľudskému IgG1, Fc, konjugovaná na peroxidázu z chrenu (číslo katalógu 05-3320, Zymed Laboratories, Inc.), na riedenie sa použije PBS s obsahom približne 1 % BSA. Zmes sa inkubuje približne 1 hodinu pri teplote 37 °C, po následnom premytí sa množstvo viazaného konjugátu stanoví pridaním približne 1 mM kyseliny 2,2'-azino-bis(3-etylbenztiazolín-6-sulfónovej) v 0,1 M citráte sodnom s pH 4,2 s obsahom 0m03 % peroxidu vodíka, zmes sa inkubuje 20 minút pri teplote miestnosti. Adsorbancia vo vyhĺbeninách sa stanoví odčítacím zariadením pre platne ELISA (Bio-Rad, Inc.), nastaveným na 415 nm. Skúšku ELISA na tuhej fáze je možné uskutočniť aj za použitia platní, opatrených povlakmi peptidu s 26 zvyškami aminokyselín na báze reťazca izolátu MN. Peptid s reťazcom (NleCysTyrAsnLysArgLysArgIleGlyProGlyArgAlaPheTyrThrThrLysAsnIleIleGlyCys, reťazec číslo 1) sa syntetizuje na tuhej fáze metódou za použitia Fmoc, ide o použitie vopred aktivovaných pentafluórfenylesterov pri aktivácii hydroxybenzyltriazínom. Platne Immulon-2 sa opatria povlakom približne 1 mikrogram/ml pep-

tidu cez noc a blokujú sa za použitia približne 1% fetálneho séra hovädzieho dobytka v PBS. Detekcia viazanej protilátky 447-52D sa vykonáva vyššie uvedeným spôsobom. Protilátka, ktorá je vylučovaná ľudskými bunkami 293 po transfekcii sa po prechodnej expresii čistí chromatografiou bielkoviny A. Koncentrácia rekombinantnej protilátky 447-52D sa stanoví vyššie opísanou skúškou ELISA a protilátka sa potom čistí a skúša na svoju účinnosť dôkazom schopnosti neutralizovať infektivitu špecifických serotypov HIV-1.

Na stanovenie neutralizácie bezbunkového infekčného vírusu HIV-1 a na stanovenie inhibície šírenia infekcie z bunky na bunku sa vykonáva nasledujúca skúška, pri ktorej sa meră prežívanie buniek po pôsobení protilátky a vírusu na kultúry po dobu 7 až 8 dní. Sériové riedenie protilátky (vždy na dvojnásobok predchádzajúcej koncentrácie), sa uskutoční v živnom prostredí, ktoré bolo použité na pestovanie buniek (RPMI 1640 + 10 % fetálneho teľacieho séra) a 100 mikrolitrov tohto prostredia sa uloží vždy do jedného vyhĺbenia platne s 96 vyhĺbeninami (Costar Corp.). 100 mikrolitrov zásobného vírusu (pripraveného z chronicky infikovaných buniek H9 alebo z novo vytvorených chronicky infikovaných buniek FDA/H9, prostredie z chronicky infikovaných buniek sa po 3 dňoch nanesie pri hustote buniek 2×10^5 buniek/ml, prostredie sa vyčerí a ako skúšobná dávka sa použije 10-násobok posledného riedenia zásobného vírusu, ktoré ešte usmrtilo do 7 dní všetky bunky MT-4) sa pridá do každého vyhĺbenia a zmes vírusu a protilátky sa inkubuje 1 hodinu pri 37 °C. Potom sa do každého vyhĺbenia pridajú bunky MT-4 podľa publikácie Harada a ďalší, 1985, Science, 229, str. 563 až 566, použije sa 1×10^4 buniek/vyhĺbenie v 50 mikrolitroch živného prostredia, platňa sa potom inkubuje 7 dní pri teplote 37 °C a potom sa odpočíta výsledok. Koncentrácia posledného riedenia protilátky, pri ktorom je možné zabrániť uhynutiu buniek MT-4 sa uvádza ako koncový neutralizačný bod.

Výsledky skúšok na neutralizáciu sú znázornené na obr. 8. Z výsledkov je zrejmé, že účinnosť rekombinantnej ľudskej

protilátky 447-52D je rovnaká ako účinnosť protilátky, odvodenej od ľudského heterohybridómu 447-52D, výsledok je rovnaký pre každý zo sledovaných serotypov HIV-1. tento výsledok dokazuje, že rekombinantne skonštruovaná protilátka, ktorej expresia bola uskutočnená spolu s konštantnými ľudskými oblasťami lambda a gama 1 nebola modifikovaná do tej miery, aby došlo k zmene interakcií tejto protilátky so slučkou vírusu V3 PND.

Vynález sa teda týka konštrukcie úplnej rekombinantnej ľudskej neutralizačnej protilátky 447-52D proti HIV-1, ktorej variabilná oblasť dlhého a krátkeho reťazca obsahujú zvyšky, zodpovedajúce zvyškom protilátky ľudského heterohybridómu 447-52D, pričom dochádza k úplnému uchovaniu špecifickosti a účinnosti pôvodnej protilátky, produkovanej uvedeným heterohybridómom.

Je zrejmé, že rekombinantná ľudská protilátka proti HIV-1, pripravená vyššie uvedeným spôsobom má celkom rovnakú antigénnu špecifickosť ako prírodná protilátka a taktiež si uchováva široké spektrum neutralizačnej účinnosti proti HIV-1. Odborníkom je teda zrejmé, že pri použití postupov, uvedených v priebehu prihlášky je možné pripraviť aj iné protilátky proti HIV, takže je možné získať molekuly špecifických rekombinantných protilátok proti HIV.

Bunkové línie, ktoré produkujú ľudský IgG mAb na neutralizáciu epitopu HIV-1, napríklad epitopov, spojených s glykoproteínom gp120 je možné získať EBV-transformáciou mononukleárnych buniek z ľudskej periférnej krvi s následnou selekciou bunkových línií, ktoré produkujú protilátku s požadovanou špecifickosťou, potom sa uskutoční fúzia EBV-transformovaných buniek po selekcii s bunkovou líniou heteromyelómu. Výsledné bunky heterohybridómu potom produkujú ľudskú protilátku mAb, ktorá je špecifická proti určitému epitopu, napríklad proti epitopu gp120 vírusu HIV, ide o modifikované protilátky, produkované EBV-transformovanými bunkami.

Glykoproteín gp120, ktorý obsahuje jeden alebo väčší počet epitopov na neutralizáciu, rozpoznávaných bunkami

a protilátkami tohto vynálezu je možné odvodiť od ktorékoľvek zo známych kmeňov HIV-1, napríklad od pomerne bežného kmeňa MN vírusu HIV.

Pod pojmom "heteromyelóm" sa rozumie hybridná bunková línia, ktorá je vytvorená myelómovou bunkovou líniou pôvodu, odlišného od ľudského pôvodu a ľudskou bunkovou líniou myelómu. Zvyčajne sa ako druhá bunka na fúziu s bunkou ľudského myelómu volí bunka myelómu alebo plazmocytómu myší. Takéto bunkové línie, ktoré sú tvorené bunkovým materiálom myelómu ľudského pôvodu a myelómu, odlišného od ľudského pôvodu sú v danej oblasti techniky veľmi dobre známe, ako príklady týchto bunkových línií je možné uvádzať línie, ktoré sú opísané v publikáciách Teng N. N. a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7308, 1983, Kozbor D. a ďalší, Hybridoma, 2, 7, 1983 a Grunow R. a ďalší, J. Immunol. Meth., 106, 257 až 265, 1988.

Pri vykonávaní spôsobu podľa vynálezu sa použijú bunky heteromyelómu ako partnerský bunkový materiál pre fúziu s EBV-transformovanými ľudskými bunkami po selekcii za vzniku heterohybridómu podľa vynálezu.

Vo výhodnom uskutočnení sa použije ako partnerský bunkový materiál na fúziu bunky heteromyelóm SHM-D33. Túto bunkovú líniu je možné získať z verejnej zbierky kultúr ATCC pod číslom ATCC CRL L668.

Pod pojmom "heterohybridóm" tak, ako je v priebehu prihlášky používaný, sa rozumie hybridná bunková línia, ktorá bola pripravená fúziou buniek z jednej čeľade, produkujúcich protilátku a buniek heteromyelómu. Pojem "heterohybridóm" je tiež niekedy používaný na označenie akéhokoľvek hybridómu buniek z rôznych čeľadí, napríklad na označenie hybridómu, vzniknutého fúziou ľudskej lymfocytoidnej bunkovej línie, produkujúci protilátky a buniek potkanieho myelómu. Avšak pojem tak, ako je používaný v priebehu prihlášky, je viacej vymedzený.

V jednom z uskutočnení vynálezu sa uskutoční fúzia buniek ľudského pôvodu, produkujúcich protilátku s bunkovým materiálom heteromyelómu myš-človek. Vo výhodnom uskutočnení

je hybridóm výsledkom fúzie EBV-transformovaných ľudských lymfocytov, produkujúcich protilátku k neutralizačnému epitopu HIV s bunkovým materiálom heteromyelómu človek-myš. Vo veľmi výhodnom uskutočnení sa ako heteromyelóm človek-myš použije bunková línia, označovaná SHM-D33.

Pod pojmom "neutralizačný epitop" sa rozumie epitop, ktorý po väzbe na protilátku, špecifickú pre tento epitop spôsobí neutralizáciu vírusu. Pod pojem "neutralizácie" tak, ako je v priebehu prihlášky používaný, potom patrí neutralizácia akejkoľvek biologickej aktivity vírusu, môže ísť napríklad o tvorbu syncytia.

Aby bolo možné pripraviť ľudskú mAb proti neutralizačnému epitopu gp120 vírusu HIV-1, transformujú sa ľudské lymfocyty z periférnej krvi pomocou EBV, napríklad spôsobom podľa publikácie Gorny M. K. a ďalší, Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 86, 1624 až 1628, 1989.

S výhodou sa postup vykonáva tak, že sa bunkový materiál, určený na transformáciu získa z krvi jednotlivca, ktorý produkuje protilátky proti HIV.

Kultúry EBV-transformovaných buniek sa potom skúmajú na tvorbu protilátok proti zvolenému epitopu. V jednom uskutočnení vynálezu je neutralizačným epitopom glykoproteín gp120 a skúška na tvorbu protilátky sa vykonáva za použitia čisteného gp120, jeho fragmentu alebo syntetického peptidu, ktorý tvorí časť tohto epitopu. Vo výhodnom uskutočnení vynálezu sa kultúry transformovaných buniek skúmajú na produkciu protilátok proti slučke V3 glykoproteínu gp120 za použitia syntetického peptidového 23-meru zo slučky V3 v rozsahu aminokyselín 306 až 328, reťazec bol uvedený vyššie. Okrem tohto peptidu je možné použiť na selekciu EBV-transformovaných buniek ďalšie peptidy s obsahom aspoň šiestich aminokyselín, týmto spôsobom je možné identifikovať bunkový materiál, ktorý produkuje protilátky so špecifickosťou proti požadovanému epitopu.

Pri sledovaní bunkového materiálu na produkciu protilátok je možné použiť známe imunologické skúšky. Výhodnou imunologickou skúškou je imunoabsorpčná skúška za použitia

enzýmu, zvyčajne označovaná ELISA. Pri použití tejto skúšky sa supernatanty kultúry vyšetrujú na prítomnosť protilátok s požadovanou špecifickosťou a izotopom.

Pozitívne EBV-transformované kultúry sa opakovane klonujú akýmkoľvek spôsobom klonovania, ktorý je v danej oblasti techniky známy, napríklad za použitia dvojnásobného riedenia. Bunky z kultúr produkujúcich protilátku s požadovanou špecifickosťou je možné podrobiť fúzii s bunkovým materiálom línie heteromyelómu za vzniku heterohybridómu. Bunky sa uskutočnenej fúzii sa potom klonujú pri hustote kultúry približne 1 až 100 buniek v jednom vyhĺbení.

Špecifickosť protilátky, ktorá je produkovaná heterohybridómom je možné stanoviť známymi imunologickými skúškami. Vo výhodnom uskutočnení je možné použiť skúšku ELISA a rádioimunologické zrážanie RIP. Prostriedok s obsahom antigénu obsahuje virióny HIV-1, napríklad kmeňa MN, rozrušený vírus alebo rozrušené infikované bunky, napríklad lyzáty kmeňa MN a HTLV-IIIB, vírusové bielkoviny, napríklad gp120 alebo rekombinantné alebo syntetické peptidy vírusu, napríklad vyššie opísaný 23-mer.

Protilátky mAb podľa vynálezu patria k izotypu IgG a je možné ich izolovať zo supernatantov kultúr buniek heterohybridómu a potom čistiť niektorým zo známych spôsobov, použiteľných an čistenie IgG. Tieto metódy zahrňujú napríklad afinitnú chromatografiu bielkovín na Sepharose, kombináciu chromatografie za použitia Affigel Blue (BioRad, Richmond, CA) a chromatografie na Sepharose s proteínom-A alebo je možné použiť vysokotlakovú kvapalinovú chromatografiu.

Pri podávaní ľuďom, infikovaným HIV-1 alebo ohrozeným infekciou HIV je možné protilátkami podľa vynálezu dosiahnuť priaznivý liečebný alebo profylaktický účinok. Jednotlivci, ktorí sú zvlášť ohrození infekciou, sú teraz sledovaní a existujú aj pracovné skupiny zdravotníkov, špecializované na prevenciu infekcie HIV-1.

Protilátky podľa vynálezu je možné využiť aj na diagnostické skúšky, ktorými je možné dokázať, či bol chorý vystavený infekcii alebo či už bol infikovaný vírusom HIV-1.

Protilátky podľa vynálezu je ďalej možné použiť aj na dôkaz expresie bielkovín HIV, proti ktorým sú uvedené protilátky špecifické.

Protilátka mAb ľudského pôvodu podľa vynálezu, špecifická proti HIV môže byť použitá na liečenie jednotlivcov, ktorí sú infikovaní HIV alebo trpia ochorením AIDS. Protilátky podľa vynálezu je možné podávať parenterálne alebo enterálne akýmkoľvek známym spôsobom. Protilátky môžu napríklad byť podávané podkožne, vnútrožilovo, vnútrosvalovo, intraperitoneálne, transdermálne alebo aj intratekálne. Protilátky je možné alternatívne alebo súčasne podávať aj perorálne, rektálne alebo do pošvy. Protilátky je možné podávať aj do amniotickej dutiny pri liečení plodu ešte v maternici. Výhodným spôsobom podania je podanie vnútrožilové a vnútrosvalové.

Dávka protilátky, ktorá má byť podaná bude závisieť na veku, zdravotnom stave a na hmotnosti chorého, na druhu súčasne používaného liečenia, na frekvencii liečebných zákrokov a na povahe požadovaného účinku. Účinné množstvo protilátky mAb sa pohybuje v rozmedzí 0,1 až 500 mg denne, s výhodou 3 až 30 mg denne. Liečenie môže vyžadovať infúziu alebo injekcie protilátky v priebehu dňov, týždňov a niekedy aj rokov, ako je odborníkom zrejmé.

Pri typickom spôsobe podávania sa účinné množstvo protilátky podáva v intervaloch jeden týždeň až v priebehu 6 mesiacov. Doba trvania takéhoto liečenia, ktorá je potrebná na dosiahnutie liečebného účinku, bude u rôznych chorých rôzna v závislosti na závažnosti ich ochorenia, na štádiu, v ktorom sa ochorenie nachádza a na ostatných podmienkach, v ktorých sa chorý nachádza.

Celková dávka, ktorá je potrebná na liečenie v jednotlivých prípadoch, môže byť podaná vo forme väčšieho počtu dávok alebo ako jediná dávka. Protilátka mAb môže byť podávaná sama osebe alebo je možné ju podávať s Ďalšími liečebnými prostriedkami, ktoré sú súčasne používané proti infekcii HIV-1, ako sú napríklad AZT alebo je možné ju podávať s liečebnými látkami proti príznakom iných ochorení.

Protilátky mAb podľa vynálezu môžu byť podávané aj tehotným ženám, ktoré sú infikované HIV. Vzhľadom na to, že protilátky podľa vynálezu sú izotypy IgG, môžu prechádzať placentou a dostanú sa do organizmu plodu. Týmto spôsobom je možné zabrániť infekcii plodu v tele matky alebo je možné už infikovaný plod účinne liečiť.

Farmaceutické prostriedky, ktoré obsahujú protilátky podľa vynálezu, môžu byť akékoľvek prostriedky, v ktorých je protilátka obsiahnutá v množstve, ktoré je dostatočné na dosiahnutie požadovaného liečebného účinku. Okrem uvedenej protilátky môžu tieto farmaceutické prostriedky obsahovať ešte vhodné farmaceutické nosiče a pomocné látky, ktoré môžu uľahčiť spracovanie účinných látok na prostriedky, vhodné na farmaceutické použitie. Ďalším farmaceutickým prostriedkom, ktorý taktiež patrí do rozsahu vynálezu, môže byť prostriedok, ktorý obsahuje kombináciu protilátky podľa vynálezu so známym vnútrožilovo podávaným prostriedkom s obsahom imunoglobulínu.

Farmaceutické prostriedky podľa vynálezu zahrňujú vhodné roztoky, určené na injekčné alebo perorálne podanie, ktoré obsahujú 0,01 až 99, s výhodou 20 až 75 % účinnej zložky, v tomto prípade protilátky, spolu s pomocnými látkami. Výhodnými farmaceutickými prostriedkami na perorálne podanie sú tablety a kapsle. Farmaceutickými prostriedkami, ktoré je možné podávať rektálne alebo do pošvy, sú čípky.

Protilátky mAb podľa vynálezu, môžu byť konjugované s cytotoxickými látkami a použité ako imunotoxíny, tak ako je napríklad opísané v publikácii Vitetta a ďalší, Science, 238:1098 až 1104, 1987 alebo môžu byť začlenené do povrchu lipozómov, obsahujúcich účinné látky proti HIV alebo toxíny tak, aby bolo možné špecificky zacieliť tieto účinné látky alebo toxíny a priviesť ich až k infikovaným bunkám, na ktoré majú pôsobiť. Pojem "imunotoxín", tak ako je v priebehu prihlášky použitý, označuje konjugát protilátky s jedným alebo väčším počtom toxínov, účinných látok, rádionuklidov alebo látok s cytotoxickým účinkom. Toxická časť tohto konjugátu je viazaná na protilátku podľa vynálezu chemicky ale-

bo môže byť viazaná za použitia rekombinantnej technológie DNA. Pri tomto type väzby sa kódová DNA pre toxickú bielkovinu alebo pre jej účinný fragment viaže na kódovú DNA pre celý dlhý reťazec, krátky reťazec alebo oba reťazce protilátky mAb alebo pre časť týchto štruktúr. Genetické konštrukcie tohto typu a spôsoby, ktorými je možné tieto konštrukcie vytvoriť sú v danej oblasti techniky známe. Z toxínov, ktoré je možné viazať na protilátky podľa vynálezu, je možné uviesť ricín, toxín záškrtu, toxín Pseudomonas, faktor alfa nekrózy nádorov a ďalšie v danej oblasti techniky známe toxíny.

Pri typickom spôsobe liečenia, pri ktorom je protilátka mAb podľa vynálezu použitá ako imunotoxín, je uvedená protilátka viazaná na toxín, napríklad na ricín, ktorý je sám o sebe toxický tak pre bunky, ktoré sú infikované HIV, ako aj pre neinfikované bunky. Väzbou cytotoxickej zlúčeniny na protilátku je možné dosiahnuť vysokú úroveň toxického účinku tak, že tento účinok je lokalizovaný na cieľové bunky, ku ktorým je toxická látka privádzaná pomocou použitej protilátky, takže susedné neinfikované bunky, na ktoré sa špecifická protilátka neviaže, zostanú uchránené.

Protivírusová liečba proti HIV je založená na dokonalej znalosti replikačného cyklu vírusu, pričom takmer každý definovaný stupeň replikácie ponúka možnosť, ako zasiahnuť so replikácie vírusu. Sú dostupné zlúčeniny, ktoré interferujú s väzbou HIV na bunkový materiál. Napríklad rekombinantná CD4 pôsobí tým spôsobom, že je s vírusom v kompetícii o bunkové receptory, na ktoré sa viaže obalová bielkovina vírusu, gp120. Až dosiaľ najúspešnejšie účinné látky proti vírusovej infekcii sú zamerané na nasledujúci stupeň, v ktorom sa tvorí DNA provírusu a spôsobujú inhibíciu reverznej transkriptázy RT. Tieto látky zahrňujú AZT a ďalšie nukleozidové analógy, napríklad dideoxycytozín ddC a dideoxyinozín ddI a tiež nenukleozidové analógy. Ďalším cieľovým stupňom môže byť syntéza, zrenie a transport vírusovej RNA z protivírusovej DNA z jadra do cytoplazmy, tohto pochodu sa zúčastňujú inhibítory funkcií tat a rev. Vírusová mRNA musí dospieť

k translácii a podľa výsledkov vykonaných pokusov je tento stupeň možné špecificky inhibovať za použitia antimediátorových oligonukleotidov. Konečne musia byť bielkoviny vírusu zostavené do novej častice vírusu, tento pochod závisí na činnosti špecifickej proteinázy vírusu. Táto proteináza už bola pripravená v kryštalickom stave a boli identifikované inhibítory tohto enzýmu a opísané v publikácii Roberts a ďalší, 1990, Science, 248, str. 358 až 362.

Podstatu vynálezu tvoria aj kombinácie rekombinantnej neutralizačnej protilátky proti HIV s jednou alebo väčším počtom zlúčenín, taktiež použiteľných na liečenie alebo na prevenciu infekcie HIV a choroby AIDS. Rekombinantnú protilátku podľa vynálezu je napríklad možné s dobrým výsledkom podávať pred vystavením infekcie a/alebo po ohrození touto infekciou v kombinácii s účinným množstvom iných látok s protivírusovým účinkom, taktiež účinným proti infekcii HIV, spolu s imunomodulačnými látkami, s protiinfekčnými látkami alebo vakcínami.

Kombinácia rekombinantnej protilátky proti HIV podľa vynálezu a ďalších látok, ktoré sú účinné proti HIV a proti chorobe AIDS, môže byť vhodná na použitie pri prevencii alebo pri liečení už vzniknutej infekcie HIV a na liečenie patologických stavov, ktoré sú dôsledkom tejto infekcie, ako je choroba AIDS. Liečenie AIDS alebo prevencia alebo liečenie infekcie HIV je definované ako liečenie širokej škály stavov, ktoré sú dôsledkom infekcie vírusom HIV. Ide napríklad o chorobu AIDS, o ARC, čo je komplex príznakov, príbuzný AIDS, v oboch prípadoch ide o liečenie ešte bezpríznakových stavov alebo stavov, pri ktorých už došlo k vzniku chorobných príznakov, liečenie je možné uskutočniť aj v prípade skutočného alebo potenciálneho ohrozenia infekciou HIV. Kombinácia zlúčenín podľa vynálezu je napríklad použiteľná pri liečení alebo prevencii infekcie HIV po alebo pred predpokladaným ohrozením touto infekciou, napríklad v prípade krvnej transfúzie, pri použití krvných derivátov, pri náhodnom bodnutí injekčnou ihlou, pri styku s telesnými tekutinami alebo pri styku s krvou chorého v priebehu chirurgického

zákroku.

Na uvedené účely je možné podávať rekombinantnú protilátku proti HIV podľa vynálezu a ďalšiu zlúčeninu, použiteľnú proti HIV alebo na liečenie choroby AIDS v kombinácii a to perorálne, parenterálne, vrátane podkožnej injekcie alebo infúzie, inhaláciou vo forme spreja, rektálne alebo do pošvy za použitia liekových foriem s obsahom jednotlivých dávok, okrem účinných látok môžu obsahovať bežné netoxické, z farmaceutického hľadiska prijateľné nosiče, pomocné látky alebo nosné prostredia.

Podstatu vynálezu teda taktiež tvorí kombinácia farmaceutických prostriedkov, určená na prevenciu a na liečenie infekcie HIV a choroby AIDS. V priebehu liečenia uvedených chorobných stavov sa chorým podáva spolu s vhodným farmaceutickým nosičom kombinácia liečebne účinného množstva rekombinantnej protilátky proti HIV podľa vynálezu a ďalších zlúčenín, účinných proti infekcii HIV alebo použiteľných pri liečení choroby AIDS.

Tieto kombinačné farmaceutické prostriedky môžu mať formu suspenzií alebo tabliet, určených na perorálne podanie, môže ísť o spreje na podanie na nosnú sliznicu, o sterilné prostriedky na injekčné podanie, napríklad injekčné suspenzie vo vode alebo v oleji alebo o čípky.

V prípade perorálneho podania vo forme suspenzie je možné uvedené farmaceutické prostriedky pripravovať známym spôsobom na výrobu farmaceutických prostriedkov, prostriedky môžu obsahovať mikrokryštalickú celulózu na zväčšenie svojho objemu, kyselinu alginovú alebo alginát sodný ako činidlo, napomáhajúce vzniku suspenzie, metylcelulózu na úpravu viskozity a sladidlá alebo látky na úpravu chuti tak, ako sú v danej oblasti techniky známe. Pokiaľ ide o tablety, ktoré majú okamžite uvoľniť účinnú látku, môžu tieto tablety obsahovať mikrokryštalickú celulózu, hydrogénfosforečnan vápenatý, škrob, stearan horečnatý, laktózu a/alebo iné pomocné látky, ďalej spojivá, zložky na zvýšenie objemu, látky, napomáhajúce rozpadu tabliet, riedidlá a klzné látky, tak ako sú v danej oblasti techniky všeobecne používané.

Pri podávaní vo forme aerosolu na nosnú sliznicu alebo na podanie inhaláciou je uvedené prostriedky možné tiež pripraviť spôsobom, známym pre výrobu farmaceutických prostriedkov tohto typu. Môže ísť o roztoky vo fyziologickom roztoku chloridu sodného, ktoré ako konzervačné látky môžu obsahovať benzylalkohol alebo iné vhodné zlúčeniny, ďalej môžu roztoky obsahovať látky, podporujúce vstrebávanie na zvýšenie biologickej dostupnosti účinných látok, fluorované uhľovodíky a/alebo iné v danej oblasti techniky známe solubilizačné alebo dispergačné činidlá.

Roztoky alebo suspenzie, určené na injekčné podanie môžu byť taktiež pripravené spôsobom, ktorý je v danej oblasti techniky známy na výrobu tohto typu farmaceutických prostriedkov za použitia vhodných netoxických, na parenterálne podanie prijateľných riedidiel alebo rozpúšťadiel, ako sú napríklad manitol, 1,3-butándiol, voda, Ringerov roztok alebo izotonický roztok chloridu sodného, Ďalej môžu prostriedky obsahovať vhodné dispergačné činidlá alebo zmáčadlá a tiež činidlá, napomáhajúce vzniku suspenzie, ako sterilné fixované oleje, vrátane syntetických mono- alebo diglyceridov a nasýtené a nenasýtené alifatické kyseliny vrátane kyseliny olejovej.

V prípade rektálneho podania alebo podania do pošvy vo forme čípkov je možné uvedené farmaceutické prostriedky pripraviť zmiešaním účinnej látky s nedráždivým nosným prostredím, ako je je kakaové maslo, syntetické glyceridy alebo polyetylénglykoly, ide o látky, ktoré sa nachádzajú pri bežných teplotách v tuhom stave, avšak ich stav sa mení na kvapalný pri teplote tela, pričom súčasne dochádza k uvoľneniu účinnej látky.

Zlúčeniny podľa vynálezu je možné v ľudskom lekárstve podávať perorálne v rozmedzí dávok 1 mg až 5 g/kg telesnej hmotnosti a to jednotlivo alebo rozdelene v niekoľkých čiastkových dávkach. Je zrejmé, že určitá dávka, systém podávania týchto dávok a frekvencia podávania u určitého chorého sa bude meniť a bude závisieť na celom rade faktorov, napríklad na účinnosti použitej zlúčeniny, na jej meta-

bolickej stálosti a dĺžke jej pôsobenia, na veku chorého, jeho telesnej hmotnosti, jeho celkovom zdravotnom stave, pohlaví, spôsobu stravovania, spôsobe a frekvencii podania účinnej látky, na rýchlosti jej vylučovania, na špecifickej kombinácii účinných látok, na závažnosti liečeného ochorenia a na všetkých ostatných podmienkach.

Nové kombinačné farmaceutické prostriedky podľa vynálezu obsahujú rekombinantnú protilátku proti HIV podľa vynálezu v kombinácii s jednou alebo väčším počtom ďalších účinných látok proti HIV, ktoré pôsobia týmto spôsobom, že prerušujú alebo spôsobujú inhibíciu replikácie HIV alebo môže byť v kombinácii obsiahnutá iná látka, určená na liečenie stavov, príbuzných alebo spojených s chorobou AIDS. Tieto účinné látky proti HIV zahrňujú napríklad tie zlúčeniny, ktoré bránia väzbe vírusu na bunkový receptor, ide napríklad o rozpustnú zlúčeninu CD4 a príbuzné peptidy, dextránsulfát alebo N-butyl DNJ, ďalej je možné použiť inhibítory konečného zostavenia vírusu, napríklad castospermín, 6-O-butanoylcastanospermín a inhibítory myristoylácie, použiť je možné aj inhibítory reverznej transkriptázy, napríklad niektoré nukleozidové analógy, ako AZT, ddC, ddI, D4T, AzdU, A-69992, IAF-BCH189, carbovir, Fascarnet, Ganciclovir a Acylclovir a niektoré nenukleozidové analógy, napríklad niektoré hydroxypyridóny, ako sú:

3-[[(4,7-dichlórbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(4,7-dimetylbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(7-chlórbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(7-metylbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(4-fluórbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(7-fluórbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(benzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(4-chlórbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(4-fluór-7-chlórbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón a

3-[2-(benzoxazol-2-yl)etyl]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

inhibítory transkripcie transaktivácie, napríklad inhibítory bielkovín tat a rev, ako 7-chlór-5-(2-pyryl)-3H-1,4-benzodiazepín-2(H)-on alebo Ro5-3335, ďalej inhibítory proteinázy retrovírusov, ako nehydrolyzovateľné chemické analógy štruktúry prechodného stavu enzýmu, substrátu alebo reakčného medziproduktu, napríklad RO39-8959 (Hoffman La Roche) a použiť je možné aj inhibíciu genetickej expresie vírusov za použitia antimediátorových oligonukleotidov. Prostriedky na liečenie AIDS a príbuzných stavov zahrňujú aj látky na liečenie priebežných infekcií, interferón, faktor na stimuláciu kolónií makrofágov, interleukín 2, faktor nekrózy nádorov a arytropoetín.

Vo výhodnom uskutočnení vynálezu sa rekombinantná protilátka proti HIV kombinuje vo farmaceutickom prostriedku s inhibítorom reverznej transkriptázy HIV a/alebo inhibítorom proteinázy HIV. Výhodným inhibítorom reverznej transkriptázy je zlúčenina z vyššie uvedenej skupiny aminopyridónov. Výhodnými inhibítormi proteinázy sú látky, napodobňujúce prechodný stav hydroxyetylamínu, napríklad RO31-8959 (Hoffman La Roche). Najvýhodnejšie sú kombinácie rekombinan-

tnej protilátky proti HIV a jedného alebo väčšieho počtu aminopyridónov ako inhibítorov reverznej transkriptázy.

Okrem toho, je možné rekombinantnú protilátku proti HIV podľa vynálezu s úspechom podávať pred infekciou a/alebo po nej v kombinácii s účinným množstvom protivírusových látok proti AIDS, imunomodulátorov, protiinfekčných prostriedkov a podobne, tak ako sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

T a b u ľ k a

Protivírusové látky

zlúčenina	výrobca	indikácia
AL-721	Ethigen (Los Angeles, CA)	ARC, PGL, HIV pozitivita, AIDS
rekombinantný ľudský interferón beta	Triton Biosciences (Almeda, CA)	AIDS, Kaposiho sarkóm, ARC
Acemannan	Carrington Labs (Irving, TX)	ARC (viď aj imunomodulátory)
Cytovene	Syntex	hroziace očné CMV
Canciclovir	Syntex (Palo Alto, CA)	periférny CMV retinitis
d4T (didehydro-deoxytimidín)	Bristol-Myers (New York, NY)	AIDS, ARC
ddI (dideoxy-inozín)	(Bristol-Myers (New York, NY)	AIDS, ARC
EL10	Elan Corp. PLC (Gainesville, GA)	infekcia HIV (viď. aj imunomodulátory)

zlúčenina	výrobca	indikácia
Fosfonomravčan trisodný	Astra Pharm. Products, Inc. (Westborought, MA)	CMV retinitis, infekcia HIV, iné CMV infekcia
Dideoxycytidín ddC	Hoffman-La Roche (Nutley, NJ)	AIDS, ARC
Novapren	Novaferon Labs, Inc. (Akron, OH) Diapren, Inc. (Roseville, MN)	inhibítor HIV
Peptid T oktapeptid	Peninsula Labs (Belmont, CA)	AIDS
Tudovudin,	AZT Burroughs Wellcome (Rsch. Triangle Park, NC)	pokročilá AIDS, ARC, pediatrická AIDS, Kaposiho sarkóm, infekcia HIV bez príznakov miernejší priebeh HIV, neurologické poruchy, kombinácie s ďalším liečením profylaxie po priamom ohrození u zdravotníkov
Ansamycin LM 427	Adria Laboratories (Dublin, OH), Erbamont (Stamford, CT)	ARC

zlúčenina	výrobca	indikácia
dextransulfát	Ueno Fine Chem. Ind. Ltd. (Osaka, Japonsko)	AIDS, ARC, HIV pozitivita bez príznakov
Virazole Ribavirin	Viratek/INC (Costa Mesa, CA)	HIV pozitivita bez príznakov, LAS, ARC
Alfa Interferon	Burroughs Wellcome (Rsch. Triangle Park, NC)	Kaposiho sarkóm, HIV v kombinácii w/retrovírus
Acylclovir	Burroughs Wellcome	AIDS, ARC, HIV pozitivita bez príznakov, kombinácia s AZT
Imunomodulátory		
Protilátka neutralizujúca pH-labilný alfa-aberantný interferón v imunoadsorpčnom stĺpci	Advanced Biotherapy Concepts (Rockville, MD)	AIDS, ARC
AS-101	Wyeth-Ayerst Labs. (Philadelphia, PA)	AIDS
Bropirimine	Upjohn (Kalamazoo, MI)	AIDS v pokročilom stave
Acemannan	Carrington Labs, Inc. (Irving, TX)	AIDS, ARC (viď. aj protivírusové látky

zlúčenina	výrobca	indikácia
CL246 738	American Cyanamid (Pearl River, NY) Lederle Labs (Wayne, NJ)	AIDS, Kaposiho sarkóm
EL10	Elan Corp. PLC (Gainesville, GA)	infekcia HIV (viď aj protivírusové látky)
Gamma Interferón	Genentech (S. San Francisco, CA)	ARC, v kombinácii s TNF (faktor nekrózy nádorov)
Faktor stimulujúci tvorbu kolónií granulocytov a makrofágov	Genetics Institute (Cambridge, MA) Sandoz (East Hanover, NJ)	AIDS
Faktor stimulujúci tvorbu kolónií granulocytov a makrofágov	Hoechst-Roussel (Somerville, NJ) Immunex (Seattle, Va)	AIDS
Faktor stimulujúci tvorbu kolónií granulocytov a makrofágov	Schering-Plough (Madison, NJ)	AIDS v kombinácii s AZT
Imunostimulačné častice jadra HIV	Rorer (Ft. Washington, PA)	seropozitívny HIV
IL-2 Interleukín-2	Cetus (Emeryville, CA)	AIDS, v kombinácii s AZT

zlúčenina	výrobca	indikácia
IL-2 Interleukín-2	Hoffman-La Roche (Nutley, NJ) Immunex	AIDS, ARC, HIV v kombinácii s AZT
Vnútrožilový imuno- globulín (ľudský)	Cutter Biological (Berkeley, CA)	AIDS v pediatrii, v kombinácii s AZT
IMREG-1	Imreg (New Orleans, LA)	AIDS, Kaposiho sarkóm, ARC, PGL
IMREG-2	Imreg (New Orleans, LA)	AIDS, Kaposiho sarkóm, ARC, PGL
Imunotiol (dietyl- ditiokarbamát	Merieux Institute (Miami, FL)	AIDS, ARC
Alfa-2 interferón	Schering Plough (Madison, NJ)	Kaposiho sarkóm, spolu s AZT, AIDS
Metionín-enkefalín	TNI Pharmaceutical (Chicago, IL)	AIDS, ARC
MTP-PE (muramyl- tripeptid)	Ciba-Geigy Corp. (Summit, NJ)	Kaposiho sarkóm
faktor stimulujúci kolónie granulocytov	Amgen (Thousand Oaks, CA)	AIDS, v kombiná- cii s AZT
rCD4 (rekombinantný rozpustný ľudský CD4)	Genentech (S. San Francisco, CA)	AIDS, ARC
rCD4-IgG-hybridy	Genentech	AIDS, ARC

zlúčenina	výrobca	indikácia
rekombinantný rozpustný ľudský CD4	Biogen (Cambridge, MA)	AIDS, ARC
Interferón alfa 2a	Hoffman-La Roche (Nutley, NJ)	Kaposiho sarkóm, AIDS, ARC, v kombinácii s AZT
SK a F106528 rozpustný T4	SmithKline a French Laboratories (Philadelphia, PA)	HIV infekcia
Tymopentín	Immunobiology Research Institute (Annandale, NJ)	HIV infekcia
faktor nekrózy nádorov, TNF	Genentech (S, San Francisco, CA)	ARC, v kombinás gama-interferónom)
Clindamycín s Primaquínom	Upjohn (Kalamazoo, MI)	PCP
Fluconazole	Pfizer (New York, NY)	kryptokoková meningitis, kandidiáza
Pastille (nystatinové pastilky)	Squibb Corp. (Princeton, NJ)	prevencia orálnej kandidiázy
Ornidyl Eflornithine	Merrell Dow (Cincinnati, OH)	PCP
Pentamidín izotionate (IM a IV)	LyphoMed (Rosemont, IL)	PCP liečenie

zlúčenina	výrobca	indikácia
Piritrexim	Burroughs Wellcome (Rsch. Triangle Park, NC)	PCP liečenie
pentamidínizotionát na inhaláciu	Fisons Corporation (Bedford, MA)	PCP profylaxia
Spiramycín	Rhone-Poulenc Pharmaceuticals (Princeton, NJ)	kryptosporidiálna hnačka
Intraconazol R51211	(Janssen Pharm. (Piscataway, NJ)	hisroplasmosa, kryptokoková meningitis
Trimetrexate	Warner-Lambert	PCP
Iné látky		
rekombinantný ľudský erytro-poetín	Ortho. Pharm. Corp. (Raritan, NJ)	ťažká anémia pri liečbe AZT
Megestrol Acetate	Bristol-Myers (New York, NY)	liečenie anorexie pri AIDS
úplná enterálna výživa	Norwich Eaton Pharmaceuticals (Norwich, NY)	hnačka a malabsorpčný syndróm

Je samozrejmé, že možnosti kombinácie rekombinantnej protilátky proti vírusu HIV podľa vynálezu s protivírusovými látkami proti HIV, s imunomodulátormi, protiinfekčnými látkami alebo vakcínami nie sú vyčerpané zlúčeninami, ktoré bo-

li uvedené v predchádzajúcej tabuľke, avšak v zásade zahrňujú akékoľvek kombinácie s farmaceuticky použiteľnými látkami, vhodnými na liečenie niektorých príznakov pri AIDS.

Praktické uskutočnenie vynálezu bude vysvetlené nasledujúcimi príkladmi, ktoré však nemajú slúžiť na obmedzenie rozsahu vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obr. 1 sú znázornené oligonukleotidové priméry na amplifikáciu reťazcov DNA, ktoré sú kódovými reťazcami pre dlhý a krátky reťazec protilátky, oligonukleotidové priméry sú určené pre rekombinantné klonovanie.

Na obr. 2A a 2B sú znázornené úplné nukleotidové reťazce pre dlhý reťazec protilátky 447-52D a úplný nukleotidový reťazec pre kratší reťazec protilátky 447-52D tak, ako sú tieto reťazce produkované za použitia rekombinantných vektorov.

Na obr. 3 sú znázornené oligonukleotidové priméry, ktoré boli použité na konštrukciu rôznych variabilných oblastí v krátkom a dlhom reťazci protilátky 447-52D.

Na obr. 4 je znázornený schematický diagram postupu, ktorým sa vykonáva rekombinantné klonovanie variabilných oblastí dlhého a krátkeho reťazca protilátky 447-52D.

Na obr. 5 je znázornený schematický diagram plazmidu pHIV/447VH/Cgama1 s obsahom oblasti gama 1 dlhého reťazca rekombinantnej protilátky.

Na obr. 6 je znázornený schematický diagram plazmidu pHIV/447Vlambda/Clambda, obsahujúceho krátky reťazec rekombinantnej látky.

Obr. 7 opisuje schematický diagram plazmidu p63.79r447 s obsahom krátkeho reťazca a ľudského dlhého reťazca gama1.

Na obr. 8 je schematicky znázornený diagram klonovania, ktoré bolo použité na získanie plazmidu p63.79r447.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Optimalizácia produkcie ľudských monoklonálnych protilátok proti HIV-1

Predmetom týchto pokusov bolo zistiť optimálne podmienky na tvorbu a pestovanie bunkových línií, produkujúcich protilátky mAb proti HIV-1.

Metódy

Lymfocyty z periférnej krvi, získanej od 74 jednotlivcov so seropozitivitou HIV boli transformované za použitia EBV. Kultúry, produkujúce protilátky proti HIV boli pomnožené a niekoľkokrát klonované na ožiarených bunkách GK5 za použitia vždy dvojnásobného zriedenia v rozmedzí 5000 až 10 buniek/vyhĺbenie). Päť z uvedených 74 vzoriek bolo možné ďalej spracovávať klonovaním aj fúziou. Súčasne s prvým klonovaním, to znamená 5 až 7 týždňov po založení kultúry bola uskutočnená fúzia lymfoblastoidných buniek z expandovaných kultúr s bunkami heteromyelómu SHM-D33. Hybridy, ktoré boli pozitívne pre HIV boli klonované za použitia 100 až 1 bunky na jedno vyhĺbenie. Špecifickosť získaných protilátok mAb bola preukázaná pomocou skúšky ELISA, Western blot a RIP.

Výsledky

Samotná imortalizácia PBL za použitia EBV dala vznik dvom bunkovým líniam, u ktorých dochádzalo k produkcii ľudských protilátok mAb. Avšak v prípade, že bola uskutočnená fúzia buniek, transformovaných EBV a buniek SHM-D33, bolo získaných päť hybridných línií, produkujúcich ľudské protilátky mAb. Všetky tieto bunkové línie boli pestované po dobu 6 až 12 mesiacov.

Získané výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke I, v ktorej sú uvedené izotypy a špecifickosť takto získaných protilátok.

T a b u ľ k a I

číslo chorého	stále EBV-línie	stále hybridy	izotyp	špecifickosť
167	žiadna	167-7-D	IgG1, lambda	gp41
181	žiadna	181-1-D	IgG2, kapa	gp41
240	žiadna	240-1-D	IgG1, kapa	gp41
238	238-2	238-2-D	IgG1, lambda	p24
241	241-1	241-1-D	IgG1, lambda	p24

EBV-transformácia krvných buniek, nasledovaná fúziou s heteromyelómovými bunkami je zrejme najúčinnejšou metódou na získanie ľudských protilátok mAb proti HIV-1 a je účinnejšia než samotná EBV-transformácia.

Príklad 2

Materiál

V prípade tejto série pokusov sa pokusu zúčastnila skupina 41 HIV-seropozitívnych osôb bez príznakov. Prítomnosť protilátok proti HIV-1 v krvnom sére bola dokázaná bežne dodanou skúškou ELISA (Genetic Systems) a potvrdená skúškou Western blot za použitia skúšobného balíčka Novapath Immunoblot Assay (BioRad). Fenotypy CD4 a CD8 lymfocytov z každého jednotlivca boli stanovené za použitia protilátok Leu 3a a Leu 2a (Becton-Dickinson) prietokovou cytometriou za použitia prístroja Cytofluorograf II (Ortho). Počet periférnych bielych krviniek bol spracovaný pomocou zariadenia Coulter Counter a diferenciálny prepočet bol vykonaný ručne.

Postup choroby u jednotlivých chorých bol sledovaný za použitia imunologického systému na stanovenie štádia ochorenia tak, že chorí boli rozdelení do štyroch skupín na základe nasledujúcich, už skôr stanovených kritérií podľa publikácie Zolla-Pazner S. a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

84:5404, 1987, tieto kritéria sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

hodnotenie	pomer CD4:CD8	CD4/mm^3	lymfocyty/mm^3
0	>1,0	>500	>1500
1	<1,0	>500	>1500
2	<1,0	<500	>1500
3	<1,0	<500	<1500

Syntetické peptidy, použité na vyšetrenie

Peptid s obsahom 23 aminokyselín zo slučky V3 oblasti gp120 kmeňa MN vírusu HIV-1 (23-mer) bol syntetizovaný metódou na tuhej fáze (Peninsula Laboratories, Inc., Belmont, CA).
Peptid má nasledujúci reťazec:
TyrAsnLysArgLysArfIleHisIleGlyProArgAlaPheTyrThrThrLysAsn IleIleGly (reťazec č. 2).

Tento peptid bol použitý pri vykonávaní skúšky ELISA na zistenie prítomnosti protilátok, ktoré s týmto peptidom reagovali.

Tvorba EBV-transformovaných bunkových línií

Spôsob prípravy ľudských bunkových línií, produkujúcich protilátky mAb proti HIV-1 bol opísaný vo vyššie uvedenej publikácii Gorny a ďalší, 1989. Monoklonálne bunky z periférnej krvi boli inkubované spolu s vírusom Epstein-Barr, EBV a boli pestované po dobu 3 až 4 týždňov na mikroplatniach s 96 vyhĺbeninami. Po vyšetrení supernatantov kultúr na prítomnosť za použitia vyššie uvedeného 23-meru a skúšky ELISA boli bunky z kultúr s pozitívnymi supernatantami na protilátky pomnožené, niekoľkokát prenesené do ďalšej kultúry a nakoniec ďalej pomnožené vo fľašiach. Tieto bunky sú potom označované ako lymfoblastoidné bunky.

Fúzia buniek

Bunkový materiál heteromyelómu (hybrid myš-človek) SHM-D33, opísaný v publikácii Teng N. H. a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80:7308, 1983 bol pestovaný na Iscovom modifikovanom Dulbeccovom živnom prostredí, ktoré bolo doplnené 15 % fetálneho teľacieho séra, 2 mM L-glutamínu, 100 jednotkami/ml penicilínu, 100 mikrogramami/ml streptomycínu za vzniku úplného prostredia. Bunky heteromyelómu boli periodicky pestované v prítomnosti antibiotika G418 v koncentrácii 200 mikrogramov/ml tak, aby bolo možné vylúčiť varianty, citlivé na neomycín.

Dva dni pred fúziou boli bunky SHM-D33 pestované pri koncentrácii 1 až 2 x 10^5 buniek/ml, išlo o logaritmickú rastovú fázu. Životnosť buniek, sledovaná vylučovaním farbiva erytrozín B, bola vyššia než 95 %.

Bunky SHM-D33 boli dvakrát premyté fyziologickým roztokom chloridu sodného s fosfátovým pufrom a potom boli zmiešané s lymfoblastoidnými bunkami, ktoré boli pomnožené z počiatočnej kultúry, avšak ešte neboli klonované. Bunkový materiál bol zmiešaný v pomere 1 : 3 a odstredené. K usadenine bol pridaný 1 ml 50% polyetylénglykolu 1300 až 1600 (Sigma Chemicals) po kvapkách v priebehu 1 minúty za stáleho miešania a zmes bola miešaná ešte ďalšiu minútu. V priebehu nasledujúcich 5 minút bol bunkový materiál pomaly zriedený Iscoveho prostredím a po ďalšom odstredení pri 200 x g, boli bunky opatrene znova uvedené do suspenzie v úplnom prostredí a nanesené na mikroplatne s 96 vyhĺbeninami pri koncentrácii 8 x 10^4 buniek na 100 mikrolitrov roztoku v jednom vyhĺbení. Nasledujúci deň boli ako živné bunky pridané peritoneálne bunky myší v množstve 1 x 10^4 na každé vyhĺbenie a kultúry boli ďalej pestované v prítomnosti 0,5 mM hypoxantínu, 0,2 μM aminoprerínu, 16 μM tymidínu (HAT) a 1 μM uabaínu (Sigma Chemicals). Postup bol opakovaný dvakrát týždenne pri použití čerstvého úplného prostredia, doplneného HAT. Po dvoch až troch týždňoch boli kultúry vo všetkých vyhĺbeninách analyzované na produkciu protilátok za použitia vyššie uvedeného

peptidu a heterohybridy, produkujúce protilátky, reagujúce s vyššie uvedeným 23-merom, boli množené na platniach s 24 vyhĺbeninami. Hybridy, ktoré produkovali najvyššie množstvo protilátok (a IgG), merané skúškou ELISA boli klonované za použitia 100, 25 a (aspoň dvakrát) jedna bunka na jedno vyhĺbenie.

Detekcia protilátok a stanovenie ich vlastností

Supernatanty kultúry boli sledované skúškou ELISA za použitia vyššie uvedeného 23-meru. Platne Immulon 2 (Dynatech) boli cez noc pri teplote 4 °C poťahované syntetickým peptidom v koncentrácii 1 mikrogram/ml, zriedeným pufrom s uhličitanom sodným s pH 9,6. Potom boli platne trikrát premyté a do každého vyhĺbenia bol pridaný supernatant kultúry, platne boli inkubované 90 minút pri teplote 37 °C a potom boli umyté. Potom bola pridaná kozia protilátka proti ľudskému IgG, špecifická proti reťazcu gama a konjugovaná s alkalickou fosfatázou (Zymed Laboratories) a zmes bola inkubovaná ďalších 90 minút pri teplote 37 °C a znova premytá rovnako ako je opísané vyššie. Substrát, p-nitrofenylfosfát (Sigma Chemicals) bol pridaný na 30 minút a potom bola odčítaná obsorbancia pri 405 nm za použitia odčítacieho zariadenia pre mikroplatne, MR 700 (Dynatech).

Špecifickosť väzby protilátky bola stanovená rádioimunologickým zrážaním RIP. Skúška RIP bola vykonaná podľa publikácie Pinter a ďalší, J. Immunol. Meth., 112:735, 1988 za použitia 300 mikrogramov lyzátu HTLV-IIIB (Organon Teknika) a/alebo lyzátu kmeňa MN (Advanced Biotechnologies, Inc.), značeným za použitia ^{125}I a Bolton-Hunterovho reakčného činidla (New England Nuclear). Supernatanty kultúr boli inkubované s rozrušeným vírusom a potom ďalej spracované podľa vyššie uvedených publikácií Gorny a ďalší a Pinter a ďalší.

Analýza ľudských protilátok

Izotypy protilátok boli stanovené pomocou skúšky ELISA.

Platne Immulon 2 boli potiahnuté za použitia 1 mikrogram/ml vyššie uvedeného 23-meru a inkubované spolu so supernatantami kultúr. Podtyp IgG protilátky mAb bol stanovený pomocou alkalickej fosfatázy značenej myšej protilátky mAb proti štyrom podskupinám ľudského IgG (Zymed Laboratories).

Krátky reťazec mAb bol analyzovaný skúškou ELISA za použitia mikroplatní, opatrených povlakom králičích protilátok proti ľudskému reťazcu kapa alebo lambda (Dakopatts). Použitými vyvíjacími protilátkami boli kozie protilátky proti ľudskému reťazcu kapa, konjugované s alkalickou fosfatázou a kozie protilátky proti ľudskému reťazcu lambda (Sigma Chemicals).

Kvantitatívne stanovenie IgG bolo taktiež uskutočnené pomocou skúšky ELISA. Platne boli opatrené povlakom kozích protilátok proti ľudskému IgG, špecifických proti reťazcu gama a inkubované so sériovo riedenými supernatantami kultúry. Viazaný IgG bol potom dokazovaný za použitia kozích protilátok proti ľudskému IgG, špecifických proti reťazcu gama a značených alkalickou fosfatázou. Ako štandard bol použitý čistený ľudský IgG, čistený afinitnou chromatografiou (Organon Teknika-Cappel). Platne boli odčítané a z výsledkov bola vytvorená štandardná krivka za použitia automatického odčítacieho zariadenia pre mikroplatne MR-700 (Dynatech Laboratories).

Mapovanie epitopov

Jemná špecifickosť mAb bola preukázaná pri použití skúšobného balíčka na mapovanie epitopov (Cambridge Research Biochemicals, Valley Stream, New York), ktorý používa metódy, vyvinuté a opísané v publikácii Geysen a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:3998 až 4002, 1984, postup spočíva v tom, že sa na plastických hrotoch syntetizujú hexapeptidy. Týmto spôsobom bolo syntetizovaných 18 postupne sa prekrývajúcich hexapeptidov v rozsahu vyššie uvedeného 23-meru a dva ďalšie riadiace peptidy. Tieto peptidy boli zbavené ochranných skupín, premyté a sušené podľa návodu výrobcu. Vzhľadom

na to, že konfigurácia hrotov zodpovedala 96 vyhĺbeninám na mikroplatni, bolo možné vykonávať skúšku ELISA zvyčajným spôsobom na štandardných mikroplatniach podľa doporučenia výrobcu. Týmto spôsobom bola zaistená reakcia všetkých hrotov s obsahom peptidov so supernatantami jednotlivých bunkových línií, ktoré boli podrobené skúškam pri riedení 1 : 10 v 0,1% Tween-20 v PBS s obsahom 1 % vajcového albumínu a 1 % sérového albumínu hovädzieho dobytka. Potom boli hroty umyté a bola vykonávaná reakcia s koziou protilátkou proti ľudskému IgG, konjugovanou s peroxidázou z chrenu. Farebná reakcia bola odčítaná na odčítacom zariadení MR-700 (Dynatech) pri 405 nm.

Výsledky

Bolo spracovaných celkom 46 vzoriek krvi, ktoré boli odobrané 41 HIV-pozitívnym jednotlivcom a u všetkých týchto vzorkách bola uskutočnená transformácia za použitia EBV. Po 3 až 4 týždňoch pestovania bolo v priemere 2,9 % vyhĺbenín pozitívnych na prítomnosť protilátky proti 23-meru slučky V3, ako bolo možné dokázať pomocou skúšky ELISA. Z nasledujúcej tabuľky II je zrejmé, že množstvo pozitívnych vyhĺbenín v % je mierne zvýšené v skupine jednotlivcov s hodnotením 1, avšak nebolo možné dokázať žiadny štatisticky významný rozdiel, pokiaľ ide o získanie pozitívnych kultúr od chorých s odlišným stupňom závažnosti celkového ochorenia.

T a b u ľ k a II

Produkcia protilátok, špecifických proti 23-meru kmeňa MN, slučky V3 oblasti gp120 u EBV-transformovaných ľudských lymfocytov

hodnotenie	počet kultúr	počet vyhíbenín	počet pozitívnych vyhíbenín v %
0	1	610	16 (2,6 %)
1	17	4363	176 (4,0 %)
2	21	7340	171 (2,3 %)
3	7	2880	81 (2,8 %)

Lymfoblastoidný bunkový materiál z pozitívnych vyhíbenín bol ďalej množený na platniach s 24 vyhíbeninami a raz týždenne boli vykonané skúšky s čerstvým supernatantom kultúry na špecifickosť protilátok skúškou ELISA pri použití vyššie uvedeného 23-meru. Dve lymfoblastoidné bunkové línie, 257-2 (ATCC č. CRL 10483) a 268-1 (ATCC CRL 10482), ktoré produkovali vysoké množstvo špecifickej protilátky proti 23-meru boli klonované za použitia vždy dvojnásobného zriedenia v rozmedzí 10 000 až 10 buniek na vyhíbenie. Bunkový materiál z vyhíbenín s najnižšou hustotou buniek, pri ktorej stále ešte dochádzalo k produkcii protilátok bol ďalej trikrát klonovaný za použitia 100 až 10 buniek/vyhíbenie.

Súčasne s počiatočným klonovaním bola uskutočnená fúzia oboch typov lymfoblastoidných bunkových línií, 257-2 a 268-11 s heteromyelómom SHM D-33. Vo všetkých vyhíbeniach došlo k rastu hybridných buniek. Po 3 týždňoch po uskutočnení fúzie bolo preukázané, že 50 až 183 vyhíbenín, t.j. 29 % vyhíbenín s heterohybridmi 257-2 a 43 zo 48 vyhíbenín, t.j. 90 % vyhíbenín s heterohybridnými bunkami 268-11 obsahovalo protilátky proti 23-meru. Z každej uskutočnenej fúzie bolo množených 18 klonov, u ktorých bolo možné dokázať bežnou skúškou ELISA najvyššiu koncentráciu protilátok, bunkový materiál bol množený na platniach s 24 vyhíbeninami. Produkcia protilátok bola sledovaná každý týždeň a supernatant z buniek, produkujúcich najvyššie množstvo špecifickej protilátky a najvyššie množstvo IgG bol vybraný na klonovanie. Heterohybridómy boli klonované za použitia 100 až 25 buniek/vyhíbenie a potom ešte dvakrát za použitia jednej

bunky na jedno vyhĺbenie.

Lymfoblastoidné bunkové línie 257-2 (ATCC č. CRL 10483) a 268-11 (ATCC č. CRL 10482) produkovali 6,4 a 3,8 mikrogramov IgG/ml/10^6 buniek/24 hodín. Príbuzné heterohybridómy, 257-2D (ATCC č. HB 10480) a 268-11D (ATCC č. 10481) produkovali 20,5 a 11,3 mikrogramov IgG/ml/10^6 buniek/24 hodín. Bolo dokázané, že pri reakcii ELISA reagujú protilátky mAb s 23-merom v prípade, že tento peptid je viazaný na vyhĺbeniny mikrotitračných platní aj pri takých nízkych koncentráciach, ako je 1 ng/ml, ako je zrejmé z obr. 1.

Špecifickosť týchto protilátok mAb bola ďalej dokazovaná pomocou RIP, výsledky sú znázornené na obr. 2. Obe protilátky typu mAb reagovali s obalovou bielkovinou gp120 HIV, kmeňa MN, avšak nie s gp120 kmeňa HTLV-IIIB, čo dokazuje špecifickosť týchto protilátok.

Bolo dokázané, že uvedené protilátky mAb sú izotypu IgG s krátkym reťazcom lambda. V nasledujúcej tabuľke III sú uvedené niektoré vlastnosti dvoch EBV-transformovaných rodičovských línií a dvoch príbuzných heterohybridómov.

Heterohybridómy produkujú trikrát vyššie množstvo IgG v priebehu 24 hodín než EBV-transformované bunkové línie, napriek tomu, že EBV-transformované línie produkujú podstatne vyššie množstvo než väčšina EBV-transformovaných bunkových línií, ktoré boli až dosiaľ v literatúre opísané (Kozbor D. a ďalší, Immunol. Today, 4:72, 1983, Casali P. a ďalší, Science, 234:476, 1986 a Steinitz M. a ďalší, Nature 269:420, 1977).

T a b u ľ k a III

Vlastnosti bunkových línií, produkujúcich ľudské monoklonálne protilátky, špecifické pre 23-mer slučky V3 oblasti gp120 kmeňa MN

bunková línia	imortalizácia	izotyp	koncentrácia IgG[x]
257-2	EBV	IgG1	6,4
268-11	EBV	IgG1	3,8
257-2D	EBV + fúzia	IgG1	20,5
268-11D	EBV + fúzia	IgG1	11,3

[x] mikrogramy/10^6 buniek/ml/24 hodín.

Aby bolo možné definovať jemnú špecifickosť každej protilátky, bolo uskutočnené mapovanie epitopov za použitia prekrývajúcich sa hexapeptidov, ktoré sa prekrývali piatimi aminokyselinami. Každý peptid bol syntetizovaný v štvornásobnom uskutočnení, takže bolo možné vykonať skúšky so štyrmi vzorkami súčasne na jednej mikroplatni. Prekrývajúce sa antigénne oblasti a výsledky pokusov sú zhrnuté v tabuľke IV.

Zmes sér od seronegatívnych jedincov je za týchto podmienok nereaktívna. Vzorka séra od seropozitívneho jedinca (pozitívneho na HIV v riedení 1:1000) reaguje s úrovňou nad úrovňou pozadia so všetkými hrotmi, najvyššia reakcia bola preukázaná pre tri hroty v rozsahu oblasti P G R A F Y T T, ide o reťazec č. 3 na vrchole a na pravej strane slučky V3.

Protilátka mAb 257-2D v riedení 1:10 t.j. v koncentrácii 3,7 mikrogramov/ml sa silno viazala na dva susedné hexapeptidy, predstavujúce zvyšky aminokyselín v rozmedzí 309 až 315 vľavo od vrcholu slučky, R-K-R-I-H-I-G, ide o reťazec č. 4. Protilátka mAb 268-11D sa v koncentrácii 5,4 mikrogramov/ml viazala na hexapeptid, predstavovaný reťazcom aminokyselín H-I-G-P-G-R, ide o reťazec č. 5. V nasledujúcej tabuľke IV sú uvedené prekrývajúce sa antigénne oblasti, ktoré sú rozpoznávané oboma vyššie uvedenými protilátkami typu mAb.

Uvedené výsledky dokazujú, že najmenším reaktívnym peptidom, to znamená jadrom epitopu , ktorý je rozpoznávaný protilátkou 257-2D je K R I H I, reťazec č. 23, ktorý je

uložený na ľavej strane konzervovaného hrotu slučky V3. Ohraničujúce N- a C-terminálne zvyšky arginínu a glycínu môžu taktiež prispievať k uskutočneniu väzby. Protilátka mAb 368-11D sa viaže na jediný hexapeptid s reťazcom H I G P G R, ide o reťazec č. 5, ktorý sa nachádza na hrote slučky, a na dve priľahlé N-terminálne aminokyseliny.

T a b u ľ k a IV

Reaktivita ľudského krvného séra a ľudských monoklonálnych protilátok s hexapeptidmi slučky V3 oblasti gp120 kmeňa MN.

			Reaktivita ELISA (jednotky absorbancie)			
hrot č.	reťazec č.	Hexapeptid	HIV+ sérum	HIV- sérum	257-2D	268-11D
3	6	YNKRKR	0,338	0,195	0,256	0,243
4	7	NKRKRI	0,339	0,200	0,288	0,283
5	8	KRKRIH	0,258	0,184	0,259	0,239
6	9	RKRIHI	0,308	0,1831	0,781	0,252
7	10	KRIHIG	0,286	0,1701	0,592	0,179
8	11	RIHIGP	0,302	0,177	0,276	0,135
9	12	IHIGPG	0,267	0,197	0,130	0,132
10	13	HIGPGR	0,269	0,185	0,1561	0,011
11	14	IGPGRA	0,361	0,191	0,163	0,164
12	15	GPGRAF	0,243	0,103	0,208	0,132
13	16	PGRAFY	0,586	0,237	0,456	0,346
14	17	FRAFYT	0,582	0,239	0,272	0,288
15	18	RAFYTT	0,658	0,239	0,333	0,350
16	19	AFYTTK	0,257	0,197	0,233	0,222
17	20	FYTTKN	0,384	0,233	0,273	0,274
18	21	YTTKNI	0,362	0,171	0,259	0,259
19	11	TTKNII	0,284	0,191	0,219	0,212
20	23	TKNIIG	0,305	0,198	0,164	0,141

Príklad 3

Produkcia ľudského heterohybridómu bez ďalšej expanzie EBV-transformovaných lymfocytov

Metóda

Fúzia EBV-transformovaných buniek a buniek heteromyelómov SHM-D33 sa zvyčajne vykonáva po 2 až 3 týždňoch expanzie EBV-imortabilizovaných buniek na mikroplatniach s 24 vyhĺbeninami. Ide teda o čas 5 až 7 týždňov po založení kultúry. Obdobie expanzie je však veľmi kritické na produkciu protilátky mAb vzhľadom na to, že väčšina, aspoň 90 % vyhĺbenín sa v priebehu tejto doby stáva negatívna, pokiaľ ide o produkciu uvedenej protilátky. Z tohto dôvodu bol skúšaný alternatívny postup, pri ktorom bola doba expanzie vynechaná a fúzia bola uskutočnená 3 až 4 týždne po založení kultúry. To znamená, že vyhĺbeniny platní s 96 vyhĺbeninami s obsahom EBV-transformovaných buniek boli sledované na prítomnosť protilátky proti HIV-1 3 až 4 týždne po založení kultúry. Bunkový materiál zo všetkých vyhĺbenín, v ktorých sa tvorila protilátka proti HIV bol spojený a okamžite bola vykonaná fúzia s heteromyelómom SHM-D33 spôsobom podľa príkladu 2.

Výsledky

PBL od štyroch jednotlivcov, s pozitívnym sérom proti HIV produkovali osem bunkových línií vylučujúcich protilátku proti HIV-1 typu mAb po EBV-transformácii a včasne fúzii. Šesť protilátok mAb bolo špecifických proti oblasti p24 a dve protilátky proti oblasti gp41 HIV-1, ako bolo preukázané skúškami RIP a ELISA. Celkom 21 stálych línií od 300 chorých boli získaných EBV-transformáciou a prípadne fúziou podľa príkladov 1 a 2. Toto množstvo je ekvivalentné 6 až 7 bunkovým líniam, odobraným zo vzoriek od 100 chorých v prípade, že sa od jedného chorého použije 20 až 40 ml krvi. Pri použití "Včasne fúzie", opísanej v tomto príklade

bolo zo vzoriek od 4 chorých získaných 8 línií, čo je významné zvýšenie účinnosti pri získavaní stálych bunkových línií, ktoré produkujú protilátky.

Diskusia

Včasná fúzia EBV-transformovaných buniek bez expanzie materiálu z pozitívnych vyhíbenín je účinnejším postupom než predchádzajúce postupy na produkciu ľudských protilátok typu mAb proti HIV-1.

Príklad 4

Stanovenie afinity monoklonálnej protilátky

Stanovenie disociačných konštánt K_d ľudských protilátok mAb, bolo vykonávané za použitia skúšky ELISA spôsobom podľa publikácie B. Friguet a ďalší, J. Immunol. Methods, 77:305 až 319, 1985. Skúšky boli vykonávané tak, že supernatanty kultúr 257-2D a 268-11D boli podrobené skúškam v koncentrácii 0,5 a 0,6 mikrogramov/ml. Vyššie opísaný 20.mer s molekulovou hmotnosťou 2702 bol rozpustený v destilovanej vode na koncentráciu 1 mg/ml, 3,7 x 10^{-4}M, roztok bol zriedený fyziologickým roztokom chloridu sodného s fosfátovým pufrom s pH 7,2 a použitý v koncentráciach v rozmedzí 10^{-5} až 10^{-8}M. Supernatant a peptid boli zmiešané v rovnakých objemoch a po 16 hodinách bola výsledná zmes pridávaná na platne, ktoré boli opatrené povlakom 23-meru v koncentrácii 1 mikrogram na ml a množstvo nenaviazanej protilátky mAb bolo merané pomocou skúšky ELISA. Takto získané údaje boli vynesené do grafu podľa Friguetovej modifikácie Klotzovho postupu tak, ako bola opísaná vo vyššie uvedenej publikácii Frigueta a ďalších, čím bolo možné stanoviť K_d.

Bolo dokázané, že hodnoty K_d pre protilátky mAb 257-2D a 268-11D sú 2,3 x 10^{-7} a 5,9 x 10^{-7} M. Tieto hodnoty sú v rozmedzí, ktoré uvádzajú iní autori pre IgG mAb, napríklad vo vyššie uvedenej publikácii Friguet a ďalší a publikácii

Larsson A. a ďalší, Molec, Immunol., 24:569 až 576; 1987. Hodnoty K_d pre mAb, produkované ľudskou lymfoblastoidnou bunkovou líniou 257-3 a 268-11 boli podobné hodnotám pre mAb, produkované príbuznými heterohybridómami 257-2D a 268-11D. Hodnoty K_d, ktoré boli vyššie opísané sa týkajú väzby mAb na 20-mer. Hodnoty K_d týchto mAb pre natívne molekuly oblasti gp120 môžu byť nižšie vzhľadom k príspevku celej molekuly bielkoviny k epitopom, s ktorými protilátky typu mAb reagujú.

Príklad 5

Neutralizácia infektivity HIV

Skúška za použitia plakov, ktorú je možné merať inhibíciou infekcie HIV u buniek MT-2 bola použitá na zistenie neutralizačnej účinnosti mAb podľa vynálezu v prítomnosti alebo v neprítomnosti ľudského komplementu podľa publikácií C. V. Hanson a ďalší, J. Clin. Micro., 128, 1990 a Harada a ďalší, 1985, Science, 229, str. 563 až 566. Protilátky mAb boli sériovo riedené v 50% prostredí na vykonanie skúšky podľa vyššie uvedenej publikácie Hansona a ďalších a v 50% zmesi normálnej ľudskej plazmy. Zmes ľudskej plazmy bola použitá ako zdroj ľudského komplementu pre skúšky, vykonávané v prítomnosti komplementu, protilátka mAb a vírus boli inkubované 18 hodín pri teplote 37 °C. Pre skúšky v neprítomnosti komplementu boli zmesi plazmy inaktivované teplom a protilátky mAb a vírus boli za týchto podmienok inkubované 1 hodinu pri teplote 37 °C. Riedenie, pri ktorom bolo 50 % pôvodného vírusu neutralizovaných na báze počtu plakov, bolo vypočítané interpoláciou za použitia analýzy regresie tretieho rádu a na báze priemerného počtu plakov pri jednotlivých riedeniach.

Výsledky

V prípade, že boli supernatanty 257-2D a 268-11D inku-

bované s kmeňom MN HIV po dobu 1 hodiny bez komplementu pred pridaním buniek MT-2, bola dosiahnutá 50% neutralizácia pri riedení 1:4700 a 1:2000, čo zodpovedá koncentráciam mAb 3,0 a 23,0 ng/ml, ako je uvedené v tabuľke 5. Nebolo možné pozorovať žiadnu neutralizáciu HTLV-IIIB.

V prípade, že boli vykonávané skúšky na protilátky mAb z 257-2D a 268-11D za použitia citlivejšej skúšky, pri ktorej boli protilátky inkubované s vírusom 18 hodín v prítomnosti ľudského komplementu, bola dosiahnutá neutralizácia pri riedeniach 1:44 000 a 1:41 000, čo zodpovedá koncentráciam mAb 0,3 a 1,1 ng/ml. Ani za týchto podmienok nedošlo k žiadnej neutralizácii HTLV-IIIB.

Ľudské protilátky mAb 50 - 69, špecifické pre HIV transmembránovou bielkovinou gp41 a mAb 71 - 30 proti bielkovine jadra p24 tak, ako boli opísané v Gorny M. K. a ďalší. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:1624 až 1628, boli skúšané súčasne, pričom nebolo možné dokázať žiadnu neutralizačnú účinnosť ani pre jeden z kmeňov HIV.

T a b u ľ k a V

Neutralizačná účinnosť ľudských monoklonálnych protilátok proti HIV

		titer neutralizačných protilátok ng/ml			
		1 h bez C'		18 h + C'	
mAb	špecifickosť	MN	IIIB	MN	IIIB
257-2D	gp120	1:4700 (3)	neg	1:44000 (0,3)	neg
268-11D	gp120	1:2000 (23)	neg	1:41000 (1,1)	neg
50-69	gp41	1:3	neg	1:3	neg
71-31	p24	neg	neg	neg	neg

Príklad 6

Ľudské protilátky mAb proti slučke V3 HIV-1 reagujú s rôznymi kmeňmi vírusov

Za použitia vyššie uvedených postupov boli vytvorené ďalšie EBV-transformované bunkové línie a heterohybridómy, produkujúce ľudské protilátky mAb, špecifické pre slučku V3 kmeňa MN vírusu HIV, oblasť gp120. Niektoré z týchto hetero-myelómov boli označené 386-D, 391-D, 419-D, 447-52D, 477-D, 311-11D, 391-95D a 412-D. Reaktivity niektorých z týchto protilátok mAb boli porovnané s reaktivitou vyššie opísaných protilátok z 257-2D a 268-11D, získané výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke 6.

T a b u ľ k a VI

Špecifickosť a neutralizačná účinnosť šiestich ľudských monoklonálnych protilátok proti gp120 HIV

mAb	epitop jadra	Reaktivita ELISA k syntetickej V3 IIIB	MN	SF-2	RF	neutralizácia IIIB	MN	SF-2	RF
257-2D	KRIHI (reťazec č.24)	-	+	+	+	-	+	+	-
268-11D	HIGPGR (reťazec č. 5)	-	+	+	+	-	+	+	-
386-D	HIGPGR (reťazec č. 5)	-	+	+	+	-	+		
391-95D	*	-	+	+	-	-	+		
419-D	*	-	+	+	-	-	+		
447-52D	GPGR (reťazec č.25)	+	+	+	+		+		
311-11D	RKRIHIGPGRAFYTT (reťazec č. 26)	-	+	+	-	-	+		
412-D	(konformačný)	+	+	+	-	-	-		

* Nebolo stanované

Uvedené výsledky vedú k nasledujúcim záverom.

1) Hrot slučky V3 je tvorený zhlukom epitopov, ktoré sú roz-

poznané ľudskými protilátkami mAb. 2) Ľudské protilátky mAb skrížene reagujú pri skúške ELISA s niektorými alebo so všetkými syntetickými peptidmi V3 z odlišných kmeňov HIV-1. 3) Všetky skúmané ľudské protilátky mAb proti V3 (MN) neutralizujú vírus MN vrátane jednej mAb (257-IID), primárne špecifickej proti oblasti, uloženej N-terminálne vzhľadom k najkonzervovanejšej oblasti slučky. 4) Ku skríženej neutralizácii môže dôjsť aj v prípade zámeny dvoch z piatich aminokyselín v epitope jadra (napríklad 257-IID reaguje s MN a SF-2), avšak niektoré zmeny v epitope jadra vylučujú neutralizačnú účinnosť (napríklad 268-11D reaguje s MN a nie s IIIB) a 5) skrížená reaktivita, preukázaná skúškou ELISA je menej vymedzená než skrížená reaktivita, meraná v priebehu biologického pokusu.

Aby bolo možné bližšie identifikovať epitop, s ktorým reaguje ľudská protilátka HuMoAb 447-52D, boli s touto protilátkou vykonané skúšky na reaktivitu so skupinou 18 hexapeptidov z oblasti slučky V3 kmeňa MN, predstavované 23-merom, ktorý bol pôvodne použitý na analýzu. Každý hexapeptid sa prekrýva so susedným hexapeptidom piatimi aminokyselinami. Hexapeptidy, ktoré boli syntetizované in situ na polyetylénových hrotoch za použitia vyššie uvedeného postupu Geysena a ďalších, (14), boli uvedené do reakcie so supernatantami kultúr s obsahom 29 mikrogramov/ml HuMoAb. Na obr. 1 je znázornené, že táto protilátka reaguje s troma hexapeptidmi s to HIGPGR, reťazec č. 13, IGPGRA, reťazec č. 14 a GPGRAF, reťazec č. 15. Podľa týchto údajov je pravdepodobné, že epitop, proti ktorému je HuMoAb 447-52D zameraná, je hiGPGRaf, kde veľké písmená znamenajú jadro epitopu a malé písmená znamenajú priľahlé aminokyseliny, ktoré taktiež môžu prispievať k väzbe epitopu.

Aby bolo možné stanoviť, ktorá z aminokyselín z uvedenej oblasti je kritická pre väzbu HuMoAb, bola na polyetylénových hrotoch syntetizovaná skupina hexapeptidov tak, že každý zo zvyškov v hexapeptide HIGPGR bol nahradený každou z 19 aminokyselín. Bolo teda syntetizovaných 115 hexapeptidov a každý z nich bol uvedený do reakcie s HuMpAb 447-52D

v koncentrácii mg/ml. Výsledky tohto pokusu sú znázornené na obr. 7 a je pravdepodobné, že prvý, druhý a piaty zvyšok reťazca HIGPGR, môže byť podstatnejšie menený pri zachovaní preukázateľnej reaktivity. Substitúcie, ktoré nie je možné vykonať, to znamená C, D a použitie E namiesto I v polohe 2 nie je možné nikdy alebo je možné len vzácne pozorovať v izolátoch vírusu, ktorých reťazec bol až dosiaľ analyzovaný, ako bolo opísané napríklad v Meyers a ďalší, 1990, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos a LaRosa a ďalší, 1990, Science, 249, str. 932. Avšak tretí, štvrtý a šiesty zvyšok tohto hexapeptidu nie je možné pozmeniť bez straty schopnosti peptidu reagovať s HuMoAb. Tieto údaje napovedajú, že jadro epitopu HuMoAb 447-52D je najpravdepodobnejšie GPXR a reťazce aminokyselín, susediace s týmto epitopom pravdepodobne v podstate neprispievajú k rozpoznávaniu tohto epitopu protilátkou.

Príklad 7

Vzťah medzi skríženou reaktivitou a afinitou ľudských protilátok mAb k syntetickým peptidom slučky V3 z rôznych kmeňov HIV

Reaktivita ľudských protilátok mAb tak ako boli vyššie opísané, bola priamo meraná skúškou ELISA proti rôznym syntetickým peptidom (19-mery až 23-mery), ktoré boli nanesené formou povlaku na platne v koncentráciach 1 mikrogram/ml. Afinita protilátky meraná ako disociačná konštanta Kd pre väzbu na tieto peptidy bola stanovená tak, ako bolo uvedené vyššie v príklade 4.

Získané výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke 7. Ľudské protilátky typu mAb proti slučke V3 v množstve 2 až 4 mikrogramy/ml reagovali skrížene so syntetickými peptidmi v oblasti V3 kmeňa MN, SF-2 a RF HIV-1 v priebehu skúšky ELISA. Žiadnu reakciu nebolo možné preukázať pre peptid V3, odvodený od kmeňa IIIB HIV-1. Konštanty Kd pre väzbu na tieto peptidy sa pohybovali v rozmedzí $\geq 10^{-6}$ M (väzba 268-11D

na RF) až 10^{-7} (väzba 268-11D na MN).

T a b u ľ k a VII

mAb	epitop jadra	Relatívna afinita väzby	reaktivita pri ELISE pre V3 z MN	SF-2	RF	IIIB
257-2D	KRIHI reťazec č.24	MN=SF2 >> RF, IIIB=O	1,8[x]	1,6	1,6	0,3
268-11D	HIGPGR reťazec č.5	MN>SF2 > RF, IIIB-O	1,9	1,9	1,3	0,2
386-D	HIGPGR reťazec č. 5	MN > SF_2 >> RF, IIIB=O				

[x] Jednotky absorbancie pri 410 nm.

Uvedené výsledky vedú k nasledujúcim záverom. 1) Ľudské protilátky mAb špecifické pre oblasť V3 HIV-1 majú skríženú reaktivitu k oblastiam V3 z iných kmeňov vírusu, ako je možné dokázať skúškou ELISA alebo skúškou na afinitu protilátok. 2) Afinita ľudských protilátok mAb k rôznym peptidom V3 sa môže meniť o jeden rád a viac, 3) rozdiely v afinite nie je možné jednoducho vysvetliť na základe reťazca aminokyselín v príslušnom epitope a 4) ľudské protilátky mAb so špecifickosťou k tomu istému epitopu sa líšia svojou afinitou k rôznym peptidom V3.

Príklad 8

Bola produkovaná ďalšia skupina ľudských protilátok typu mAb a skúšaná vyššie uvedenými postupmi. Produkované protilátky a ich vlastnosti, pokiaľ ide o špecifickosť a afinitu, sú opísané v nasledujúcej tabuľke VIII.

Korelácia medzi disociačnými konštantami a neutralizač-

nou schopnosťou piatich ľudských protilátok mAb bola analyzovaná. Výsledky preukazujú priamy vzťah medzi oboma uvedenými vlastnosťami, takže podľa afinity väzby k 23-meru zo slučky V3 bude pravdepodobne možné dobre predpovedať účinnosť pri neutralizácii vírusu.

T a b u ľ k a VIII

Vlastnosti ľudských monoklonálnych protilátok, špecifických pre epitopy gp120 HIV-1

			Reaktivita ELISA					
Ľudský mAb	Izotyp	epitop	MN	SF-2	RF	NY5	IIIB	ELI
257-2D	IgG1, lambda	KRIHI	+	+	+	+	-	+
268-11D	IgG1, lambda	HIGPGR	+	+	+	+	-	-
386-D	IgG, lambda	HIGPGR	+	+	+	+	-	-
447-52D	IgG3, lambda	GPGR	+	+	+	+	+	-
447-D	IgG1, lambda	HIGP	+	+	-	-	-	-
311-11D	IgG1, lambda	xx	+	+	-	+	-	-
391-95D	IgG1, kapa	xx	+	+	-	+	-	-
419-D	IgG1, lambda	xx	+	+	-	+	-	-
412-D	IgG1, lambda	xx	+	-	-	+	-	-

T a b u ľ k a VIII - pokračovanie

Ľudský mAb	afinita (Kd v mM) MN	SF-2	RF	IIIB	50% titer IgG ng/ml
257-2D	0,23	0,22	1,7	NT	1,0
268-11D	0,59	2,3	5,3	NT	1,0
386-D	0,18	0,85	1,7	NT	1,2
447-52D	0,56	0,32	96	43	NT
447-D	NT	NT	NT	NT	NT
311-11D	7,4	6,0	NT	NT	392,0
391-95D	0,9	14,4	NT	NT	4,9
419-D	3,8	0,23	NT	NT	12,0
412-D	27	NT	NT	NT	Neg

T a b u ľ k a VIII - pokračovanie

NT: nebolo vykonané

x skúška bola vykonaná s mAb v množstve 10 mg/ml s výnimkou 477-D, ktorá bola použitá v množstve nižšom než 5 mg/ml.

xx nebolo stanovené skúšobným balíčkom pre mapovanie epitopov, avšak bolo dokázané, že protilátka reaguje s peptidom RKRIHIGPGRAFYTT.

50% titer IgG sa vzťahuje na neutralizačný titer, uvádza sa koncentrácia v ng/ml, pri ktorej poskytuje protilátka 50% neutralizáciu po 18 hodinách bez komplementu s výnimkou 257-2D a 268-11D, ktoré boli testované 1 hodinu bez komplementu.

Relatívna afinita ľudských mAb (od nižšej k vyššej)

antigén HIV 1,0 1,0 (K_d vmM)

MN 412 < 311 < 419 < 391 < 268=447 < 257 < 386

SF-2 311 < 391 < 268 < 447 ≈ 419 ≈ 257

Príklad 9

Príprava rekombinantnej protilátky 447-52D

Bola pripravená protilátka, v ktorej variabilná oblasť krátkeho reťazca obsahuje signálny reťazec a reťazec intrónu krátkeho reťazca heterohybridómu 447-52D a to jeho variabilnú oblasť vo fúzii s fragmentom DNA, obsahujúcim krátky reťazec intrónu konštantnú oblasť lambda 2 človeka a kódovú oblasť pre konštantné lambda 2. Variabilná oblasť dlhého reťazca je podobným spôsobom odvodená od V-oblasti dlhého reťazca heterohybridómu 447-52D, ku ktorej je pripojený rovnaký reťazec intrónu dlhého reťazca vo fúzii s fragmentom, obsahujúcim krátky úsek intrónu ľudskej konštantnej oblasti gama 1 a kódovú oblasť gama 1 človeka vo forme genómu.

Z buniek heterohybridómu 447-52D bola extrahovaná celková RNA za použitia štandardných metód, zahrňujúcich solubilizáciu buniek guanidíniumizotiokyanátom podľa Chirgwin a ďalší, Biochem., 18:5294 až 5299, 1979. Skupiny oligodeoxynukleotidových primérov (obr. 1), predstavujú reťazce v rámci signálneho peptidu variabilnej oblasti a konštantnej oblasti krátkeho reťazca lambda alebo v rámci variabilnej oblasti dlhého reťazca lambda 1 a stálej oblasti gama 3 dlhého reťazca boli syntetizované štandardným postupom za použitia fosforamiditu a za použitia syntetizačného zariadenia pre DNA, Applied Biosystem 381A. Oddelenie oligodeoxynukleotidov od živice bolo uskutočnené pôsobením koncentrovaného amoniaku s následným odstránením solí na stĺpci NAP-5 (Pharmacia) pri elúcii vodou (oligonukleotidy mali kratší reťazec než 45 báz) alebo na stĺpci OPC (Applied Biosystems Inc.), v tomto prípade bol na elúciu použitý 20% acetonitril (v prípade, že oligonukleotidy mali dĺžku väčšiu než 45 báz) podľa doporučenia výrobcov. Celková RNA v množstve 2 mikrogramy bola podrobená reverznej transkripcii po dobu 30 minút pri teplote 42 °C za použitia enzýmu AMV reverznej transkriptázy, použitých bolo 200 jednotiek enzýmu (BRL) a 10 pmolov priméru komplementárneho reťazca konštant-

nej oblasti dlhého alebo krátkeho reťazca v konečnom objeme 20 mikrolitrov pufru, obsahujúceho 50 mM TRIS HCl s pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT a 20 jednotiek RNAsin (Pharmacia). Reverzná transkriptáza bola inaktivovaná pôsobením tepla 5 minút pri teplote 95 °C a reakčné zmesi boli doplnené na 100 mikrolitrov PCR-pufrom (10 mM TRIS HCl s pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,01 % želatíny a 200 mikromolmi každého z dNTP), 50 pmolov každého z parovaných primérov a 2,5 jednotiek Taq-polymerázy (Perkin Elmer/Cetus). Potom bola vykonaná PCR-amplifikácia v podstate spôsobom, opísanom v Saiki a ďalší, Science 230:1350 až 1354, 1985 a v ďalších obdobných publikáciach, ako Mullis a ďalší, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263 až 273, 1986, Dawasaki a Wang, PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich, Ed., Stockton Press, NY, str. 89 až 97, 1989, Tung a ďalší, tiež tam, str. 99 až 104, 1989. Bolo uskutočnených celkom 45 cyklov amplifikácie za použitia zariadenia DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus Instruments), jeden cyklus bol 1 minúta pri 94 °C, dve minúty pri 55 °C a 2 minúty pri 72 °C, potom bolo vykonané čistenie predpokladaných fragmentov DNA, obsahujúcich 1400 a 700 párov báz (bp) na géli. Pred subklonovaním týchto reťazcov DNA v príslušných plazmidoch boli reťazce týchto DNA rozštiepené pôsobením reštrikčného enzýmu EcoRI v prípade dlhého reťazca alebo EcoRI a SalI v prípade krátkeho reťazca a získané fragmenty boli čistené elektroforézou na agarozovom géli. Reťazec cDNA pre dlhý reťazec bol klonovaný v deriváte plazmidu pUC18, do ktorého boli zaradené miesta pôsobenia enzýmov NcoI a NotI medzi už existujúce miesta pôsobenia enzýmov KpnI a BamHI, krátky reťazec bol klonovaný v plazmide pUC18. Mnohopočetné klony pre tieto reťazce, amplifikované pomocou PCR boli izolované z DH5-transformovaných buniek E. coli, pestovaných na LB agarových platniach s obsahom 50 mikrogramov/ml ampicilínu spôsobom podľa Maniatis a ďalší, Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982. DNA plazmidu bola z baktérií extrahovaná za použitia

postupu podľa publikácie Birnboin a Doly, Nucleic Acid Res., 7:1515, 1979 a DNA plazmidu s dvojitým reťazcom potom bola podrobená analýze reťazca za použitia enzýmu Sequenase^{R} (United States Biochemicals) a za použitia špecifických primérov na analýzu reťazca T7 a SP6 (Boehringer Mannheim) podľa návodu výrobcu. Týmto spôsobom bol získaný reťazec, ktorý zodpovedal ľudskému dlhému reťazcu gama 3 a reťazec, zodpovedajúci ľudskému krátkemu reťazcu lambda.

Ako je zrejmé z obr. 3, bolo syntetizovaných osem oligodeoxynukleotidov, predstavujúcich priméry, ktoré bolo nutné získať, aby bolo možné PCR-amplifikáciou pripraviť päť fragmentov DNA. Do všetkých oligodeoxynukleotidov s výnimkou terminálnych, boli uložené reťazce, zodpovedajúce V-oblasti dlhého reťazca alebo V-oblasti krátkeho reťazca heterohybridómu 447-52D alebo reťazce, komplementárne k signálnemu reťazcu a k fragmentu intrónu, určené na kombináciu s V-oblasťami heterohybridómu 447-52D a aspoň 15 bázami 5'-terminálnej komplementarity, ako je znázornené na obr. 3 a 4. Príslušný pár primérov, vždy v množstve 50 pmolov bol uvedený do reakcie s 10 ng DNA plazmidu, predstavujúci cDNA pre dlhý reťazec 447-52D alebo cDNA pre krátky reťazec 447-52D, 2,5 jednotiek Taq-polymerázy, zložky a pufre, ktoré sú potrebné na uskutočnenie PCR-reakcie a potom bolo uskutočnených 25 cyklov PCR amplifikácie, pričom jeden cyklus spočíval v zohriati na 1 minútu na 94 °C, na 1 minútu na 55 °C a na 2 minúty na 72 °C. Produkty týchto piatich reakcií boli čistené elektroforézou na agarozovom géli a potom boli príslušným spôsobom uvádzané do reakcie (10 ng každého fragmentu DNA) s párom primérov, terminálnymi oligodeoxynukleotidmi, ako je znázornené na obr. 3 a 4, s Taq-polymerázou DNA, reakčnými zložkami a puframi na uskutočnenie PCR-reakcie a takto znova naviazané fragmenty boli amplifikované pomocou PCR vyššie uvedeným spôsobom, vykonaných bolo 25 cyklov. Potom bola pôsobením reštrikčných endonukleáz odštiepená oblasť signálneho reťazca a reťazca intrónu v susedstve V-oblasti dlhého reťazca, použité boli enzýmy HindIII a XhoI a amplifikovaná DNA bola čistená elektroforé-

zou na agarozovom géli a klonovaná v kompatibilných miestach vektora p9103, obsahujúceho ľudskú konštantnú oblasť gama 1 a získaného nasledujúcim spôsobom, ktorý je tiež znázornený na obr. 5. DNA bola čistená z klonu kozmidu cosIg9 podľa publikácie Flanagan a Rabbits, Nature, 300:709 až 713, 1982 a použitá ako matrica pre PCR-amplifikáciu konštantnej oblasti ľudského gama 1. Príslušný pár primérov (G1 a G2, na obr. 1), 50 pmolov každého priméru, bol uvedený do reakcie s 10 ng DNA kozmidu s obsahom exónu ľudskej konštantnej oblasti gama 1, 2,5 jednotkami Taq-polymerázy DNA a potom bolo vykonaných 25 cyklov PCR-amplifikácie, pričom pri jednom cykle bolo vykonané vždy zohriatie 1 minútu na 94 °C, 1 minútu na 55 °C a 2 minúty na 72 °C. Takto pripravený produkt PCR bol rozštiepený pôsobením endonukleáz XhoI a EcoRI, čistený elektroforézou na agarozovom géli a potom klonovaný vo vektore p9102, vopred rozštiepenom vyššie uvedenými reštrikčnými enzýmami. Jednotlivé klony, predstavujúce vektor, obsahujúci variabilnú oblasť dlhého reťazca 447-52D, odvodeného vyššie uvedeným spôsobom a tiež ľudskú konštantnú oblasť gama 1, odvodenú z DNA-genómu PCR-amplifikáciou boli použité na overenie reťazca DNA kódovej oblasti pre rekombinantne modifikovaný 447-52D, ako je zrejmé z obr. 2a.

Rekombinantný vektor pre krátky reťazec 447-52D bol skonštruovaný po rozštiepení PCR-amplifikovaného signálneho reťazca a intrónu, susediaceho s V-oblasťou krátkeho reťazca, ako bolo vyššie opísané, pôsobením HindIII a XbaI s následným čistením vzniknutého fragmentu DNA elektroforézou na agarozovom géli. Táto kódová DNA pre V-oblasť bola klonovaná v plazmide pSP72/58.2/L16VH/gama1MRC, ktorý bude ďalej opísaný a ktorý bol predbežne rozštiepený enzýmami HindIII a EcoRI spolu s fragmentom DNA pre exón ľudskej konštantnej oblasti ľahkého reťazca. Tento druhý fragment bol získaný PCR-amplifikáciou 10 ng DNA plazmidu 208 s obsahom fragmentu po rozštiepení EcoRI/HindIII, zahrňujúceho konštantnú oblasť ľudského lambda 2. Príslušný pár primérov (C1 a C2 z obr. 1), a to 50 pmolov každého z primérov bolo uvedených do reakcie s DNA plazmidu, 2,5 jednotkami Tq-polymerázy DNA a po-

tom bolo vykonaných 25 cyklov PCR-amplifikácie, pričom pri jednom cykle bolo vykonané vždy zohriatie 1 minútu na 94 °C, 1 minútu na 55 °C a 2 minúty na 72 °C. Produkt reakcie, obsahujúci 620 párov báz bol rozštiepený reštrikčnými enzýmami XbaI a EcoRI a získaný materiál bol čistený elektroforézou na agarozovom géli pred použitím na uskutočnenie väzby vyššie uvedeným spôsobom. Pri analýze takto získaných klonov bolo možné dokázať očakávanú uloženú časť kódového reťazca pre ľahký reťazec s 1,2 kb po rozštiepení enzýmami HindIII a EcoRI s následnou elektroforézou na agarozovom géli. DNA bola získaná pestovaním jednotlivých bakteriálnych klonov a potom bola uskutočnená analýza reťazca takto získanej DNA za použitia enzýmu Sequenase^{R}, použité boli špecifické priméry T7 a SP6 na analýzu reťazca, aby bolo možné overiť reťazec rekonštruovanej variabilnej oblasti a v jeho susedstve konštantnú oblasť lambda, ako je znázornené na obr. 2b. DNA plazmidu, predstavujúca vektory pre expresiu dlhého a krátkeho reťazca 447-52D bola pestovaná pozdĺž vyššie uvedenej publikácie Maniatise a ďalších a čistená na použitie pri transfekcii buniek cicavcov taktiež podľa publikácie Maniatise a ďalších a tiež podľa vyššie uvedenej publikácie Birbion a Dolyho).

Transkripcia molekúl imunoglobulínu dlhého a krátkeho reťazca bola uskutočnená z plazmidov, ktoré sú totožné až na to, že obsahujú odlišné kódové reťazce pre imunoglobulíny. Výhodným základným vektorom na expresiu imunoglobulínov je niektorý z vyššie opísaných vektorov, ktoré obsahujú časť LTR-promótora HIV-1 (-117 až +80, vzhľadom na prednú časť), miesto pre mnohopočetné klonovanie a polyadenylačný signál SV40, ako je znázornené na obr. 6. Plazmid pEE14 (Celltech, Ltd.) je zdrojom väčšiny reťazcov DNA v tomto vektore, ktorý bol označený pSZ9015. Promótor CMVIE vektora pEE14, bol odstránený rozštiepením pôsobením enzýmov MluI a HindIII. Vektor DNA bez promótora s veľkosťou 8 kb bol čistený elektroforézou na agarozovom géli a naviazaný na PCR-amplifikovaný fragment DNA s približne 200 pármi báz, obsahujúci 197 párov báz LTR-promótora HIV (-117 až +80)

a zakončenie MluI a HindIII (získané za použitia párov primérov), opísané na obr. 1 a matricu DNA 1B4-Vk ľudského Ck/HygB-plazmidu s naočkovaným REP3/HIV-LTR tak, ako bol opísaný v publikácii DeMartino J. A. a ďalší, Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals, 4, 829 až 835, 1991. Konštantná oblasť gama 1 dlhého reťazca bola uložená do vektora p9015 ako fragment s veľkosťou 2,0 kb po štiepení XbaI/EcoRI s polu s nepríbuznou V-oblasťou dlhého reťazca za vzniku vektora pSP72/58.2/L16VH/gama 1MRC. Plazmidy boli označené pHIV447VH v prípade plazmidu s obsahom dlhého reťazca a pHIV447Vlambda pre plazmid s obsahom krátkeho reťazca. Oba uvedené plazmidy boli v svojom hostiteľovi E. coli uložené pred podaním predmetnej prihlášky do verejnej zbierky kultúr American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville MD a sú bez obmedzenia dostupné v súlade s predpismi a požiadavkami Budapeštianskej dohody. Hostiteľské kmene E. coli, ktoré tieto plazmidy obsahujú, sú v uvedenej zbierke kultúr označené číslami 68945 v prípade plazmidu pHIV447VHgama1 a 68943 v prípade plazmidu pHIV447Vlambda/Clambda.

Rovnaké množstvá vždy 10 mikrogramov plazmidov, obsahujúcich kódový reťazec pre dlhý a pre krátky reťazec boli použité na transfekciu za použitia štandardného zrážania fosforečnanom vápenatým, boli použité ľudské bunky 293 podľa vyššie uvedenej publikácie DeMartino J. A. a ďalší, s výnimkou súčasnej transfekcie s kódovým plazmidom pre HIV-1 TAT, v tomto prípade nebolo nutné vykonať transaktiváciu a tak dosiahnuť vysokú úroveň transkripcie vektora pre expanziu HIV-1 LTR. Supernatanty kultúr boli sledované, napríklad vykonaním skúšky ELISA na tuhej fáze tak, ako bude ďalej podrobnejšie opísané, preukázaná bola sekrécia imunoglobulínu IgG1, obsahujúceho ľudský krátky reťazec lambda.

Bola vyvinutá skúška ELISA na kvantitatívne stanovenie množstva rekombinantnej protilátky 447-52D, k expresii ktorej došlo v upravenom rastovom prostredí v cicavčích bunkách. Platne s 96 vyhĺbeninami Immulon-2 (Dynatech Labs), boli cez noc opatrené povlakom roztoku monoklonálnej myšej

protilátky proti stálej oblasti ľudského reťazca lambda v koncentrácii 10 mikrogramov/ml (číslo v katalógu 05-4101, Zymed Laboratories, Inc) vo fyziologickom roztoku chloridu sodného pri teplote 4 °C, potom bola reakcia blokovaná 1% sérovým albumínom hovädzieho dobytka (BSA) v PBS celkom 1 hodinu pri teplote 37 °C. Po opakovanom premytí za použitia PBS boli vzorky (v upravenom prostredí s obsahom rekombinantnej protilátky 447-52D alebo štandardnej ľudskej protilátky lambda/IgG1, Sigma Chemical) zriedené v PBS s obsahom 1 % BSA v dvojitom uskutočnení a inkubované 1 hodinu pri teplote 37 °C. Potom boli pripravené štandardné kalibračné krivky za použitia koncentrácie IgG1 v rozmedzí 7,8 až 500 ng/ml. Viazaný ľudský IgG1 bol dokázaný vo vzorkách s objemom 50 mikrolitrov pri riedení 1:400 myšej monoklonálnej protilátky proti ľudskému IgG1 Fc, konjugovanej s peroxidázou z chrenu (číslo v katalógu 05-3322, Zymed Laboratories, Inc.) v PBS s obsahom približne 1 % BSA. Po inkubácii jednu hodinu pri teplote 37 °C a následnom premytí bolo preukázané množstvo viazaného konjugátu pridaním 1 mM kyseliny 2,2'-azín-bis-(3-etylbenztiazolín-6-sulfónovej) v 0,1 M citráte sodnom s pH 4,2 s obsahom 0,03 % peroxidu vodíka, inkubácia trvala 20 minút pri teplote miestnosti. Adsorbancia vo vyhĺbeninách bola stanovená odčítacím zariadením pre platne ELISA (Bio-Rad, Inc.) pri 414 nm. Alternatívne bola vykonávaná skúška ELISA na tuhej fáze na platniach s povlakom peptidov s 26 zvyškami na báze reťazca izolátu kmeňa MN. Tento peptid (NleCSYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGCS, reťazec 4. 1) bol syntetizovaný metódou Fmoc na tuhej fáze za použitia vopred aktivovaných pentafluórfenylesterov pri aktivácii hydroxybenzyltriazínom. Platne Immunol-2 boli cez noc opatrené povlakom peptidu, ktorý bol použitý v koncentrácii 1 mikrogram/ml s následným blokovaním pôsobenia 1% fetálneho séra hovädzieho dobytka v PBS. Detekcia viazanej protilátky 447-52D bola vykonávaná vyššie uvedeným spôsobom. Protilátka, ktorá bola vylučovaná ľudskými bunkami 293 po transfekcii na základe prechodnej expresie, potom bola čistená chromatografiou za použitia štandardnej bielkoviny A, vykonávanou podľa publi-

kácie DeMartino J. A. a ďalší tak, ako bolo vyššie uvedené.

Koncentrácia rekombinantnej protilátky 447-52D bola stanovená vyššie opísanou skúškou ELISA a bola potom skúšaná na svoju účinnosť dôkazom schopnosti neutralizovať infektivitu určitých serotypov HIV-1.

Nasledujúca skúška bola uskutočnená tak, aby bolo možné kvantitatívne vyjadriť neutralizáciu bezbunkového vírusu HIV-1 a tiež inhibíciu šírenia tejto infekcie od bunky k bunke, skúška bola uskutočnená stanovením doby prežívania buniek po vystavení kultúry pôsobeniu protilátky a vírusu po dobu 7 až 8 dní. Bolo pripravené sériové riedenie skúmanej protilátky v prostredí pre rast buniek (RPMI 1640 + 10% fetálne teľacie sérum) tak, že nasledujúce riedenie bolo vždy dvojnásobkom riedenia predchádzajúceho a vzorky po 100 mikrolitroch boli uložené do vyhĺbenín platní s 96 vyhĺbeninami (Costar Corp.). Potom bolo do každého vyhĺbenia pridaných 100 mikrolitrov zásobného roztoku vírusu (pripraveného z chronicky infikovaných buniek H9 alebo z novo pripravených chronicky infikovaných buniek FDA/H9, živné prostredie chronicky infikovaných buniek, pestovaných 3 dni bolo použité pri hustote 2 x 10^5 buniek/ml po vyčerení, riedenie na 10-násobok predchádzajúceho riedenia zásobného roztoku vírusu, ktorý spôsobí úhyn všetkých buniek MT-4 v priebehu 7 dní sa volí ako skúmaná dávka vírusu). Potom sa zmes vírusu a protilátky inkubuje 1 hodinu pri teplote 37 °C. Do každého vyhĺbenia sa pridajú bunky MT-4 v množstve 1 x 10^4 buniek/vyhĺbenie v 50 mikrolitroch živného prostredia a platne sa inkubujú 7 dní pri teplote 37 °C, po tejto dobe sa skúška skončí. Koncentrácia protilátky v poslednom riedení, ktorými je možné zabrániť uhynutiu buniek MT-4 sa považuje za koncovú neutralizačnú hodnotu pre protilátku.

Výsledky neutralizačnej skúšky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke IX a dokazujú, že účinnosť rekombinantnej ľudskej protilátky 447-52D je rovnaká ako účinnosť ľudskej protilátky, odvodenej od heterohybridómu 447-52D pre každý zo sledovaných serotypov vírusu HIV-1. Tento výsledok zrejme dokazuje, že rekombinantne skonštruované protilátky,

k expresii ktorých dochádza pri zachovaní konštantných ľudských oblastí lambda a gama-1 neboli modifikované až do tej miery, aby došlo k porušeniu interakcií týchto protilátok so slučkou V3 PND, takže si tieto rekombinantné protilátky uchovávajú biologickú účinnosť natívnej protilátky.

T a b u ľ k a IX

Koncový bod neutralizácie v mikrogramoch/ml pri skúške in vitro na úhyn buniek MT-4

izolát HIV-1	rekombinantná protilátka 447	heterohybridóm 447
izolát HIV-1 IIIB	0,78	1,29[x]
MN	0,19	0,37
AL-1	0,09	0,15
SF-2	0,04	0,04
DU 6587-5	0,09	0,62
DU 7887-7	0,37	0,78
WMJ-2	0,87	1,35
RF	nd	0,62
SF-162	nd	1,98+

x = geometrický priemer titra

+ = primárne kultúry makrofágov a monocytov v množstve 2 x 10^5 buniek/vyhĺbenie mikrotitračnej platne boli pestované tak, že čerstvé prostredie bolo pridané v dňoch 5, 8, 12, 14 a 21. Upravené živné prostredie bolo podrobené skúškam na prítomnosť antigénu p24 jadra vírusu pomocou skúšky ELISA (Coulter Immunology, Hialiah, FL), v dňoch 24 boli bunky z každého vyhĺbenia rozrušené a podrobené tej istej skúške. Koncový bod bol stanovený ako posledné riedenie protilátky, ktoré zabránilo prítomnosti p24 v kultúre buniek.

nd = nebolo vykonané.

Príklad 10

Bol skonštruovaný systém na expresiu a použitý na prípravu veľkých množstiev rekombinantnej protilátky 447. V tomto systéme na expresiu bol využitý včasný promótor na transkripciu z cytomegalovírusu (CMVIE), ako označenie na selekciu bola použitá syntetáza glutamínu (GS) v amplifikačnej kazete, tento systém na expresiu je použiteľný pre rôzne navzájom odlišné bunkové línie cicavcov, ako bolo opísané v publikácii Bebington a ďalší, Biotechnology, 10, 169 až 175, 1992. Základné vektory, pEE12 a pEE6 boli získané od výrobcu Celltech, Ltd. a boli použité na vytvorenie plazmidu, ktorý bol označený p63.78r447 a bol schopný zaistiť transkripciu peptidov imunoglobulínu s dlhým a s krátkym reťazcom okrem produktu génu GS. Pri konštrukcii tohto vektora na expresiu r447 boli využité už existujúce základní vektory, ktoré obsahovali reťazec pre odlišné imunoglobulíny.

50 mikrogramov DNA plazmidu pHIV/447V_H/Cgama1 tak, ako je znázornené na obr. 5, s obsahom V-oblasti protilátky r447 bolo rozštiepených pôsobením reštrikčných endonukleáz HindIII a XhoI. Fragment oblasti V dlhého reťazca 447, obsahujúci približne 8000 párov báz (bp) bol čistený elektroforézou na géli s obsahom 0,8 % agarózy (pripravený v TAE, 40 mM TRIS bázy, 1mM EDTA, s pH 8,0, kyselina octová do pH 7,4), odštiepený fragment DNA bol uložený do dialyzačnej trubice s priemerom 2 cm (BRL) s obsahom čo najmenšieho objemu TAE a potom bola uskutočnená elektroelúcia DNA elektroforézou, vykonávanou 30 minút pri 150 V. Výsledný roztok DNA bol z dialyzačnej trubice odstránený a dvakrát extrahovaný zmesou fenolu a chloroformu, potom bola DNA koncentrovaná zrážaním pôsobením etanolu a znova uvedená do suspenzie v pufri TE (10 mM TRIS HCl, 1 mM EDTA s pH 8,0).

Podobným spôsobom bolo 50 mikrogramov DNA plazmidu pEE12/58.2L16V_H/Cgama1, obsahujúceho promótor CMVIE, transkripčnú jednotku génu GS a ako značenie gén na odolnosť proti ampicilínu rozštiepeného pôsobením reštrikčných endonukleáz HindIII a EcoRI. Fragment DNA vektora so 7087 bp na

báze pBR322 bol čistený vyššie uvedeným spôsobom. Približne 2 mikrogramy tohto fragmentu DNA boli naviazané na približne 0,9 mikrogramov fragmentu DNA s veľkosťou 800 bp z plazmidu pHIV/447V_H/Cgama1, ktorý bol opísaný vyššie a bola pridaná jedna desatina objemu desaťnásobnej koncentrácie pufra pre väzbu (660 mM TRIS-HCl, 50 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 10 mM ATP s pH 7,3), okrem toho bolo pridaných 25 jednotiek T4-DNA-ligázy (Boehringer Mannheim). Zmes (pri konečnej koncentrácii DNA 28,9 ng/ml) bola inkubovaná jednu hodinu pri teplote miestnosti, aby mohlo dôjsť k väzbe fragmentov DNA, potom bola ligáza inaktivovaná pôsobením tepla po dobu 5 minút pri teplote 65 °C, reakčná zmes bola extrahovaná zmesou fenolu a chloroformu a DNA bola koncentrovaná zrážaním etanolom. Potom bola DNA znova uvedená do suspenzie v dH_2O a potom boli pridané reštrikčné endonukleázy EcoRI a XhoI po úprave roztoku na koncentráciu pufra podľa doporučenia výrobcu. Po inkubácii jednu hodinu pri teplote 37 °C bola rozštiepená DNA čistená elektroforézou na 0,8% agarozovom géli vyššie uvedeným spôsobom. Požadovaný fragment so 7887 bp, získaný väzbou fragmentov DNA z bol gélu odstránený a DNA bola izolovaná elektroelúciou a koncentrovaná zrážaním etanolom vyššie uvedeným spôsobom. Postup, ktorý bol označený ako cyklus LDP a je znázornený na obr. 8, spočíva v tom, že sa fragmenty DNA navzájom naviažu, rozštiepia pôsobením reštrikčných enzýmov a potom sa čistia. Tento cyklus bol použitý na skrátenie doby, ktorá je potrebná na konštrukciu zložitejších plazmidov ako vektorov.

Približne 50 mikrogramov DNA každého z oboch plazmidov (pHIV/447V_L/Clambda a pEE12/58.2L16V_H/Cgama1), z ktorých jeden obsahoval krátky reťazec 447 lambda s veľkosťou 1200 bp a druhý obsahoval konštantnú oblasť ľudského imunoglobulínu gama 1 a promótor CMVIE so 4158 bp fragmentu DNA, bolo rozštiepených pôsobením reštrikčných enzýmov HindIII a EcoRI alebo XhoI a HindIII. Oba tieto fragmenty DNA boli čistené elektroforézou na 0,8% agarozovom géli s následnou elektroelúciou, ako bolo opísané vyššie. Väzba troch fragmentov DNA bola pripravená za použitia vyššie uvedených dvoch fragmen-

tov DNA (18,8 mn HindIII.RcoRI) a vyššie opísaného fragmentu DNA s veľkosťou 7887 bp, tento fragment bol použitý v množstve 500 ng. Reakčná zmes, obsahujúca konečnú koncentráciu DNA 11,85 mikrogramov/ml a 5 jednotiek T4-DNA-ligázy v bežnej koncentrácii pufra pre väzbu, ktorého zloženie bolo uvedené vyššie, bola inkubovaná jednu hodinu pri teplote miestnosti a potom bola zriedená v pomere 1:5, potom bol 1 mikroliter tejto zmesi použitý na transformáciu kompetentného kmeňa E. coli HB101 (BRL) podľa návodu výrobcu. Transformované kmene boli podrobené selekcii na platniach LB-agare s obsahom 50 mikrogramov/ml ampicilínu (Sigma) a DNA bola extrahovaná na vyhodnotenie prítomnosti požadovaného rekombinantného plazmidu, ako je znázornené na obr. 7. Tento plazmid na expresiu bol označený p63.79r447 a obsahuje kódové reťazce pre dlhý reťazec gama 1 447, pre krátky reťazec lambda 447, kazetu na selekciu GS a selekčné značenie, ktorým je gén na odolnosť proti ampicilínu a okrem toho v úzkom susedstve kód pre začiatok replikácie.

Vyššie opísaný vektor pEE12/58.2L16V_H/Cgama1 bol skonštruovaný z vektora pEE12, ktorý bol opísaný vo vyššie uvedenej publikácii Bebington a ďalší. Po rozštiepení pôsobením enzýmov HindIII a EcoRI bol vektor pEE12 a vektor pSP72 (Promega, Inc.) obsahujúci V-oblasť dlhého reťazca humanizovanej protilátky 58.2 spojený fúziou s konštantnou oblasťou gama 1 ľudského pôvodu v mieste XbaI z transformantu E. coli. Potom boli identifikované klony, obsahujúce plazmid pEE12/58.2L16V_H/Cgama1t. Táto DNA plazmidu potom bola rozštiepená pôsobením enzýmu XhoI a EcoRI, oblasť Cgama1t dlhého reťazca bola oddelená od V-oblasti dlhého reťazca so stále pripojenou väčšou časťou plazmidu. Skrátená verzia ľudskej kódovej oblasti Cgama1 bola získaná PCR-amplifikáciou za použitia oligonukleotidov G1 a G2 a klonu kozmidu cosIg9 ako matrice podľa publikácie Flanagan a Rabbits, Nature 300, 709 až 713, 1982. Príslušný pár primérov, oligonukleotidy G1 a G2 z obr. 1 a to 50 pmolov každého z týchto primérov bolo naviazaných na 10 ng DNA kozmidu s obsahom exónov ľudskej konštantnej oblasti gama 1, 2,5

jednotiek taq-DNA-polymerázy a potom bolo vykonaných 25 cyklov PCR-amplifikácie, 1 cyklus spočíval v zohrievaní 1 minútu na teplotu 94 °C, 1 minútu na teplotu 55 °C a 2 minúty na 72 °C. Produkt PCR bol rozštiepený pôsobením enzýmov XhoI a EcoRI, čistený elektroforézou na agarozovom géli a potom klonovaný v plazmide pEE12/58.2L16V_H-časti vektora. Jednotlivé klony, predstavujúce vektor s obsahom variabilnej oblasti dlhého reťazca 447 a skrátenej verzie konštantnej oblasti ľudského gama 1 boli identifikované a izolované.

Výsledný plazmid p63.79r447, obsahujúci kódové oblasti pre dlhý reťazec a pre krátky reťazec ľudskej monoklonálnej protilátky 447 bol v svojom hostiteľovi E. coli uložený pred podaním predmetnej prihlášky do verejnej zbierky kultúr American Culture Collection, 12301 Parklawn Drive Rockville, MD a je prístupný bez obmedzenia v súlade s podmienkami a požiadavkami Budapeštianskej dohody. Hostiteľský kmeň E. coli, ktorý obsahuje plazmid p63.79r447 bol do zbierky zaradený pod číslom ATCC 68944.

Príklad 11

Transfekcia buniek NS/O

Bunky NS-O boli udržované v exponenciálnej fáze rastu v živnom prostredí, ktoré bolo tvorené Iscoveho minimálnym základným prostredím, doplneným 10 % fetálneho séra hovädzieho dobytka, inaktivovaného teplom a 4 mM glutamínu, bunkový materiál bol udržovaný pri teplote 37 °C vo vlhkom inkubátore v prítomnosti 5 až 6,5 % oxidu uhličitého.

Plazmid na transfekciu bol linearizovaný rozštiepením pôsobením reštrikčného enzýmu v jedinom mieste. Toto miesto bolo s výhodou uložené vo vnútri cudzorodého génu, k expresii ktorého malo dôjsť, to znamená, v reťazci vektora. Po rozštiepení bola DNA deproteinizovaná extrakciou fenolom, potom extrakciou zmesi fenolu s chloroformu v pomere 1:1 a nakoniec extrakciou chloroformom, potom bola DNA vyzrážaná za sterilných podmienok v laboratóriu na biologické postupy

za použitia konečnej koncentrácie 0,2 až 0,4 M chloridu sodného a 70% etanolu. Potom bola DNA znova uvedená do suspenzie v sterilnej vode v koncentrácii 1 mikrogram/1 mikroliter. Táto DNA potom bola okamžite použitá alebo bola zmrazená na -20 °C až do použitia.

Pri vykonávaní transfekcie bola použitá zásobná kultúra buniek NS/O so známym počtom životaschopných buniek. Bolo použitých celkom 1 x 10^7 životaschopných buniek na jednu kyvetu na uskutočnenie transfekcie. Bunkový materiál bol najskôr odstredený pri 3000 x g po dobu 5 minút pri teplote miestnosti, usadenina buniek bola dvakrát premytá sterilným fyziologickým roztokom chloridu sodného a fosfátovým pufrom, PBS a potom bola znova uvedená do suspenzie v PBS v koncentrácii 10^7 buniek na 800 mikrolitrov. Suspenzia buniek bola od toho okamžiku uložená do ľadu. 10^7 buniek bolo prenesených opatrne do kyvety (BioRad) so vzdialenosťou medzi elektródami 0,4 cm za sterilných podmienok v laboratóriu na vykonávanie biologických pokusov. Potom bolo k bunkovému materiálu pridaných 40 mikrogramov linearizovanej DNA plazmidu vo forme roztoku a kyveta bola ešte 5 minút ponechaná v ľade. Pred otvorením pórov pôsobením elektrického prúdu bola vonkajšia strana kyvety vytretá do sucha a potom bola kyveta uložená do držiaku zariadenia BioRad Gene Pulser. Toto zariadenie potom bolo nastavené na 3 mikroF pri 1500 V na jeden pulz. Boli použité dva po sebe nasledujúce pulzy. Potom bola kyveta uložená do ľadu na dobu 2 až 5 minút, potom bol bunkový materiál prenesený do 30 ml modifikovaného rastového prostredia, ktoré obsahovalo namiesto vyššie uvedených 4 mM glutamínu len 1 ,? glutamínu v sterilnej skúmavke na jedno použitie s objemom 50 ml. 10 ml bunkovej suspenzie z pôvodných 30 ml bolo uložených do mikrotitračnej platne s 96 vyhĺbeninami, na každú vyhĺbeninu bolo použitých približne 100 mikrolitrov suspenzie. 10 ml bunkovej suspenzie zo zvyšných 20 ml bolo zriedených 10 mililitrami modifikovaného živného prostredia a rozdelených do dvoch mikrotitračných platní s 96 vyhĺbeninami, približne 100 mikrolitrov na jedno vyhĺbenie. Posledných 10 ml bunkovej suspenzie bolo

zriedených 30 ml modifikovaného rastového prostredia a rozdelených do štyroch mikrotitračných platní s 96 vyhĺbeninami. Tieto platne potom boli inkubované cez noc v inkubátore s vlhkým prostredím pri teplote 37 °C v prítomnosti 5 až 6,5 % oxidu uhličitého.

Prostredie na selekciu

Na selekciu bolo použité živné prostredie s nasledujúcim zložením:
Iscoveho minimálne základné prostredie, zbavené glutamínu (Sigma)
10 % dialyzovaného fetálneho séra hovädzieho dobytka (Hyclone)
1 x nukleozidy[x]
1 x asparagín[xx]

[x] 50 x zásobný roztok nukleozidov:
35 mg adenozínu
35 mg guanozínu
35 mg cytidínu
12 mg tymidínu

Zložky roztoku boli získané od Sigma s čistotou, vhodnou na použitie v bunkových kultúrach. Zmes bola doplnená na 100 ml sterilnou destilovanou vodou. Roztok bol sterilizovaný filtráciou cez filtračné jednotky s otvormi 0,1 mikrometrov a skladovaný pri teplote -20 °C po podieloch s objemom 10 ml.

[xx] 10 x asparagín:
Použije sa 600 mg asparagínu na 100 ml sterilnej destilovanej vody, roztok sa prefiltruje cez filtračnú jednotku a otvormi 0,1 mikrometer a skladuje pri 4 °C.

Selekcia

24 hodín po transfekcii sa do každého vyhĺbenia mikrotitračnej platne s 96 vyhĺbeninami pridá 100 mikrolitrov prostredia na selekciu a platne sa inkubujú v inkubátore s vlhkým prostredím pri teplote 37 °C v prítomnosti 5 až 6,5 % oxidu uhličitého tak dlho, až vyrastú kolónie, čo trvá približne 3 až 3,5 týždňov. Nie je potrebné pridávať ďalšie živiny s výnimkou prípadov, kedy vyhĺbenia začnú vyschýnať. Platne sa sledujú v intervaloch 3 až 4 dni. Vyhĺbeniny, v ktorých začnú vyrastať kolónie, je možné rozoznať podľa tvorby žltého zafarbenia, v tomto okamžiku sa materiál vo vyhĺbenine odoberie na vykonávanie skúšok, odstráni sa 50 až 100 mikrolitrov supernatantu a do vyhĺbeniny sa doplní prostredie na selekciu, aby bol udržaný rast životaschopných klonov.

Príklad 12

Pri vykonávaní prvej skúšky bola čistená neutralizačná protilátka proti HIV-1 podaná vnútrožilovo šimpanzovi v dávke 36 mg/ml. Po ďalších 24 hodinách bol šimpanzovi podaný variant HIV-1 IIIb, použitý bol 75-násobok infekčnej dávky pre šimpanzov. V dobe podania vírusu bolo možné dokázať v krvnom obehu šimpanza titer neutralizačnej protilátky proti vírusu 1:320. Vírus bol súčasne podaný aj kontrolnému šimpanzovi, ktorý nebol predbežne ošetrený.

V nasledujúcej tabuľke X sú uvedené výsledky tejto skúšky. Kontrolný šimpanz (x 39) začal po troch týždňoch po podaní vírusu javiť známky infekcie, zvlášť bolo možné izolovať vírus z monoklonálnych buniek periférnej krvi, PBMC. Po 6 týždňoch po podaní vírusu sa vytvorili protilátky a po dobu ďalších 72 týždňoch pozorovania bolo možné v krvi dokázať protilátku a tiež vírus. Na druhej strane šimpanz (x 289), ktorému bola podaná protilátka, bol zbavený príznakov vírusovej infekcie. U tohto šimpanza nebolo možné dokázať v PBMC pomocou PCR-reakcie žiadnu nukleovú kyselinu, špecifickú pre použitý vírus.

T a b u ľ k a X

Ochranný účinok monoklonálnej protilátky [a] proti slučke V3, podanej pred podaním vírusu

A. Kontrolný šimpanz (x 39)

týždne po podaní vírusu[b]	titer neut. protilátky[c]	ELISA a western blot[d] proti HIV-1	izolácia vírusu[e]	PCR[f], špec. pre vírus
0	10	-	-	-
(deň 1)	10	-	NDg	ND
1	10	-	-	-
2	10	-	-	-
3	10	-	+	+
4	10	-	+	+
6	10	+	+	+
8	20	+	+	+
10	106	+	+	+
12	320	+	+	+
14	160	+	+	+
16	≥640	+	+	+
20	≥640	+	+	+
24	≥640	+	+	+
28	≥640	+	+	+
32	≥640	+	+	+
36	≥640	+	+	+
40	≥640	+	+	+
44	≥640	+	+	+
48	≥640	+	+	+
52	≥640	+	+	+
64	≥640	+	+	+
72	≥640	+	+	+

T a b u ľ k a X - pokračovanie

B. Šimpanz, ktorému bola podaná protilátka pred podaním vírusu (x 289)

týždne po podaní vírusu[b]	titer neut. protilátky[c]	ELISA a western blot[d] proti HIV-1	izolácia vírusu[e]	PCR[f], špec. pre vírus
0	<10	-	-	-
(deň 1)	320	+/-	NDg	ND
1	320	+/-	-	-
2	80	+/-	-	-
3	20	+/-	-	-
4	10	-	-	-
6	<100	-	-	-
8	<10	-	-	-
10	<10	-	-	-
12	<10	-	-	-
14	<10	-	-	-
16	<10	-	-	-
20	<10	-	-	-
24	<10	-	-	-
28	<10	-	-	-
32	<10	-	-	-
36	<10	-	-	-
40	<10	-	-	-
44	<10	-	-	-
48	<10	-	-	-
52	<10	-	-	-
64	<10	-	-	-
72	<10	-	-	-

Poznámky k tabuľke X:

a Protilátka C-beta1 bola čistená afinitnou chromatogra-

fiou za použitia proteínu A. Vírus bol podaný v 1. dni po podaní protilátky šimpanzovi x289. Použitý vírus bol získaný od Larry Arthura a Petra Fischingera (National Cancer Institute) a jeho množstvo v okamžiku podania bolo stanovené podľa publikácie Emini a ďalší, tak ako bolo uvedené vyššie. Šimpanzi boli chovaní za podmienok, ktoré vyhovovali alebo boli ešte priaznivejšie než podmienky, stanovené United States National Institutes of Health pre starostlivosť o laboratórne zvieratá.

b Vírus bol podaný vnútrožilovo, ako bolo uvedené vyššie.

c Titer protilátky, neutralizujúci vírus bol stanovený v bunkovej kultúre za použitia variantu HIV-1 IIIb spôsobom podľa publikácie Robertson a ďalší, 14. Množstvo vírusu, použité v pokuse bolo totožné s množstvom vírusu, ktoré bolo použité u šimpanzov. Hodnoty uvádzajú prevrátenú hodnotu najvyššieho riedenia, ktorým je možné dosiahnuť účinnú neutralizáciu vírusu.

d Protilátky proti HIV-1 pri skúške ELISA a Western blot boli stanovené podľa publikácie Emini a ďalší, uvedenej vyššie. (+) znamená pozitívnu reakciu ELISA a mnohopočetné pásy pri skúške Western blot. (+/-) znamená reaktívny pás pri skúške Western blot len pre gp120 a negatívnu skúšku ELISA. (-) znamená negatívnu skúšku ELISA a žiadny reaktívny pás pri skúške Western blot.

e Izolácia vírusu bola vykonávaná tak, že PBMC šimpanza boli pestované in vitro za použitia štyroch postupov:

1) PBMC šimpanzov boli pestované súčasne s rovnakým počtom mitogénom aktivovaných ľudských PBMC v živnom prostredí s obsahom IL-2 a DEAE-dextránu.

2) PBMC šimpanzov boli aktivované za použitia fytohemaglutinínu PHA a potom pestované ako v odstavci 1).

3) PBMC šimpanzov boli stimulované PHA a potom boli pestované samy osebe v prostredí s obsahom IL-2.

4) PBMC šimpanzov boli pestované súčasne s rovnakým počtom aktivovaných ľudských PBMC v prostredí, ktoré bolo doplnené PHA a IL-2.

V každom z týchto prípadov obsahovali kultúry 1 x 10 bu-

niek šimpanzov o objeme 10 ml. Kultúry boli inkubované pri teplote 37 °C v atmosfére s 5 % oxidu uhličitého celkom 4 týždne. Potom boli supernatanty podrobené skúškam na prítomnosť antigénu p24 HIV-1 v týždenných intervaloch. Rast vírusu, stanovený ktoroukoľvek z uvedených metód bol považovaný za pozitívnu izoláciu vírusu.

f Prítomnosť nukleových kyselín, špecifických pre PBMC šimpanzov bola stanovená pomocou PCR-reakcie. DNA bola získaná z PBMC inkubáciou vzoriek buniek v 10 mM tris HCl s pH 8,3, 1,0 mM EDTA s pH 8,0, 0,5 % SDS, 150 mikrogramov/ml proteinázy K celkom 60 minút pri teplote 60 °C. Po extrakcii zmesou fenolu a chloroformu bola DNA zrážaná etanolom. Pre PCR-reakciu boli použité 1 až 3 mikrogramy DNA. Každá z reakčných zmesí obsahovala okrem DNA ešte 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM tris HCl s pH 8,3, 50 mM KCl, 0,032 mM každého z dNTP, 50 ng každého priméru a 1, 0 jednotiek Taq-polymerázy. Pre PCR-reakciu bolo použitých vždy 1,5 mikromolov DNA. Pokiaľ ide o priméry, bol použitý špecifický pár primérov SK38/39 pre HIV-1 gag. Bolo vykonaných 35 akčných cyklov, pri každom cykle bolo uskutočnené na 1,5 minútu zohriatie na 94 °C a potom na 3 minúty zohriatie na 56 °C. Po skončení reakcie bol amplifikovaný produkt dokazovaný hybridizáciou za použitia sondy SK19. Citlivosť PCR-skúšky bola stanovená ako 10 špecifických kópií HIV-1 na vzorku DNA.

g ND - nebolo vykonané.

Príklad 13

Po počiatočných skúškach, vykonaných spôsobom podľa príkladu 10 bola vykonaná ďalšia skúška na ochranný účinok protilátky, neutralizujúcej HIV-1 v prípade, že táto protilátka bola podaná po pôsobení vírusu. Dva šimpanzi, x299 a x196 boli naočkovaní vnútrožilovo 75-násobkom infekčnej dávky kmeňa HIV-1 IIIb. 10 minút po naočkovaní vírusu bola šimpanzovi x299 vnútrožilovo podaná protilátka v dávke 36 mg/kg. Celkový objem približne 200 ml bol podaný v priebehu

30 minút. Titer protilátky v krvnom obehu na konci podávania bol 1:640. Šimpanz x196 bol ponechaný bez ošetrenia.

Získané výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke XI. U kontrolného šimpanza x196 bolo možné prvýkrát pozitívne izolovať vírus z PBMC 6 týždňov po styku s vírusom. U kontrolného zvieraťa bolo možné preukázať tvorbu protilátok po 8 týždňoch a u tohto šimpanza bolo možné izolovať tak vírus, ako aj protilátku v priebehu 48 týždňov pozorovania. U šimpanza x299, ktorému bola podaná protilátka tesne po styku s vírusom, nebolo až dosiaľ možné pozorovať žiadne známky pretrvávajúcej infekcie vírusom. Tiež PCR-analýza na nukleovú kyselinu, špecifickú pre vírus v PBMC tohto šimpanza bola negatívna.

T a b u ľ k a XI

Ochranný účinok podania monoklonálnej protilátky[a] proti slučke V3, po styku s vírusom

A. Kontrolný šimpanz (x196)

týždne po podaní vírusu	titer neut. protilátky	ELISA a western blot proti HIV-1	izolácia vírusu	PCR, špec. pre vírus
0	<10	-	-	-
(deň 1)	<10	-	ND	ND
1	<10	-	-	-
2	<10	-	-	-
3	<10	-	-	-
4	<10	-	-	-
6	<10	-	+	+
8	<10	+	+	+
10	<10	+	+	+
12	10	+	+	+
14	20	+	+	+
16	80	+	+	+
18	80	+	+	+
20	160	+	+	+
24	320	+	+	+
28	≥640	+	+	+
32	≥640	+	+	+
36	≥640	+	+	+
40	≥640	+	+	+
44	≥640	+	+	+
48	≥640	+	+	+

T a b u ľ k a X - pokračovanie

B. Šimpanz, ktorému bola po styku s vírusom podaná protilátka (x299)

týždne po podaní vírusu	titer neut. protilátky	ELISA a western blot proti HIV-1	izolácia vírusu	PCR, špec. pre vírus
0	640[b]	+/-[b]	-	-
(deň 1)	320	+/-	ND	ND
1	320	+/-	-	-
2	160	+/-	-	-
3	80	+/-	-	-
4	20	-	-	-
6	10	-	-	-
8	<10	-	-	-
10	10	-	-	-
12	<10	-	-	-
14	<10	-	-	-
16	<10	-	-	-
18	<10	-	-	-
20	<10	-	-	-
24	<10	-	-	-
28	<10	-	-	-
32	<10	-	-	-
36	<10	-	-	-
40	<10	-	-	-
44	<10	-	-	-
48	<10	-	-	-

Tieto pozorovania sú prvým priamym dôkazom tohto, že neutralizačná protilátka proti slučke V3 vírusu HIV-1 môže v neprítomnosti ďalšej imunologickej odpovede, špecifickej pre vírus zabrániť vzniku trvalej infekcie HIV-1.

Poznámky k tabuľke XI:

a Vysvetlenie je rovnaké ako v poznámkach k tabuľke X

b Titer protilátky bol stanovený za použitia séra, ktoré bolo odobrané okamžite po podaní Cbetal, ako je opísané v texte. Titer neutralizačných protilátok pred podaním Cbetal bol nižší než 10.

Príklad 14

Izolácia HIV

Izolácia vírusu bola uskutočnená tak, že PBMC šimpanza boli pestované in vitro pomocou štyroch metód:

1) PBMC šimpanzov boli pestované súčasne s rovnakým počtom mitogénom aktivovaných ľudských PBMC v živnom prostredí s obsahom IL-2 a DEAE-dextránu.
2) PBMC šimpanzov bola aktivované za použitia fytohemaglutinínu PHA a potom pestované ako v odstavci 1).
3) PBMC šimpanzov boli stimulované PHA a potom boli pestované samy o sebe v prostredí s obsahom IL-2.
4) PBMC šimpanzov boli pestované súčasne s rovnakým počtom aktivovaných ľudských PBMC v prostredí, ktoré bolo doplnené PHA a IL-2.

V každom z týchto prípadov obsahovali kultúry 1 x 10 buniek šimpanzov v objeme 10 ml. Kultúry boli inkubované pri teplote 37 °C v atmosfére s 5 % oxidu uhličitého celkom 4 týždne. Potom boli supernatanty podrobené skúškam na prítomnosť antigénu p24 HIV-1 v týždenných intervaloch. Rast vírusu, stanovený ktoroukoľvek z uvedených metód bol považovaný za pozitívnu izoláciu vírusu.

Príklad 15

Detekcia nukleovej kyseliny HIV pomocou PCR

Prítomnosť nukleových kyselín, špecifických pre PBMC šimpanzov bola stanovená pomocou PCR-reakcie. DNA bola získaná z PBMC inkubáciou vzoriek buniek v 10 mM tris HCl s pH 8,3, 1,0 mM EDTA s pH 8,0, 0,5 % SDS, 150 mikrogramov/ml proteinázy K celkom 60 minút pri teplote 60 °C. Po extrakcii zmesou fenolu a chloroformu bola DNA zrážaná etanolom. Po PCR-reakcii bolo použitých 1 až 3 mikrogramov DNA. Každá z reakčných zmesí obsahovala okrem DNA ešte 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM tris HCl s pH 8,3, 50 mM KCl, 0,032 mM každého z dNTP, 50 ng každého priméru a 1,0 jednotiek Taq-polymerázy. Pre PCR-reakciu bolo použitých vždy 1,5 mikromolu DNA. Pokiaľ ide o priméry, bol použitý špecifický pár primérov SK38/39 pre HIV-1 gag. Bolo vykonaných 35 reakčných cyklov, pri každom cykle bolo uskutočnené na 1,5 minúty zohriatie na 94 °C a potom na 3 minútu zohriatie na 56 °C. Po skončení reakcie bol amplifikovaný produkt preukázaný hybridizáciou za použitia sondy SK19. Citlivosť PCR-skúšky bola stanovená ako 10 špecifických kópií HIV-1 na vzorku DNA.

Príklad 16

Neutralizácia infektivity HIV in vitro ľudskými monoklonálnymi protilátkami

Na neutralizačné testy s lymfotrópnymi a lymfocytolytickými izolátmi na bunkách MT-4 bolo použité vždy dvojnásobné riedenie protilátok, pre každé vyhĺbenie bolo použitých 100 mikrolitrov riedenia. Do každého vyhĺbenia bo pridaných 100 mikrolitrov riedenia zásobného vírusu a zmes vírusu a protilátky bola inkubovaná 1 hodinu pri 37 °C a potom bolo pridaných do každého vyhĺbenia 1 x 10^4 buniek MT-4 v 50 mikrolitroch živného prostredia. Kultúry boli inkubované 7 dní, potom bol stanovený koncový neutralizačný bod pre protilátku ako posledné riedenie, ktoré zabránilo uhynutiu buniek MT-4. Neinfikované bunky boli pestované pri každej skúške a vždy bola vykonávaná retitrácia zásobného vírusu. Neutralizačné skúšky na izoláte SF-162 boli vykonané na pri-

márnych kultúrach makrofágov a monocytov. Zásobný materiál SF-162 v riedení 1:10 bol zmiešaný so sériovým riedením protilátky vždy v dvojnásobnom nasledujúcom riedení a po inkubácii 1 hodinu pri 37 °C bola zmes pridaná do vyhĺbenia platne s obsahom 3 x 10^5 buniek. V každom teste bola vykonaná aj skúška s ľudským pozitívnym sérom s vysokým neutralizačným titrom a s negatívnym ľudským sérom a s bunkami, ktoré boli infikované, v neprítomnosti protilátky alebo séra. Ku kultúram mokrofágov a monocytov bolo pridané čerstvé prostredie v dňoch 5, 8, 12, 14 a 21 po infekcii. V dňoch 18, 21 a 24 bolo odobrané prostredie na p24 ELISA (Coulter Immunology) na stanovenie produkcie vírusu. Okrem toho boli kultúry rozrušené v 24-tom dni na stanovenie produkcie vírusu. Okrem toho boli kultúry rozrušené v 24-tom dni na stanovenie vírusu v bunkách skúškou ELISA. Koncový bod neutralizácie bol určený ako posledné riedenie, ktoré zabránilo infekcii, dôkaz bol vykonaný neprítomnosťou p24. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke XII.

T a b u ľ k a XII

HIV-1 izolát	reťazec 4.	reťazec slučky V3	Koncový bod neutralizácie (µg/ml), geometrický priemer a uhynutie buniek MT-4 (rozmedzie)
IIIB	27	TRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIG	1,29 (0,39-1,56)
MN	28	YNKRKRIHIGPGRAFYTTKNII	0,37 (0,04-0,78)
AL-1	29	IYRKGRIHIGPGRAFHTTRQII	0,15 (0,09-0,19)
SF-2	30	NNTRKSIYIGPGRAFHTTGRII	0,04 (0,04)
DU 6587-5	31	SNVRNRIHIGPGRAFHTTKRIT	0,62 (0,39-0,78)
WMJ-2	32	NNVRRSLSIGPGRAFRTREIIG	1,35 (0,78-1,56)
DU 7887-7	33	NNTSRGIRIGPGRAILATERII	0,78 (0,78)
RF	34	NNTRKSITKGPGRVIYATGQII	0,62 (0,39-0,78)
			Koncový bod neutralizácie v kultúre monocytov a makrofágov
SF-162	35	NNTRKSITIGPGRAFYATGDII	1,98 (1,25-2,50)

Údaje o reťazcoch

1) Všeobecné informácie:

i) Prihlasovateľ: Emini Emilio
Conley Anthony
Mark George
Johnson L. Syd
Pfarr David

ii) Názov vynálezu: Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV, kazeta na expresiu, hostiteľská bunka a farmaceutický prostriedok proti HIV

iii) Počet reťazcov: 59

iv) Adresa na korešpondenciu:

A) adresát: Merck and Co., Inc.
B) ulica: 126 E. Lincoln Ave
C) mesto: Rahway
D) štát: New Jersey
E) zem: USA
F) ZIP: 07065

v) Forma, odčítateľná počítačom:

A) typ prostredia: Floppy disk
B) počítač: IBM PC-kompatibilné
C) operačný systém: PC-DOS/MS-DOS
D) Software: Patent In Release č. 1.0, verzia č. 1.25

vi) Údaje o predmetnej prihláške:

A) číslo PV: PV 2396-94
B) dátum prihlásenia: 30.9.1994
C) klasifikácia

vii) Údaje o zástupcovi pôvodnej prihlášky PCT:

A) meno: Wallen III, John V.
B) č. registrácie: P-35,403
C) č. spisu: 18709

xi) Telekomunikačná informácia:

A) telefón: (908) 594-3905

2) Informácia o reťazci č. 1

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 24 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 1

Nle Cys Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile Gly Pro Gly Arg Ala
1 5 10
Phe Tyr Thr Thr Lys Asn Ile Ile Gly Cys
15 20

2) Informácia o reťazci č. 2

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 23 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 2

Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala
1 5 10
Phe Tyr Thr Thr Lys Asn Ile Ile Gly
15 20

2) Informácia o reťazci č. 3

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 8 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 3

Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr
1 5

2) Informácia o reťazci č. 4
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 7 aminokyselín
B) druh reťazca: reťazec aminokyselín
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly: peptid
xi) opis reťazca č. 4

Arg Lys Arg Ile His Ile Gly
1 5

2) Informácia o reťazci č. 5
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 6 aminokyselín
B) druh reťazca: reťazec aminokyselín
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly: peptid
xi) opis reťazca č. 5

His Ile Gly Pro Gly Arg
1 5

2) Informácia o reťazci č. 6
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 6 aminokyselín
B) druh reťazca: reťazec aminokyselín
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly: peptid
xi) opis reťazca č. 6

Tyr Asn Lys Arg Lys Arg
1 5

2) Informácia o reťazci č. 7
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 6 aminokyselín
B) druh reťazca: reťazec aminokyselín
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly: peptid
xi) opis reťazca č. 7

Asn Lys Arg Lys Arg Ile
1 5

2) Informácia o reťazci č. 8
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 6 aminokyselín
B) druh reťazca: reťazec aminokyselín
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly: peptid
xi) opis reťazca č. 8

Lys Arg Lys Arg Ile His
1 5

2) Informácia o reťazci č. 9
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 6 aminokyselín
B) druh reťazca: reťazec aminokyselín
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly: peptid
xi) opis reťazca č. 9
Arg Lys Arg Ile His Ile
1 5

2) Informácia o reťazci č. 10

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 10

Lys Arg Ile His Ile Gly
1 5

2) Informácia o reťazci č. 11

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 11

Arg Ile His Ile Gly Pro
1 5

2) Informácia o reťazci č. 12

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 12

Ile His Ile Gly Pro Gly
1 5

2) Informácia o reťazci č. 13

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 13

His Ile Gly Pro Gly Arg
1 5

2) Informácia o reťazci č. 14

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 14

Ile Gly Pro Gly Arg Ala
1 5

2) Informácia o reťazci č. 15

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 15

Gly Pro Gly Arg Ala Phe
1 5

2) Informácia o reťazci č. 16

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 16

Pro Gly Arg Ala Phe Tyr
1 5

2) Informácia o reťazci č. 17

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 17

Gly Arg Ala Phe Tyr Thr
1 5

2) Informácia o reťazci č. 18

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 18

Arg Ala Phe Tyr Thr Thr
1 5

2) Informácia o reťazci č. 19

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 19

Ala Phe Tyr Thr Thr Lys
1 5

2) Informácia o reťazci č. 20

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 20

Phe Tyr Thr Thr Lys Asn
1 5

2) Informácia o reťazci č. 21

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 21

Tyr Thr Thr Lys Asn Ile
1 5

2) Informácia o reťazci č. 22

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 22

Thr Thr Lys Asn Ile Ile
1 5

2) Informácia o reťazci č. 23

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 6 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 23

Thr Lys Asn Ile Ile Gly
1 5

2) Informácia o reťazci č. 24

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 5 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 24

Lys Arg Ile His Ile
1 5

2) Informácia o reťazci č. 25

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 4 aminokyseliny

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 25

Gly Pro Gly Arg
1

2) Informácia o reťazci č. 26

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 15 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 26

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

Thr Thr
15

2) Informácia o reťazci č. 27

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 22 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 27

Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg
1 5 10

Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile Gly
15 20

2) Informácia o reťazci č. 28

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 22 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 28

```
Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg
1               5                   10
Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn Ile Ile
    15                  20
```

2) Informácia o reťazci č. 29

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 22 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 29

```
Ile Tyr Arg Lys Gly Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg
1               5                   10
Ala Phe His Thr Thr Arg Gln Ile Ile
    15                  20
```

2) Informácia o reťazci č. 30

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 22 aminokyselín

B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly: peptid

xi) opis reťazca č. 30

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Tyr Ile Gly Pro Gly Arg
1 5 10
Ala Phe His Thr Thr Gly Arg Ile Ile
15 20

2) Informácia o reťazci č. 31
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 22 aminokyselín
B) druh reťazca: reťazec aminokyselín
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly: peptid
xi) opis reťazca č. 31

Ser Asn Val Arg Asn Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg
1 5 10
Ala Phe His Thr Thr Lys Arg Ile Thr
15 20

2) Informácia o reťazci č. 32
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 22 aminokyselín
B) druh reťazca: reťazec aminokyselín
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly: peptid
xi) opis reťazca č. 32

Asn Asn Val Arg Arg Ser Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg
1 5 10
Ala Phe Arg Thr Arg Glu Ile Ile Gly
15 20

2) Informácia o reťazci č. 33
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 22 aminokyselín
B) druh reťazca: reťazec aminokyselín

C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly: peptid
xi) opis reťazca č. 33

Asn Asn Thr Ser Arg Gly Ile Arg Ile Gly Pro Gly Arg
1 5 10
Ala Ile Leu Ala Thr Glu Arg Ile Ile
15 20

2) Informácia o reťazci č. 34
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 22 aminokyselín
B) druh reťazca: reťazec aminokyselín
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly: peptid
xi) opis reťazca č. 34

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Thr Lys Gly Pro Gly Arg
1 5 10
Val Ile Tyr Ala Thr Gly Gln Ile Ile
15 20

2) Informácia o reťazci č. 35
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 22 aminokyselín
B) druh reťazca: reťazec aminokyselín
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly: peptid
xi) opis reťazca č. 35

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Thr Ile Gly Pro Gly Arg
1 5 10
Ala Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile
15 20

2) Informácia o reťazci č. 36
   i) charakteristika reťazca:
      A) dĺžka: 30 párov báz
      B) druh reťazca: nukleová kyselina
      C) typ reťazca: jednoduchý
      D) topológia: lineárna
   ii) typ molekuly:cDNA
   xi) opis reťazca č. 36

CGGAATTCAG GTGCAGCTGC AGCAGTCTGG

2) Informácia o reťazci č. 37
   i) charakteristika reťazca:
      A) dĺžka: 37 párov báz
      B) druh reťazca: nukleová kyselina
      C) typ reťazca: jednoduchý
      D) topológia: lineárna
   ii) typ molekuly:cDNA
   xi) opis reťazca č. 37

CCGAATTCGC GGCCGCACTC ATTTACCCGG AGACAGG

2) Informácia o reťazci č. 38
   i) charakteristika reťazca:
      A) dĺžka: 42 párov báz
      B) druh reťazca: nukleová kyselina
      C) typ reťazca: jednoduchý
      D) topológia: lineárna
   ii) typ molekuly:cDNA
   xi) opis reťazca č. 38

GGCGTCGACT CACCATGGCC GGCTCCCCTC TCYTCCTCACC C

2) Informácia o reťazci č. 39
   i) charakteristika reťazca:
      A) dĺžka: 34 párov báz
      B) druh reťazca: nukleová kyselina

C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly:cDNA
xi) opis reťazca č. 39

CCGAATTCGC GGCCGCCTAT GAACATTCTG TAGG

2) Informácia o reťazci č. 40
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 39 párov báz
B) druh reťazca: nukleová kyselina
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly:cDNA
xi) opis reťazca č. 40

GATCCTCGAG GATTCTAGAA GGGTCAGATC TCGGTGTTG

2) Informácia o reťazci č. 41
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 30 párov báz
B) druh reťazca: nukleová kyselina
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly:cDNA
xi) opis reťazca č. 41

GATCGAATTC CTGGGATCCT GCAGCTCTAG

2) Informácia o reťazci č. 42
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 43 párov báz
B) druh reťazca: nukleová kyselina
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly:cDNA
xi) opis reťazca č. 42

TTACTCGAGA CGCGTACTAG TGAGCTTGCT ACAAGGGACT TTC

2) Informácia o reťazci č. 43
   i) charakteristika reťazca:
      A) dĺžka: 30 párov báz
      B) druh reťazca: nukleová kyselina
      C) typ reťazca: jednoduchý
      D) topológia: lineárna
   ii) typ molekuly:cDNA
   xi) opis reťazca č. 43

ATTTCTAGAA AGCTTTATTG AGGCTTAAGC

2) Informácia o reťazci č. 44
   i) charakteristika reťazca:
      A) dĺžka: 30 párov báz
      B) druh reťazca: nukleová kyselina
      C) typ reťazca: jednoduchý
      D) topológia: lineárna
   ii) typ molekuly:cDNA
   xi) opis reťazca č. 44

TATACTCGAG CAGACACTGG ACGCTGAACC

2) Informácia o reťazci č. 45
   i) charakteristika reťazca:
      A) dĺžka: 35 párov báz
      B) druh reťazca: nukleová kyselina
      C) typ reťazca: jednoduchý
      D) topológia: lineárna
   ii) typ molekuly:cDNA
   xi) opis reťazca č. 45

TATATGATCA GAATTCGCCC GGGAAGTATG TACAG

2) Informácia o reťazci č. 46
   i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 1380 párov báz
B) druh reťazca: nukleová kyselina
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly:cDNA

xi) opis reťazca č. 46

GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTAAAGC CTGGGGGGTC CCTCAGACTC

ACCTGTGTAG CCTCTGGTTT CACGTTCAGT GATGTCTGGC TGAACTGGGT CCGCCAGGCT

CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCGGCCGT ATTAAAAGCA GAACTGATGG TGGGACAACA

GACTACGCTG CATCCGTGAA AGGCAGATTC ACCATCTCAA GAGATGACTC AAAAAACACG

CTATATCTGC AAATGAATAG CCTGAAAACA GAGGACACAG CCGTTTATTC CTGCACCACA

GATGGTTTTA TTATGATTCG GGGAGTCTCC GAGGACTACT ACTACTACTA CATGGACGTT

TGGGGCAAAG GGACCACGGT CACCGTGAGC TCAGCCTCCA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC

CCCCTGGCAC CCTCCTCCAA GAGCACCTCT GGGGGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC

AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG TCGTGGAACT CAGGCGCCCT GACCAGCGGC

GTGCACACCT TCCCGGCTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG

ACCGTGCCCT CCAGCAGCTT GGGCACCCAG ACCTACATCT GCAACGTGAA TCACAAGCCC

AGCAACACCA AGGTGGACAA GAAAGTTGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC

CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA

CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG

AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT

GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC

ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA

GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA

CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC

TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG

CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC

TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC

GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT

2) Informácia o reťazci č. 47

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 654 párov báz

B) druh reťazca: nukleová kyselina

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly:cDNA

xi) opis reťazca č. 47

CAGTCTGTGT TGACGCAGCC GCCCTCAGTG TCTGCGGCCC CAGGACAGAA GGTCACCATC

TCCTGCTCTG GAAGCAGCTC CAACATTGGG AATAATTATG TATTGTGGTA CCAGCAGTTC

CCAGGAACAG CCCCCAAACT CCTCATTTAT GGCAATAATA AGCGACCCTC AGGGATTCCT

GACCGATTCT CTGGCTCCAA GTCTGGCACG TCAGCCACCC TGGGCATCAC CGGACTCCAG

ACTGGGGACG AGGCCGATTA TTTCTGCGCA ACATGGGATA GCGGCCTGAG TGCTGATTGG

GTGTTCGGCG GAGGGACCAA GCTGACCGTC CTAAGTCAGC CCAAGGCTGC CCCCTCGGTC

ACTCTGTTCC CGCCCTCCTC TGAGGAGCTT CAAGCCAACA AGGCCACACT GGTGTGTCTC

ATAAGTGACT TCTACCCGGG AGCCGTGACA GTGGCCTGGA AGGCAGATAG CAGCCCCGTC

AAGGCGGGAG TGGAGACCAC CACACCCTCC AAACAAAGCA ACAACAAGTA CGCGGCCAGC

AGCTATCTGA GCCTGACGCC TGAGCAGTGG AAGTCCCACA GAAGCTACAG CTGCCAGGTC

ACGCATGAAG GGAGCACCGT GGAGAAGACA GTGGCCCCTA CAGAATGTTC ATAG

2) Informácia o reťazci č. 48

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 54 párov báz

B) druh reťazca: nukleová kyselina

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly:cDNA

xi) opis reťazca č. 48

CATTCGCTTA CCCTGCAGAA GCTTGTTGAC TAGTGAGATC

ACAGTTCTCT CTAC

2) Informácia o reťazci č. 49
   i) charakteristika reťazca:
      A) dĺžka: 19 párov báz
      B) druh reťazca: nukleová kyselina
      C) typ reťazca: jednoduchý
      D) topológia: lineárna
   ii) typ molekuly:cDNA
   xi) opis reťazca č. 49

GGAGTGGACA CCTGTGGAG

2) Informácia o reťazci č. 50
   i) charakteristika reťazca:
      A) dĺžka: 19 párov báz
      B) druh reťazca: nukleová kyselina
      C) typ reťazca: jednoduchý
      D) topológia: lineárna
   ii) typ molekuly:cDNA
   xi) opis reťazca č. 50

GGTGAGTCCT TACAACCTC

2) Informácia o reťazci č. 51
   i) charakteristika reťazca:
      A) dĺžka: 44 párov báz
      B) druh reťazca: nukleová kyselina
      C) typ reťazca: jednoduchý
      D) topológia: lineárna
   ii) typ molekuly:cDNA
   xi) opis reťazca č. 51

GAATGTGCCT ACTTTCTAGA CTCGAGTATA AATCTCTGGC CATG

2) Informácia o reťazci č. 52
   i) charakteristika reťazca:
      A) dĺžka: 39 párov báz
      B) druh reťazca: nukleová kyselina

C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly:cDNA
xi) opis reťazca č. 52

CTCCACAGGT GTCCACTCCG AGGTGCAGCT GGTGGAGTC

2) Informácia o reťazci č. 53
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 39 párov báz
B) druh reťazca: nukleová kyselina
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly:cDNA
xi) opis reťazca č. 53

GAGGTTGTAA GGACTCACCT GAGCTCACGC TGACCGTGG

2) Informácia o reťazci č. 54
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 54 párov báz
B) druh reťazca: nukleová kyselina
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly:cDNA
xi) opis reťazca č. 54

CATTCGCTTA CCCTGCAGAA GCTTGTTGAC TAGTGAGATC
ACAGTTCTCT CTAC

2) Informácia o reťazci č. 55
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 19 párov báz
B) druh reťazca: nukleová kyselina
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly:cDNA

xi) opis reťazca č. 55

GGAGTGGACA CCTGTGGAG

2) Informácia o reťazci č. 56
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 39 párov báz
B) druh reťazca: nukleová kyselina
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly:cDNA
xi) opis reťazca č. 56

CTCCACAGGT GTCCACTCCC AGTCTGTGTT GACGCAGCC

2) Informácia o reťazci č. 57
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 79 párov báz
B) druh reťazca: nukleová kyselina
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly:cDNA
xi) opis reťazca č. 57

GAATGTGCCT ACTTTCTAGA CTCGAGAACT GAGGAAGCAA
AGTTTAAATT CTACTCACGA CTTAGGACGG TCAGCTTGG

2) Informácia o reťazci č. 58
i) charakteristika reťazca:
A) dĺžka: 18 párov báz
B) druh reťazca: nukleová kyselina
C) typ reťazca: jednoduchý
D) topológia: lineárna
ii) typ molekuly:cDNA
xi) opis reťazca č. 58

CATTCGCTTA CCCTGCAG

2) Informácia o reťazci č. 59

i) charakteristika reťazca:

A) dĺžka: 19 párov báz

B) druh reťazca: nukleová kyselina

C) typ reťazca: jednoduchý

D) topológia: lineárna

ii) typ molekuly:cDNA

xi) opis reťazca č. 59

GAATGTGCCT ACTTTCTAG

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV alebo jej fragment, ktorý neutralizuje aspoň dva izoláty serotypov HIV.

2. Rekombinantná ľudská protilátka alebo jej fragment podľa nároku 1, neutralizujúci aspoň dva izoláty HIV-1 zo skupiny IIIB, MN, AL-1, SF-2, WMJ-2, RF, DU 6587-5 a DU 7887-7.

3. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV alebo jej fragment podľa nároku 1, so schopnosťou sa viazať na neutralizačný epitop gp120 HIV-1.

4. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV alebo jej fragment podľa nároku 3, so schopnosťou sa viazať na neutralizačný epitop slučky V3 gp120 HIV-1.

5. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV-1 alebo jej fragment podľa nároku 4, so schopnosťou sa viazať na reťazec GPXR, v ktorom X znamená akúkoľvek aminokyselinu, v slučke V3 neutralizačného epitopu gp120 HIV.

6. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV-1 alebo jej fragment podľa nároku 5, so schopnosťou sa viazať na reťazec aminokyselín GPGR slučky V3 neutralizačného epitopu gp120 HIV.

7. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV-1 alebo jej fragment neutralizujúci izoláty IIIB, MN, AL-1, SF-2, WMJ-2, RF, DU 6587-5 a DU 7887-7 HIV-1.

8. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV alebo jej fragment podľa nároku 7, so schopnosťou sa viazať na neutralizačný epitop gp120 HIV-1.

9. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV alebo jej fragment podľa nároku 8, so schopnosťou sa viazať na slučku V3 neutralizačného epitopu gp120 HIV-1.

10. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV alebo jej fragment podľa nároku 9, so schopnosťou sa viazať na reťazec aminokyselín GPXR, v ktorom X znamená akúkoľvek aminokyselinu v slučke V3 neutralizačného epitopu gp120 vírusu HIV-1.

11. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV alebo jej fragment podľa nároku 10, so schopnosťou sa viazať na reťazec aminokyselín GPGR slučky V3 neutralizačného epitopu gp120 HIV-1.

12. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV alebo jej fragment s dlhým reťazcom IgG a so schopnosťou neutralizovať izoláty IIIB, MN, AL-1, SF-2, WMJ-2, RF, DU 6587-5 a DU 7887-7 HIV-1.

13. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV alebo jej fragment podľa nároku 12 s dlhým reťazcom protilátky IgG3 a so schopnosťou neutralizovať izoláty IIIB, MN, AL-1, SF-2, WMJ-2, DU 6587-5 a DU 7887-7 serotypov HIV-1.

14. Rekombinantná ľudská protilátka proti HIV alebo jej fragment podľa nároku 13, kde oblasť dlhého reťazca podskupiny IgG je geneticky modifikovaná na oblasť podskupiny IgG1 a protilátka neutralizuje izoláty IIIB, MN, AL-1, SF-2, WMJ-2, DU 6587-5 a DU 7887-7 serotypov HIV-1.

15. Kazeta na expresiu, obsahujúca reťazec promótora, celý kód ORF alebo jeho časť pre variabilnú oblasť krátkeho reťazca alebo dlhého reťazca protilátky, neutralizujúca HIV, pričom táto protilátka neutralizuje aspoň dva serotypy HIV a príslušný reťazec na ukončenie transkripcie.

16. Kazeta na expresiu podľa nároku 15, kde ORF je kódom pre variabilnú oblasť krátkeho reťazca alebo dlhého reťazca protilátky, neutralizujúca HIV-1, pričom táto protilátka neutralizuje aspoň dva serotypy HIV-1.

17. Kazeta na expresiu podľa nároku 16, v ktorej ORF je kódom pre variabilnú oblasť krátkeho reťazca alebo dlhého reťazca protilátky 447-52D.

18. Kazeta na expresiu, obsahujúca reťazec promótora, prvý ORF s kódovým reťazcom pre krátky reťazec a druhý ORF s kódovým reťazcom pre dlhý reťazec protilátky, neutralizujúca HIV-1, a okrem toho príslušný reťazec terminátora transkripcie.

19. Kazeta na expresiu podľa nároku 18, v ktorej prvý a druhý ORF obsahujúci kódové reťazce pre krátky a dlhý reťazec protilátky, neutralizujúca HIV-1, pričom táto protilátka neutralizuje aspoň dva izoláty HIV-1.

20. Kazeta na expresiu podľa nároku 19, v ktorej druhý ORF obsahuje kódový reťazec pre dlhý reťazec IgG.

21. Kazeta na expresiu podľa nároku 20, v ktorej druhý ORF obsahuje kódový reťazec pre dlhý reťazec IgG1.

22. Kazeta na expresiu podľa nároku 19, v ktorej prvý a druhý ORF obsahujú kódové reťazce pre krátky reťazec a pre dlhý reťazec protilátky 447-52D.

23. Kazeta na expresiu podľa nároku 20, v ktorej je oblasť dlhého reťazca podskupiny IgG modifikovaná geneticky na oblasť podskupiny IgG1.

24. Hostiteľská bunka s obsahom kazety na expresiu, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že táto kazeta na expresiu obsahuje reťazec promótora, ORF s obsahom kódového re-

ťazca pre celú variabilnú oblasť krátkeho reťazca alebo dlhého reťazca protilátky, neutralizujúca HIV alebo pre časť tej variabilnej oblasti a príslušný reťazec na ukončenie transkripcie.

25. Hostiteľská bunka s obsahom dvoch kaziet na expresiu, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že každá z týchto kaziet na expresiu obsahuje reťazec promótora, ORF s obsahom kódového reťazca pre celú variabilnú oblasť krátkeho reťazca alebo dlhého reťazca protilátky, neutralizujúca HIV alebo pre časť tej variabilnej oblasti a príslušný reťazec na ukončenie transkripcie.

26. Hostiteľská bunka podľa nároku 24, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že je uložená vo verejnej zbierke kultúr American Type Culture Collection pod číslom 68945.

27. Hostiteľská bunka podľa nároku 24, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že je uložená vo verejnej zbierke kultúr American Type Culture Collection pod číslom 68943.

28. Hostiteľská bunka podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že je uložená vo verejnej zbierke kultúr American Type Culture Collection pod číslom 68944.

29. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ako svoju účinnú zložku obsahuje rekombinantnú ľudskú protilátku proti HIV alebo jej fragment, pričom táto protilátka neutralizuje aspoň dva izoláty serotypu HIV a okrem toho riedidlo alebo nosič, prijateľný z fyziologického hľadiska.

30. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 29, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje rekombinantnú ľudskú protilátku proti HIV, neutralizujúcu aspoň dva izoláty serotypov HIV-1 zo skupiny IIIB, MN, AL-1, SF-2, WMJ-2, RF, DU 6587-5 a DU 7887-7.

31. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 29, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje rekombinantnú ľudskú protilátku proti HIV alebo jej fragment, neutralizujúci izoláty serotypov HIV-1 zo skupiny IIIB, MN, AL-1, SF-2, WMJ-2, RF, DU 6587-5 a DU 7887-7 serotypov HIV-1.

32. Spôsob pasívnej ochrany proti infekcii HIV, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa jedincom, ohrozeným infekciou HIV podá rekombinantná ľudská protilátka proti HIV alebo jej fragment, neutralizujúci aspoň dva izoláty serotypov HIV.

33. Spôsob podľa nároku 32, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa podá rekombinantná ľudská protilátka proti HIV, neutralizujúca aspoň dva izoláty serotypov HIV-1 zo skupiny IIIB, MN, AL-1, SF-2, WMJ-2, RF, DU 6587-5 a DU 7887-7.

34. Spôsob podľa nároku 32, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa podá rekombinantná ľudská protilátka proti HIV, neutralizujúca izoláty serotypov HIV-1 zo skupiny IIIB, MN, AL-1, SF-2, WMJ-2, RF, DU 6587-5 a DU 7887-7 serotypov HIV-1.

35. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje dve účinné látky proti HIV, pričom prvou účinnou látkou je rekombinantná protilátka proti HIV, neutralizujúca aspoň dva izoláty HIV a druhou účinnou látkou je inhibítor HIV, odlišný od protilátky.

36. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 35, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ako inhibítor HIV, odlišný od protilátky obsahuje inhibítory HIV zo skupiny, tvorenej inhibítormi reverznej transkriptázy, inhibítormi proteinázy, inhibítormi transaktivačnej transkripcie, antimediátorové oligonukleotidy a inhibítormi priľnutia vírusu.

37. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 36, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ako inhibítor HIV odlišný od protilátky obsahuje inhibítor reverznej transkriptázy.

38. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 37, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa inhibítor reverznej transkriptázy volí zo skupiny:

3-[[(4,7-dichlórbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(4,7-dimetylbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(7-chlórbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(7-metylbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(4-fluórbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(7-fluórbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(benzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(4-chlórbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón,

3-[[(4-fluór-7-chlórbenzoxazol-2-yl)metyl]amino]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón a

3-[2-(benzoxazol-2-yl)etyl]-5-etyl-6-metyl-2-(1H)-pyridinón.

Amplifikácia dlhého reťazca cDNA z heterohybridómu 447

EcoRI PvuII

5'-CGGAATTC AGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGG-3' č.reťazca 36

EcoRI NotI

5'-CCGAATTC GCGGCCGCACTCATTTACCCGGAGACAGG-3'

č.reťazca 37

Amplifikácia krátkeho reťazca cDNA z heterohybridómu 447

SalI NcoI NaeI

5'-GGCGTCGAC TCACCATG GCCGGCTCCCCTCTC(C/T)TCCTCACCC-3'

EcoRI NotI č.reťazca 38

5'-CCGAATTC GCGGCCGC CTATGAACATTCTGTAGG-3' č.reťazca 39

Amplifikácia konštantnej oblasti lambda

XhoI XbaI

C1 5'-GATCCTCGAG GATTCTAGA AGGGTCAGATGTCGGTGTTG-3'

EcoRI BamHI č.reťazca 40

C2 5'-GATCGAATTC CTGGGATCC TGCAGCTCTAG-3' č.reťazca 41

Amplifikácia fragmentu -117 až +80 HIV-1 LTR

XhoI MluI SpeI

5'-TTACTCGAG ACGCGT ACTAGT GAGCTTGCTACAAGGGACTTTC-3'

XbaI HindIII AflII č.reťazca 42

5'-ATTTCTAGA AAGCTT TATTGAGGCTTAAG C-3' č.reťazca 43

Amplifikácia konštantnej oblasti gama 1

XhoI

G1 5'-TATACTCGAG CAGACACTGGACGCTGAACC-3' č.reťazca 44

BclI EcoRI XmaI

G2 5'-TATATGATCA GAATTC GCCCGGG AAGTATGTACAG-3' č.reťazca 45

Obr. 1

```
                10                  30                  50
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTCAGACTC
GluValGlnLeuValGluSerGlyGlyGlyLeuValLysProGlyGlySerLeuArgLeu
                70                  90                  110
ACCTGTGTAGCCTCTGGTTTCACGTTCAGTGATGTCTGGCTGAACTGGGTCCGCCAGGCT
ThrCysValAlaSerGlyPheThrPheSerAspValTrpLeuAsnTrpValArgGlnAla
                130                 150                 170
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGCCGTATTAAAAGCAGAACTGATGGTGGGACAACA
ProGlyLysGlyLeuGluTrpValGlyArgIleLysSerArgThrAspGlyGlyThrThr
                190                 210                 230
GACTACGCTGCATCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGACTCAAAAAACACG
AspTyrAlaAlaSerValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspAspSerLysAsnThr
```

Obr. 2 Al

PV 1168-98

250 270 290

CTATATCTGCAAATGAATAGCCTGAAAACAGAGGACACAGCCGTTTATTCCTGCACCACA

LeuTyrLeuGlnMetAsnSerLeuLysThrGluAspThrAlaValTyrSerCysThrThr

310 330 350

GATGGTTTTATTATGATTCGGGGAGTCTCCGAGGACTACTACTACTACTACATGGACGTT

AspGlyPheIleMetIleArgGlyValSerGluAspTyrTyrTyrTyrTyrMetAspVal

370 390 410

TGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC

TrpGlyLysGlyThrThrValThrValSerSerAlaSerThrLysGlyProSerValPhe

430 450 470

CCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC

ProLeuAlaProSerSerLysSerThrSerGlyGlyThrAlaAlaLeuGlyCysLeuVal

Obr. 2A2

PV 1162-96

```
                490                 510                 530
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
LysAspTyrPheProGluProValThrValSerTrpAsnSerGlyAlaLeuThrSerGly
                550                 570                 590
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
ValHisThrPheProAlaValLeuGlnSerSerGlyLeuTyrSerLeuSerSerValVal
                610                 630                 650
ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
ThrValProSerSerSerLeuGlyThrGlnThrTyrIleCysAsnValAsnHisLysPro
                670                 690                 710
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGC
SerAsnThrLysValAspLysLysValGluProLysSerCysAspLysThrHisThrCys
                730                 750                 770
CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA
ProProCysProAlaProGluLeuLeuGlyGlyProSerValPheLeuPheProProLys
```


Obr. 2A3

Mez-94

Obr. 2A4

PV 1162-94

1030 1050 1070

GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA

AlaLeuProAlaProIleGluLysThrIleSerLysAlaLysGlyGlnProArgGluPro

1090 1110 1130

CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC

GlnValTyrThrLeuProProSerArgAspGluLeuThrLysAsnGlnValSerLeuThr

1150 1170 1190

TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG

CysLeuValLysGlyPheTyrProSerAspIleAlaValGluTrpGluSerAsnGlyGln

1210 1230 1250

CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC

ProGluAsnAsnTyrLysThrThrProProValLeuAspSerAspGlySerPhePheLeu

Obr. 2A5

PV 1152-94

1270 1290 1310

TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC

TyrSerLysLeuThrValAspLysSerArgTrpGlnGlnGlyAsnValPheSerCysSer

1330 1350 1370

GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

ValMetHisGluAlaLeuHisAsnHisTyrThrGlnLysSerLeuSerLeuSerProGly

AAATGA
LysEnd

Obr. 2A6

96-294 12

```
                10                  30                  50
CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCACCATC
GlnSerValLeuThrGlnProProSerValSerAlaAlaProGlyGlnLysValThrIle
                70                  90                  110
TCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATTGTGGTACCAGCAGTTC
SerCysSerGlySerSerSerAsnIleGlyAsnAsnTyrValLeuTrpTyrGlnGlnPhe
                130                 150                 170
CCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATTTATGGCAATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCCT
ProGlyThrAlaProLysLeuLeuIleTyrGlyAsnAsnLysArgProSerGlyIlePro
                190                 210                 230
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAG
AspArgPheSerGlySerLysSerGlyThrSerAlaThrLeuGlyIleThrGlyLeuGln
```

Obr. 2B1

PV 1162-94

250 270 290

ACTGGGGACGAGGCCGATTATTTCTGCGCAACATGGGATAGCGGCCTGAGTGCTGATTGG

ThrGlyAspGluAlaAspTyrPheCysAlaThrTrpAspSerGlyLeuSerAlaAspTrp

310 330 350

GTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAAGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTC

ValPheGlyGlyGlyThrLysLeuThrValLeuSerGlnProLysAlaAlaProSerVal

370 390 410

ACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTC

ThrLeuPheProProSerSerGluGluLeuGlnAlaAsnLysAlaThrLeuValCysLeu

430 450 470

ATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTC

IleSerAspPheTyrProGlyAlaValThrValAlaTrpLysAlaAspSerSerProVal

Obr. 2B2

PV 1962-94

```
                490                 510                 530
AAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC
LysAlaGlyValGluThrThrThrProSerLysGlnSerAsnAsnLysTyrAlaAlaSer
                550                 570                 590
AGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTC
SerTyrLeuSerLeuThrProGluGlnTrpLysSerHisArgSerTyrSerCysGlnVal
                610                 630                 650
ACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCATAG
ThrHisGluGlySerThrValGluLysThrValAlaProThrGluCysSerEnd
```

Obr. 2B3

PV 7462-94

VH PstI HindIII HincII/SpeI

S1 5'CATTCGCTTACCCTGCAG AAGCTT GTTG ACTAGTGAGATCACAGTTCTCTCTAC-3' č.reťazca 48
S2 5'-GGAGTGGACACCTGTGGAG-3' č.reťazca 49
I1 5'-GGTGAGTCCTTACAACCTC-3' č.reťazca 50

XbaI XhoI

I2 5'-GAATGTGCCTACTT TCTAGA CTCGAG TATAAATCTCTGGCCATG-3' č.reťazca 51
H1 5'-CTCCACAGGTGTCCACTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTC-3' č.reťazca 52
H2 5'-GAGGTTGTAAGGACTCACCTGAGCTCACGGTGACCGTGG-3' č.reťazca 53

VL PstI HindIII HincII/SpeI

S1 5'-CATTCGCTTACCCTGCAG AAGCTT GTTG ACTAGTGAGATCACAGTTCTCTCTAC-3' č.reťazca 54
S2 5'-GGAGTGGACACCTGTGGAG-3' č.reťazca 55
L1 5'-CTCCACAGGTGTCCACTCCCAGTCTGTGTTGACGCAGCC-3' č.reťazca 56

XbaI XhoI

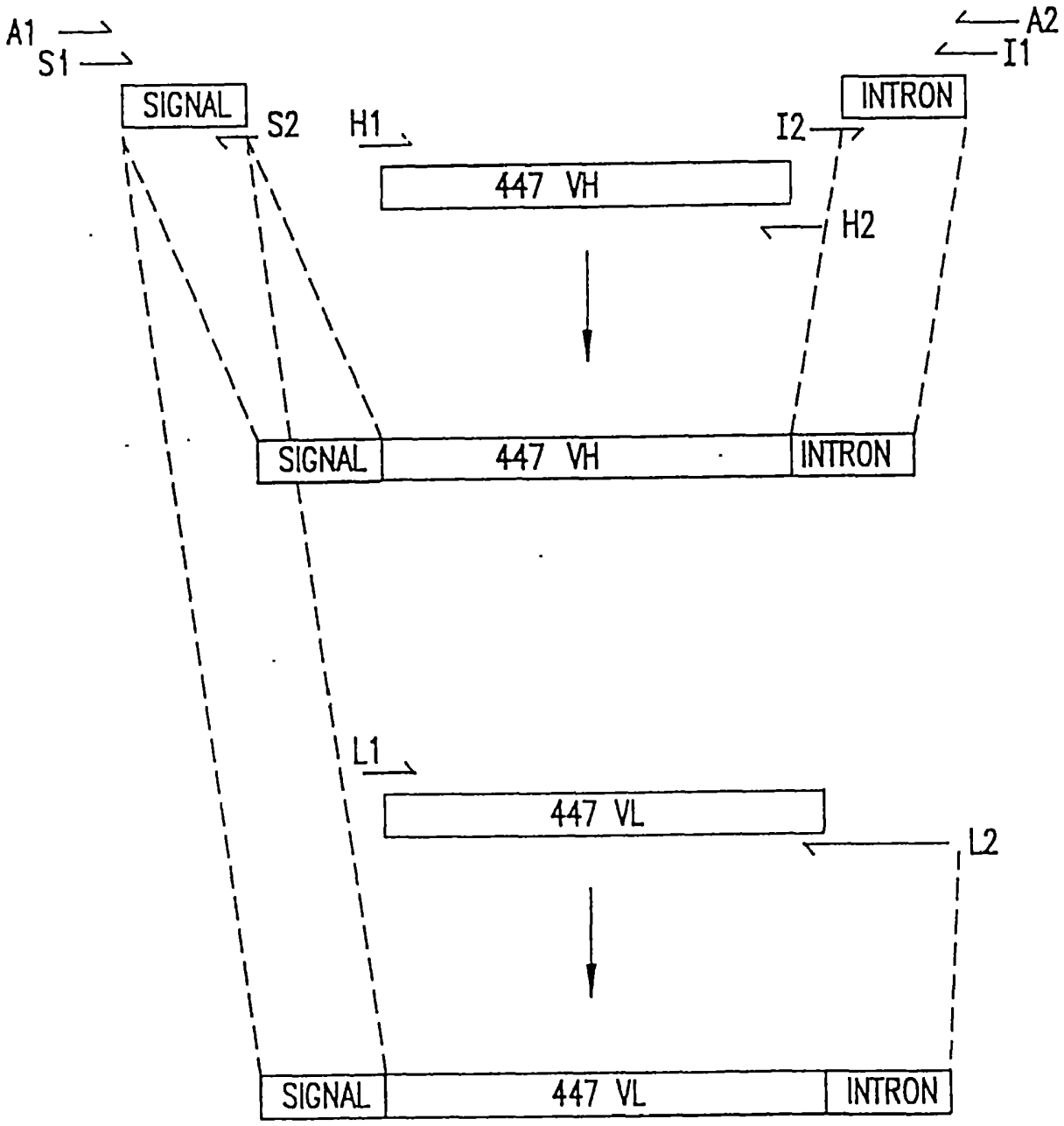
L2 5'-GAATGTGCCTACTTTCTAGA CTCGAGAACTGAGGAAGCAAAGTTTAAATTCTACT
CACGACTTAGGACGGTCAGCTTGG-3' č.reťazca 57

Koncová amplifikácia primérov

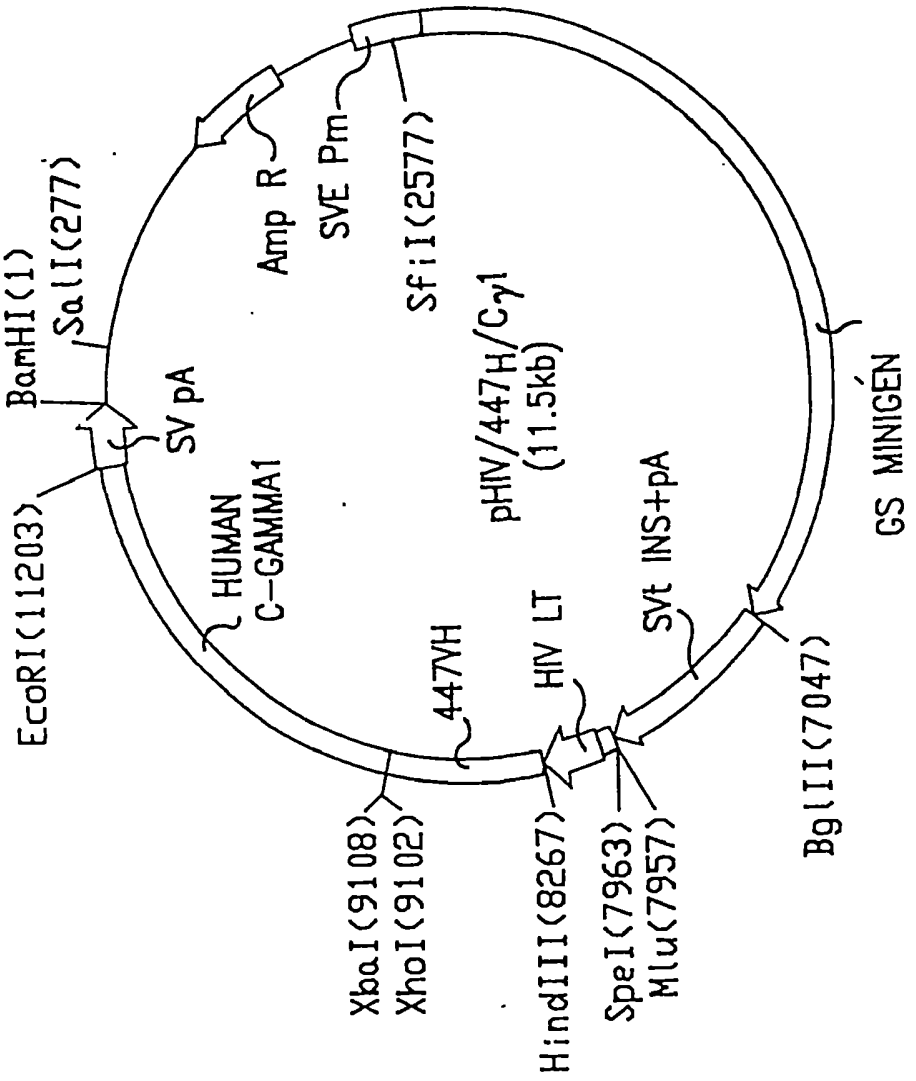
A1 5'-CATTCGCTTACCCTGCAG-3' č.reťazca 58
A2 5'-GAATGTGCCTACTTTCTAG-3' č.reťazca 59

Obr. 3

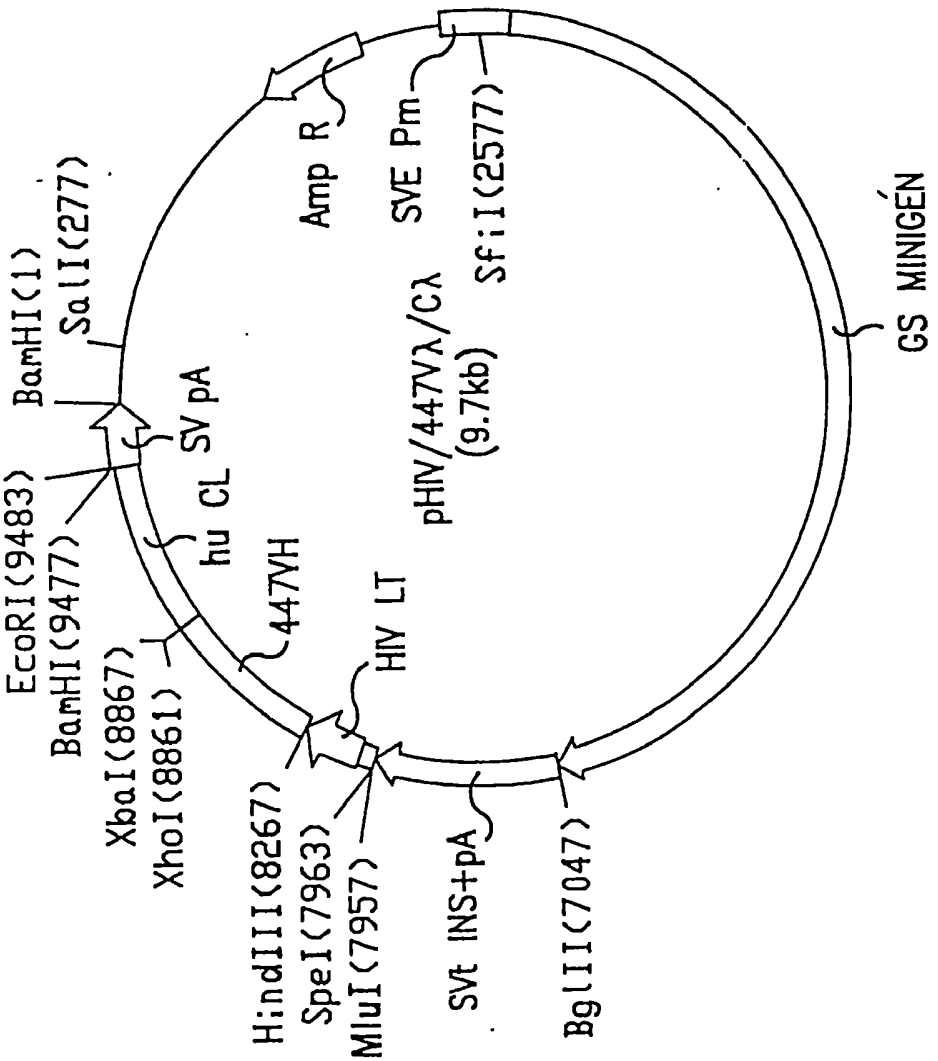
PV MC2 - 94


A1
S1
SIGNAL
S2
H1
447 VH
A2
I1
INTRON
I2
H2
SIGNAL
447 VH
INTRON
L1
447 VL
L2
SIGNAL
447 VL
INTRON

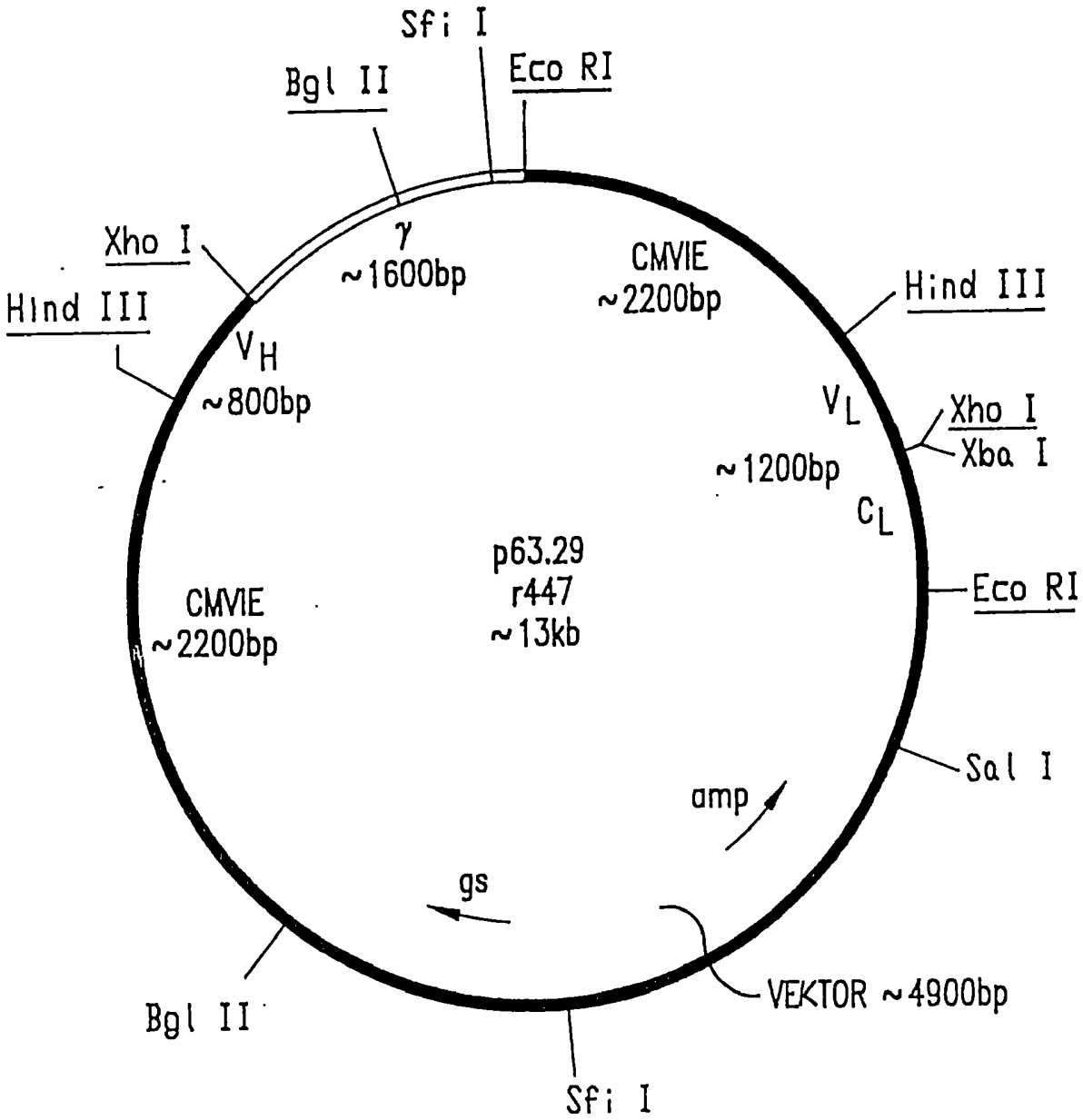
Obr. 4


BamHI(1)
SalI(277)
SV pA
HUMAN
C-GAMMA1
EcoRI(11203)
Amp R
SVE Pm
SfiI(2577)
pHIV/447H/Cγ1
(11.5kb)
447VH
HIV LT
SVt INS+pA
GS MINIGÉN
BglII(7047)
XbaI(9108)
XhoI(9102)
HindIII(8267)
SpeI(7963)
MluI(7957)

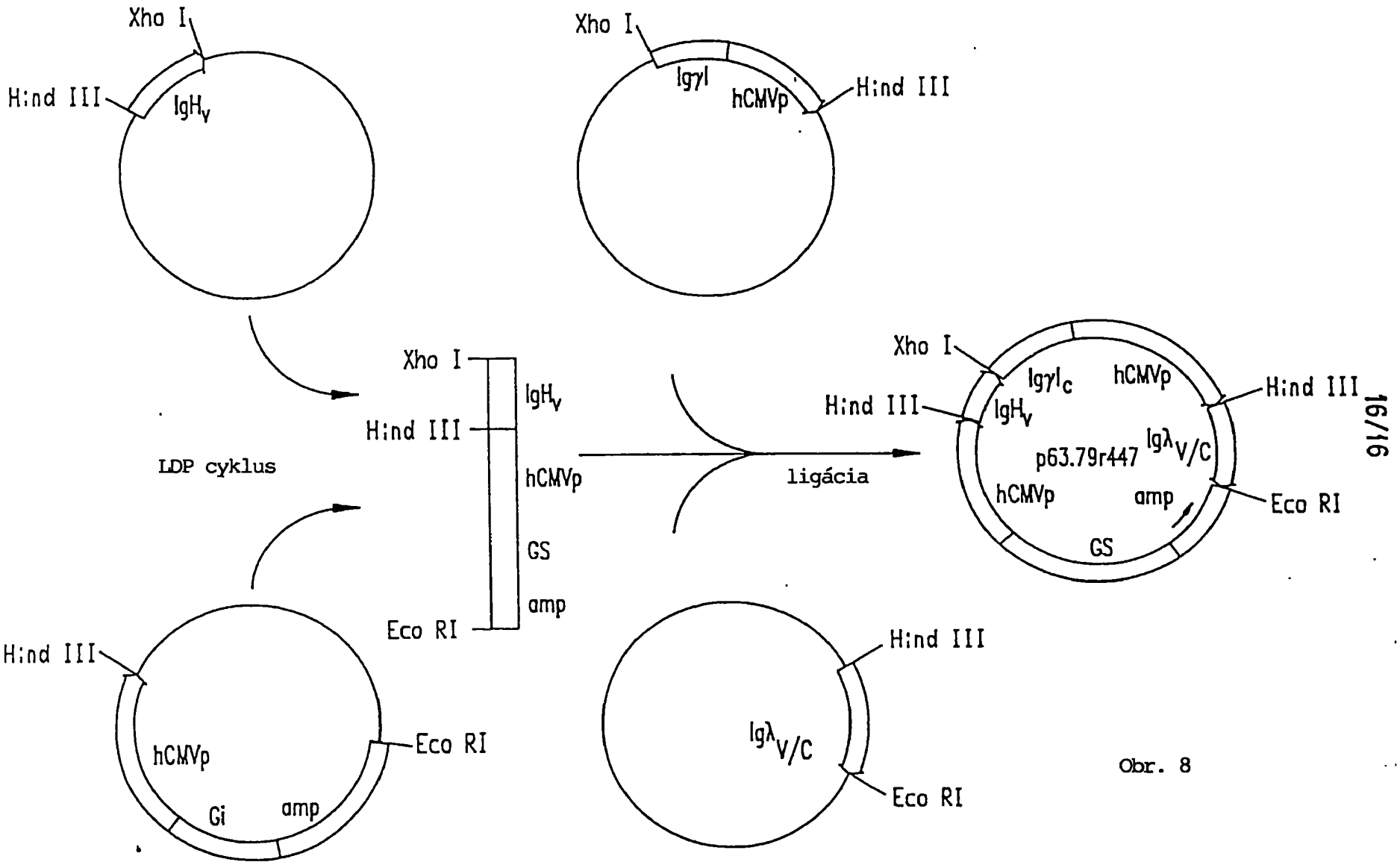
Obr. 5


Amp R
SVE Pm
Sf i I(2577)
GS MINIGÉN
pHIV/447Vλ/Cλ
(9.7kb)
SalI(277)
BamHI(1)
SV pA
hu CL
447VH
HIV LT
EcoRI(9483)
BamHI(9477)
XbaI(8867)
XhoI(8861)
HindIII(8267)
SpeI(7963)
MluI(7957)
SVt INS+pA
BglII(7047)

Obr. 6


Sfi I
Eco RI
Bgl II
γ
~1600bp
Xho I
Hind III
VH
~800bp
CMVIE
~2200bp
Hind III
VL
~1200bp
Xho I
Xba I
CL
Eco RI
p63.29
r447
~13kb
CMVIE
~2200bp
Sal I
amp
gs
VEKTOR ~4900bp
Bgl II
Sfi I

Obr. 7



Obr. 8

PV 1462-94