



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 280 118 A5

4(51) C 12 N 5/00

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 N / 306 218 4	(22)	20.08.87	(44)	27.06.90
(31)	898,273	(32)	20.08.86	(33)	US
	045,026		01.05.87		
	067,996		29.06.87		
(71)	siehe (73)				
(72)	Shriver, Mary K.; Thomas, Eilne, K.; Cosand, Wecley, L.; Gosting, Larry H.; Dickinson, Edna S.; Mc Clure, Janela (NMI); Todaro, George J.; Nowinski, Robert C., US				
(73)	Genetic Systems Corporation, Seattle, Washington 98121, US				
(74)	Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch mit einem oder mehreren neutralisierenden Bereichen von HIV reagieren				

(55) Verfahren; Herstellung; monoklonale Antikörper; Peptide; Aminosäuresequenzen; neutralisierender Bereich; Immunkomplexe; Immunoaffinitätsreinigung; Medizin; HIV-Bekämpfung; HIV-Nachweis

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die spezifisch mit einem oder mehreren neutralisierenden HIV-Bereichen reagieren. Die Herstellung der monoklonalen Antikörper erfolgt durch Immortalisierung von Antikörper-produzierenden Zelllinien und Kultivierung dieser Zelllinien. Die erfindungsgemäß erhältlichen Produkte sind in der Medizin zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung von HIV-Infektionen zur Diagnose von HIV-Infektionen brauchbar.

1

P A T E N T A N S P R Ü C H E

5

1. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper,
die spezifisch mit einem oder mehreren neutrali-
sierenden Bereichen von HIV reagieren,

10

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, d a ß
man

15

einem Wirt eine immunogen wirksame Menge eines mit
HIV-Proteinen angereicherten Antigenpräparates verab-
reicht;

20

die Produktion der spezifisch reagierenden Antikörper
im immunisierten Wirt überwacht;

die Antikörper-produzierenden Zellen aus dem Wirt
gewinnt und immortalisiert;

25

die immortalisierten Zellen, die Antikörper gegen
HIV produzieren, selektiert;

die immortalisierten Zellen für die Produktion von
Zelllinien kloniert; und

30

die Zelllinien, die in der Lage sind, Antikörper
zu produzieren, die mit einem oder mehreren neutra-
lisierenden HIV-Bereichen reagieren, kultiviert
und die Antikörper gewinnt.

35

1

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß man als HIV-Proteine rekombinante Fusionsproteine
verwendet, die von einem eukaryontischen oder bakte-
riellen Wirt exprimiert werden, oder daß die HIV-
Proteine aus einem HIV-Extrakt oder -Lysat erhältlich
sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekenn-
zeichnet, daß man eine immortalisierte Zelllinie
verwendet, die monoklonale Antikörper produziert,
welche in der Lage sind, mit einer Hüllglycoprotein-
gp110-Antigen-Determinante zu reagieren, die innerhalb
des neutralisierenden Bereiches oder blockierenden
Peptids des HIV enthalten ist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß man Antikörper erhält,
die spezifisch mit einem neutralisierenden Bereich
reagieren, der Epitope umfaßt, die in den env-
oder gag-Bereichen des HIV-Genoms kodiert sind.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß man monoklonale Antikörper
erhält, die spezifisch mit einem neutralisierenden
Bereich reagieren, der Epitope umfaßt, die auf den LAV-BRU
HIV-Proteinen gp110 oder p 25 lokalisiert sind.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß man monoklonale Antikörper
erhält, die spezifisch mit einem neutralisierenden
Bereich reagieren, der die HIV-gp110-Aminosäuresequenz
von etwa 301 bis 336 oder 308 bis 328 oder Homologe
dieser Sequenzen umfaßt.

1

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch
gekennzeichnet, daß man monoklonale Antikörper erhält,
5 die spezifisch für einen neutralisierenden Bereich
sind, der die HIV-p25-Aminosäuresequenz von etwa
278 bis 319 oder etwa 315 bis 363 oder Homologe dieser
Sequenzen umfaßt.

10

15

20

25

30

35

1

5

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung mono-
klonaler Antikörper . Diese lassen sich zu
pharmazeutischen Mitteln formulieren, welche bei der Be-
handlung, Diagnose, Neutralisierung und beim Impfen im Zu-
sammenhang mit der Behandlung von Human-Immunodeficiency
Virus (HIV)-Infektionen brauchbar sind.

15

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Das für das Acquired Immunodeficiency-Syndrom (AIDS) und
dessen prodromale Phasen, AIDS-related Complex (ARC) und das
Lymphadenopathie-Syndrom (LAS) verantwortliche infektiöse
Agens ist ein neuartiges lymphotropes Retrovirus. Dieses
Virus wurde auf verschiedene Weise bezeichnet, nämlich als
LAV, HTLV-III, ARV und neuerdings als HIV.

Seit der pandemischen Ausbreitung von HIV ist die Behandlung
infizierter Personen und die Verhütung der Übertragung auf
uninfizierte Risikogruppen von größter Wichtigkeit. Eine
Vielzahl von Behandlungsstrategien richtet sich auf unter-
schiedliche Phasen im Lebenszyclus des Virus. Sie sind in
Mitsuya und Broder, 1987, Nature 325:773 beschrieben. Eine
Möglichkeit umfaßt die Anwendung von Antikörpern, die an das
Virus binden und die Virusreplikation inhibieren, entweder
weil sie den Eintritt des Virus in die Wirtsstellen stören
oder aufgrund anderer Mechanismen. Sobald die virale
Komponente(n), die einem Eingreifen des Antikörpers unter-
liegt (en), identifiziert ist (sind), hofft man Antikörper-

1 Titer erzeugen zu können, die ausreichen, um die Infektivität
des Virus zu neutralisieren und zwar durch Impfung oder in
alternativer Weise durch passive Verabreichung von Immun-
globulinen oder monoklonalen Antikörpern der gewünschten
5 Spezifität.

Man nimmt an, daß die Hüllglykoproteine der meisten Retro-
viren mit Rezeptormolekülen an der Oberfläche der für das
Virus anfälligen Zellen reagieren und so die Virus-
10 infektivität gegenüber bestimmten Wirten bestimmen. Anti-
körper, die an die Glykoproteine binden, können die Inter-
aktion des Virus mit den Zellrezeptoren blockieren und somit
die Infektivität des Virus neutralisieren, siehe The
Molecular Biology of Tumor Viruses, 534 (J. Tooze, Hrsg.,
15 1973) und RNA Tumor Viruses, 226, 236 (R. Weiss et al,
Hrsg., 1982) auf beide Publikationen wird hiermit Bezug ge-
nommen. Man vergleiche außerdem
Gonzalez-Scarano et al., 1982, Virology 120:42 (La Crosse
Virus); Matsuno und Inouye, 1983, Infect. Immun. 39:155
20 (Neonatal Calf Diarrhea Virus); und Mathews et al., 1982,
J. Immunol., 129:2763 (Encephalomyelitis Virus).

Die allgemeine Struktur des HIV besteht in einem Ribonukleo-
proteinkern, der von einer Lipid-enthaltenden Hülle um-
25 geben ist, welche das Virus im Laufe seiner Entwicklung aus
der Membran der infizierten Wirtszelle bildet. Die viralen
kodierte Glykoproteine sind in die Hülle eingebettet und
stehen nach außen hervor. Die Hüllglykoproteine von HIV
werden ursprünglich in der infizierten Zelle als Prekursor-
30 molekül von 150.000 bis 160.000 Daltons (gp150 oder gp160)
synthetisiert und anschließend in der Zelle in ein N-terminales
Fragment von 110.000 bis 120.000 Daltons (gp 110 oder
gp 120) um das externe Glykoprotein zu erzeugen und in ein
C-terminales Fragment von 41.000 bis 46.000 Daltons
35 (gp41), das das Transmembran-Hüllglykoprotein darstellt,
überführt.

1 Aus den oben angegebenen Gründen war das gp110 HIV-Glyko-
protein Gegenstand zahlreicher Untersuchungen bezüglich
eines potentiellen Targets zur Unterbrechung des Lebens-
5 cyclus des Virus. Es wurde gezeigt, daß Sera von HIV-in-
fizierten Personen HIV in vitro neutralisieren und daß
Antikörper, die an gereinigtes gp110 binden, in den Sera vor-
liegen, Robert-Guroff et al., 1985, Nature 316:72, Weiss
et al., 1985, Nature 316:69 und Mathews et al., 1986,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:9709. Gereinigtes und
10 rekombinantes gp100 stimulierte die Produktion neutralisierender
Serumantikörper, wenn man sie zur Immunisierung Tieren verab-
reichte, Robey et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
83:7023; Lasky et al., 1986, Science 233:209; und
Zagury et al., 1986, Nature 326:249. Weiter konnte gezeigt
15 werden, daß das gp110-Molekül an den CD4 (T4)-Rezeptor
bindet und daß monoklonale Antikörper, die bestimmte
Epitope des CD4-Rezeptors erkennen, die HIV-Bindung,
Syncytiumbildung und Infektivität blockieren, McDougal et
al., 1986, Science 231:382. Putney et al. (1986, Science
20 234:1392) wiesen neutralisierende Serumantikörper in
Tieren nach Immunisierung mit einem rekombinanten Fusions-
protein nach, das die carboxyl-terminale Hälfte des gp110-
Moleküls enthielt. Sie konnten weiter zeigen, daß die
Glykosylierung des Hüllproteins für ein Ansprechen auf den
25 neutralisierenden Antikörper unnötig ist.

Es wäre deshalb wünschenswert, ein Subunit-Vakzin gegen
AIDS unter Anwendung des HIV gp110-Moleküls oder Teilen da-
von zur Verfügung zu haben. Subunit-Vakzine sind eine
30 Alternative zu Vakzinen, die aus inaktivierten oder in
ihrer Wirkung geschwächten Viren hergestellt werden. In-
aktivierte Vakzine sind problematisch, weil möglicherweise
nicht alle Viruspartikel abgetötet wurden und die in ihrer
Wirkung geschwächten Viren besitzen die Fähigkeit zu
35 mutieren und ihre krankheitsauslösende Wirkung wieder zu ge-
winnen. Bei Subunit-Vakzinen verwendet man nur diejenigen

- 1 Teile des Virus zur Immunisierung des Wirts, welche die
Antigene oder Epitope enthalten, die in der Lage sind, die
Immunantwort auszulösen, d.h. ein Ansprechen auf
neutralisierende Antikörper, ADCC und ein cytotoxisches T-
5 Zell-Ansprechen. Der Hauptvorteil von Subunit-Vakzinen liegt
darin, daß irrelevantes Virusmaterial ausgeschlossen ist.

Virale Subunits (Untereinheiten) zur Anwendung in einer
Vakzin kann man nach verschiedenen Methoden erzeugen. Bei-
10 spielsweise kann das Hüllglykoprotein von einem Bakterien-
wirt exprimiert und gereinigt werden, obwohl diesem Molekül
die meisten post-translationalen Modifikationen (wie die
Glykosylierung) oder andere Weiterverarbeitungen fehlen. Eine
derartige Modifikation kann man durch Verwendung eines
15 eukaryotischen Expressionssystems, beispielsweise Hefe oder
kultivierte Säugetierzellen, erzielen. Virale Gene wurden
in Säugetierzellen unter Verwendung von Vaccinia-Viren als
Vektor eingeführt, siehe beispielsweise Mackett, M. et al,
1982, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79:7415; D. Panicali und
20 E. Paoletti, 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79:4927.
Rekombinante Vaccinia-Viren kann man gemäß den Methoden von
Hu et al., Nature 320:537 (1986) oder Chakrabarti et al.,
Nature 320:535 (1986), auf die hiermit Bezug genommen wird,
konstruieren. In diesen Systemen werden die viralen
25 Glykoproteine, die durch Zellen erzeugt werden, welche mit
rekombinanten Vaccinia infiziert sind, in geeigneter Weise
glykosyliert. Sie können zur Extrusion und abschließenden
Isolierung an die Zelloberfläche transportiert werden.

30 Ein wichtiger Schritt in der Produktion eines Subunit-
Vakzines ist eine adequate Reinigung des gewünschten Glyko-
proteins aus der komplexen Mischung des Expressionssystems.
Hierfür sind mehrere Methoden geeignet. Dazu zählen, ohne
darauf begrenzt zu sein, die präparative Polyacrylamid-
35 Gelelektrophorese, Gelpermeations-Chromatographie, ver-

1 verschiedene Chromatographiemethoden (d.h. Ionenaustausch-,
Umkehrphasen-, Immunoaffinitäts- und hydrophobe Inter-
aktionschromatographie) und andere. Die meisten dieser
Methoden verwendet man in verschiedenen Kombinationen, um
5 im wesentlichen reine Präparate zu erhalten, siehe
D.G. Kleid et al., 1981, Science 214:1125, C.D. Cabradilla
et al., 1986, Biotechnology 4:128, D.J. Dowbenko, 1985,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:7748, auf die hiermit Bezug ge-
nommen wird.

10 Zur Herstellung von Subunit-Vakzinen werden Methoden be-
nötigt, die die Zahl der Stufen reduzieren, die erforder-
lich sind, um die beste Reinigung eines bestimmten viralen
Antigens aus einer komplexen Expressionsmischung zu er-
15 zielen. Eine effiziente Abtrennung der Antigene von Fremd-
komponenten kann unter Anwendung der Immunoaffinitäts-
chromatographie erfolgen. Diese auch als Immunoadsorption
bekannte Methode besteht im Prinzip in der selektiven
Adsorption eines Antigens an einen festen Träger, an den
20 ein spezifischer Antikörper kovalent geknüpft wurde. Das
selektiv adsorbierte Antigen eluiert man dann von einem
derartigen Adsorbens mit Antikörper-Affinität, indem man
beispielsweise den pH-Wert und/oder die Ionenstärke des
Puffers ändert.

25 Polyklonale Antikörper, die von Tieren, welche mit dem ge-
wünschten Antigen immunisiert wurden oder von natürlich in-
fizierten Personen (siehe beispielsweise Laksy et al., oben)
erhalten wurden, wurden häufig als Immunoadsorbentien ver-
wendet. Diese Reagentien besitzen aber im allgemeinen ent-
30 scheidende Nachteile, beispielsweise daß (i) nicht alle der
Antikörper, die an den unlöslichen Träger binden, spezifisch
für das interessierende Molekül sind, so daß eine weitere
Reinigung erforderlich wird; (ii) die Ausbeuten an ge-
wünschtem Antigen häufig niedrig sind; und (iii) die
35

1 Antikörper-Affinitäten häufig von einem Präparat zum anderen
schwanken, so daß Modifizierungen der Elutionsmethode er-
forderlich sind. Mit der Verwendung monoklonaler Antikörper,
die spezifisch für das gewünschte virale Antigen sind, in
5 Subunit-Vakzinpräparationen anstelle von polyklonalen Anti-
körpern könnte man diese Schwierigkeiten umgehen.

Monoklonale Murinantikörper, die HIV-Antigene binden, wurden
bereits beschrieben. Mehrere Arbeitsgruppen haben über
10 monoklonale Antikörper berichtet, die spezifisch für das
Kernprotein p25 sind (siehe beispielsweise di Marzo
Veronese et al., 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:5199 und
J. Chassagne et al., 1986, J. Immunol. 136:1442). Monoklonale
Antikörper, die spezifisch für das Membranglykoprotein gp41
15 sind, wurden ebenfalls bereits beschrieben (siehe bei-
spielsweise di Marzo Veronese et al., 1985, Science 229:
1402).

Ziel der Erfindung

20 Es besteht ein Bedürfnis nach monoklonalen Antikörpern, die
spezifisch für Epitope in genau definierten Bereichen des
Haupthüllglykoproteins gp110 sind. Monoklonale Antikörper,
welche an diese Bereiche binden und eine Reduktion oder
25 Eliminierung der Replikation und der Übertragbarkeit von
HIV verursachen, wären von großem therapeutischen und
prophylaktischen Nutzen. Darüber hinaus könnte man die
monoklonalen Antikörper auch dazu verwenden, den gewünschten
Bereich von gp110 beispielsweise für die Anwendung in
30 Vakzinen aus zerstörten Viren oder rekombinanten Expressions-
systemen zu reinigen. Weiter könnte der Bereich chemisch
synthetisiert werden, der das (die) Epitop(e) enthält (ent-
halten), das (die) von den monoklonalen Antikörpern er-
kannt wird (werden), wodurch die mit der Reinigung und Ver-
35 abreicherung größerer Fragmente des gp110-Moleküls verbundenen

- 1 Schwierigkeiten vermieden werden könnten. Die vorliegende Erfindung erfüllt diese und andere Bedürfnisse.

Darlegung des Wesens der Erfindung

5

Erfindungsgemäß werden monoklonale Antikörper zur Verfügung gestellt, welche in der Lage sind, die neutralisierenden Epitope von HIV-Proteinen immunologisch nachzuahmen. Diese neuartigen Materialien finden beispielsweise in Diagnose-Assays für den Nachweis von HIV-Infektionen und bei der therapeutischen Behandlung von oder beim Impfen gegen HIV-Infektionen Anwendung.

15

Die Erfindung betrifft neue Mittel und Methoden zur Neutralisierung von HIV-Infektionen, d.h. zur Verhinderung oder substantiellen Inhibierung der Bildung oder cellulären Transmission von infektiösem HIV in einem Wirt. Insbesondere werden Peptide, die einen neutralisierenden Bereich des HIV nachahmen, sowie monoklonale Antikörper, die mit einem derartigen Bereich reagieren, für die Diagnose und Behandlung und zur Impfung gegen HIV-Infektionen verwendet. Der Ausdruck "neutralisierender Bereich" bezeichnet in diesem Zusammenhang diejenigen Teile des HIV, insbesondere HIV-Proteine, welche Aminosäuresegmente enthalten, die ein oder mehrere Epitope definieren, die mit Antikörpern reagieren, welche entweder alleine oder in Kombination mit anderen erfindungsgemäßen Antikörpern in der Lage sind, HIV-Infektionen zu neutralisieren. Geeignete Assays für die Neutralisierung sind bekannt, dazu zählen beispielsweise die Reduktion von HIV-Infektionen in T-Zelllinien, die Reduktion von Plaque-bildenden Einheiten von VSV (HIV), Pseudotypen, welche die Hüllglykoproteine von HIV tragen, Syncytium-Inhibitionstests

1 und Virion-Rezeptor-Bindungstests. Wie erwünscht, ist die
neutralisierende Aktivität mit der Antikörperreaktivität
in immunochemischen Tests, wie Immuncfluoreszenz-, Immuno-
5 blot- und Radioimmunopräzipitations-Assay, vergleichbar.

Die neuen Peptide mit typischerweise weniger als ungefähr
50 Aminosäuren enthalten 5 oder mehr zusammenhängende Aminosäuren,
die Epitope bilden, welche im wesentlichen denjenigen
Epitopen ähneln, welche sich an dem neutralisierenden Bereichen
10 von HIV gp110 oder p25 befinden, die durch die env- und gag-
Bereiche des HIV-Genoms kodiert sind. Von besonderem Interesse
sind diejenigen Bereiche, die sich etwa vom Aminosäure-
rest 301 bis etwa 336 von gp110 und etwa 278 bis etwa 319 und
etwa 315 bis etwa 363 von p25 (alle von dem als LAV_{BRU} be-
15 zeichneten HIV-Stamm) erstrecken. Die Bezeichnung der
Aminosäurereste stammt von der Los Alamos Datenbank (AIDS
virus sequence database, Los Alamos National Laboratory,
Theoretical Division, Los Alamos, NM 87545).

20 Für den Fachmann ist ersichtlich, daß weitere analoge Be-
reiche ("Homologe") von anderen HIV-Isolaten identifiziert
werden können, basierend auf ihrer Lage in verwandten
Proteinen aus unterschiedlichen Isolaten. In der Praxis
können derartige Homologe unter Bezug auf LAV_{BRU}-Sequenz-
25 daten folgendermaßen identifiziert werden:

- a) die Aminosäuresequenzen von HIV-Isolaten und LAV_{BRU}
können so ausgerichtet werden, daß maximale Homologie
zwischen den beiden Sequenzen besteht.
- 30 b) man kann Peptide identifizieren, die diejenigen Amino-
säuresequenzen von HIV-Isolaten umfassen, die der
Lokation der LAV_{BRU}-Peptide entsprechen, welche immuno-
logisch die LAV_{BRU}-Proteine nachahmen. Peptide, welche
35 die auf diese Weise identifizierten Aminosäuresequenzen
von HIV-Isolaten umfassen, ahmen typischerweise die ent-

1 sprechenden Proteine des HIV-Isolats immunologisch nach.

 Diese Methode kann auch auf HIV-Stämme angewandt werden,
 die erst noch aufzufinden sind. Wenn beispielsweise neue
5 HIV-Stämme identifiziert werden, können deren Hüll- und
 Kernaminosäuresequenzen mit denjenigen von LAV_{BRU} zur Er-
 zielung maximaler Homologie in Übereinstimmung gebracht
 werden. Die Methoden, mit denen die Sequenzen in Überein-
 stimmung gebracht werden, sind dem Fachmann bekannt. Wenn
10 die Sequenzen in Übereinstimmung gebracht werden, ist es
 wünschenswert die Homologie zwischen den Cysteinresten
 so groß wie möglich zu halten. Die Aminosäuresequenz des
 neuen HIV-Stamms oder der HIV-Spezies, die der Lokation
 der hier offenbarten Peptide entspricht, kann
15 synthetisiert und erfindungsgemäß zur Anwendung gebracht
 werden.

 Eine weitere Methode zur Bestimmung von Sequenzen eines
 homologen Bereichs in anderen HIV-Stämmen wurde von Scharf
20 et al., Science (1986) 233:1076 beschrieben. Dabei ver-
 wendet man zwei Oligonukleotid-Primer, die an konservierte
 Sequenzen außerhalb des hier interessierenden Sequenzbe-
 reiches binden, wobei in jedem Primer unterschiedliche
 restriktive Stellen vorhanden sind. Die DNA von HIV-Stämmen
25 kann dann in vitro vervielfacht werden und die erhaltenen
 Oligonukleotide können in Vektoren für die Sequenzanalyse
 kloniert und einem Vakzin als Cassette einverleibt werden,
 die ein bestimmtes Epitop des HIV-Stamms darstellt.

30 Es ist bei der vorliegenden Erfindung nicht erforderlich,
 daß die Epitope, die innerhalb derartiger Sequenzen vor-
 handen sind, mit Antikörpern aller HIV-Stämme oder -spezies
 eine Kreuzreaktion eingehen. Peptide, die immunologische
 Epitope umfassen, welche eine Spezies oder Serogruppe von
35 einer anderen unterscheiden, finden zur Identifizierung be-

1 stimmter Spezies oder Serogruppen Anwendung und können zur
Identifizierung von Personen dienen, die mit einer oder
mehreren HIV-Spezies oder -Serogruppen infiziert sind. Sie
sind auch in therapeutischen Mitteln in Kombination mit
5 anderen Peptiden brauchbar, die entweder von einem homologen
Bereich oder einem anderen neutralisierenden Bereich stammen.

Die hier interessierenden Peptide stammen vorzugsweise von
gp110-Region des Virus ab. Von besonderem Interesse in diesem
10 Bereich sind Peptide, die im offenen env-Leseraster kodiert sind,
der sich etwa von Basenpaar (bp) 6667 bis etwa zum Basen-
paar 6774 des LAV_{BRU}-Isolats erstreckt. Unterschiedliche
homologe Bereiche anderer HIV-Isolate umfassen somit, wie
in Tabelle I aufgeführt, die homologen Sequenzen, die von
15 der Los Alamos Datenbank (ausgenommen LAV2) erhalten wurden.

Weitere Peptide, die zur Erzeugung von und zum Screening
auf monoklonale Antikörper brauchbar sind, sind diejenigen,
die im offenen env-Leseraster etwa vom bp 7246 bis etwa 7317
20 von LAV_{BRU} kodiert sind. Derartige Antikörper und reaktive
Peptide sind insbesondere im Immunoassay brauchbar.

Im gag-Bereich des LAV_{BRU}-Isolats stellen die p25 Amino-
säuresequenzen von etwa 278 bis 319 und 315 bis 363 weitere
25 neutralisierende Bereiche des HIV dar.

Es ist für den Fachmann ersichtlich, dass weitere neutralisierende
Bereiche des HIV identifiziert werden können und zwar auf
der Grundlage der erfindungsgemäßen Lehre. Insbesondere
30 zeigen Kombinationen monoklonaler Antikörper, die mit
verschiedenen HIV-Epitopen reagieren,
eine neutralisierende Aktivität.

35

TABELLE 1

	HXB2	TGTACAAGACCCAACAACAATACAAGAAAAAGA.....ATCCGTATC	
		CysThrArgProAsnAsnAsnThrArgLysArg.....IleArgIle	309
5	BH102	-----Ser-----	309
	BH8	-----Lys-----	309
	HXB3	-----Lys-----	309
	H9M	-----Ser-----	309
	BRU	-----Ser-----	314
	MAL	-----Gly-----ArgGly-----HisPhe	314
	ELI	---Ala---TyrGln---Gln---ThrPro---	310
	ARV2	-----Ser-----Tyr---	312
10	WMJ2	-----Tyr---Val---ArgSer-----LeuSer---	306
	RFENV	-----Ser-----ThrLys	322
	Z6	-----TyrLys-----GlnSer-----ThrPro---	311
	Z3	-----GlySerAspLysLysIle-----GlnSer---	306
	NY5	-----Lys---Gly-----Ala---	304
	CDC42	-----His-----ValThrLeu.....	320
	LAV2	-----Gly---Lys---Val---Gln-----MetLeu	302
15	HXB2	CAGAGA.....GGACCAGGAGAGCATTGTGTTACAATAGGAAAAATAGGAAATATG	
		GlnArg.....GlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIleGlyAsnMet	326
	BH102	-----	326
	BH8	-----	326
	HXB3	-----	326
	H9M	-----	326
	BRU	-----	331
	MAL	Gln---LeuTyr---Thr---IleVal---AspIle	329
20	ELI	GlyLeu-----...GlnSerLeuTyrThr---Arg---IleValSerArgSer	323
	ARV2	His---Thr---Arg---IleGlyAsp	327
	WMJ2	Arg---ArgGlu...---IleGlyIle	320
	RFENV	ValIleTyrAlaThr---Gln---IleGlyAsp	337
	Z6	GlyLeu-----...GlnAlaLeuTyrThr---Arg---ArgThrLysIleIle	327
	Z3	ArgIle-----LysVal---TyrAlaLys---Gly.....	319
	NY5	GlyPro-----...ThrLeuTyrAlaArgGlu-----AspIle	320
25	CDC42	ValTrpTyr---Thr---Glu---LeuGlyAsn	335
	LAV2	MetSer-----HisVal---HisSerHisTyrGlnProIle---Lys	323
	HXB2	...AGA...CAAGCACATTGT	
		...Arg...GlnAlaHisCys	331
	BH102	-----	331
	BH8	-----	331
	HXB3	-----	331
30	H9M	-----	331
	BRU	-----	336
	MAL	-----Arg---Tyr---	334
	ELI	IleIleGly-----	330
	ARV2	Ile---Lys...-----	333
	WMJ2	Ile-----	326
	RFENV	Ile---Lys...-----	343
35	Z6	Gly...-----	334
	Z3	IleThrGly-----	326
	NY5	-----	325
	CDC42	Ile-----	341
	LAV2	ArgProArg-----Met---	330

1 Peptid I, das auch als Peptid 29 bezeichnet wird, ist im
offenen env-Leseraster etwa von den Aminosäureresten 308 bis
328 kodiert und besitzt die folgende Aminosäuresequenz,
bei der die Oligopeptide innerhalb dieser Sequenz lineare
5 Epitope dieser Sequenz umfassen:

I (29)

Y-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-
Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys-
10 Ile-Y'

in der Y und Y', soweit vorhanden, jeweils Sequenzen von
bis zu etwa 20 Aminosäuren bedeuten. Wenn Y und/oder Y' vor-
15 handen sind, können diese beispielsweise eine oder mehrere
Aminosäuren aus Sequenzen, die die Aminosäurereste 308 bis
328 der HIV-Hüllsequenz flankieren, oder irgendeinen Teil
dieser flankierenden Sequenzen umfassen. So kann Y bei-
spielsweise und ohne darauf begrenzt zu sein, die LAV_{BRU}-
20 Hüllaminosäuresequenz etwa von den Resten 301 bis 307
ganz oder teilweise umfassen und Y' kann die LAV_{BRU}-Hüll-
aminosäuresequenz etwa von den Resten 329 bis 336 ganz oder
teilweise umfassen, wie folgt

II (29a)

25 Cys-Thr-Arg-Pro-Asn-Asn-Asn-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-
Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-
Ile-Gly-Lys-Ile-Gly-Asn-Met-Arg-Gln-Ala-His-Cys.

30 In alternativer Weise kann man gekürzte Sequenzen der er-
findungsgemäßen Peptide herstellen. In dieser Hinsicht sind
die folgenden Sequenzen des Peptids 29 besonders brauchbar:

III (29b)

35 Y-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-
Y'

1 worin Y und/oder Y', soweit vorhanden, jeweils Sequenzen
von bis zu etwa 20 Aminosäureresten bedeuten,

IV (29c)

5 **Y-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-
Ile-Gly-Lys-Ile-Y'**

worin Y und Y', soweit vorhanden, jeweils von Sequenzen bis
zu etwa 20 Aminosäureresten bedeuten.

10

Gemäß einer weiteren Ausführungsform sind besonders
interessierende homologe Bereiche des ARV-2-Isolats in dem
env-open-Leseraster von etwa den Aminosäureresten Nr. 306
bis etwa 323 kodiert. Sie haben typischerweise die folgende
15 Aminosäuresequenz, bei der Oligopeptide innerhalb dieser
Aminosäuresequenz lineare Epitope innerhalb einer derartigen
Sequenz umfassen.

V (177)

20 **Y-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Tyr-Ile-Gly-Pro-Gly-Arg-
Ala-Phe-His-Thr-Thr-Gly-Arg-Ile-Y'**

worin Y und Y', soweit vorhanden, jeweils 1 bis etwa 20
oder mehr Aminosäurereste umfassen. Wenn Y und/oder Y' vor-
25 handen sind, können sie 1 oder mehrere Aminosäurereste von
Sequenzen, welche die Aminosäurereste 306 bis 323 der
ARV-2-Hüllsequenz flankieren, oder einen Teil dieser
flankierenden Sequenzen umfassen. Insbesondere kann Y die
HIV-Hüllaminosäuresequenz etwa von den Resten 299 bis 306
30 ganz oder teilweise umfassen; Y' kann die HIV-Hüllamino-
säuresequenz etwa von den Resten 324 bis 333 ganz oder teil-
weise umfassen.

In alternativer Weise kann man verkürzte Sequenzen der
35 Peptide V herstellen. In dieser Hinsicht sind die folgenden

1 Sequenzen besonders brauchbar:

VI (177a)

Y-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Tyr-Ile-Gly-Pro-Gly-Y'; und

5

VII

Y-Asp-Cys-Lys-Thr-Ile-Leu-Lys-Ala-Leu-Gly-Pro-
Ala-Ala-Thr-Leu-Glu-Glu-Norleu-Norleu-Thr-Ala-
Cys-Y'

10 worin Y und/oder Y', soweit vorhanden, jeweils Sequenzen von
bis zu 20 oder mehr Aminosäureresten bedeuten.

Ein weiteres Beispiel umfaßt homologe Bereiche des LAV-2-
Isolats, wie sie beispielsweise im offenen env-Leseraster
etwa von den Aminosäureresten 311 bis 330 kodiert sind.
15 Sie besitzen typischerweise die folgende Sequenz:

VIII (110-2-2)

Y-Lys-Thr-Val-Lys-Ile-Nor-Leu-Nor-Ser-Gly-His-Val-
20 Phe-His-Ser-His-Tyr-Gln-Pro-Y'

worin Y und/oder Y', soweit vorhanden, jeweils Sequenzen von
bis zu 20 oder mehr Aminosäurereste bedeuten (siehe
25 Nature 326:662 (1987), worauf hiermit Bezug genommen wird).

Gegenstand der Erfindung sind weiter neue Zelllinien, die in
der Lage sind, monoklonale Antikörper zu produzieren, sowie
Mittel, die diese Antikörper enthalten. Die Antikörper sind
30 in der Lage bei extrem hohen Titern (von 10^2 bis 10^4 bis
etwa 10^7 oder mehr) neutralisierende Bereiche, die in
einer vorbestimmten Sequenz des Hüllglykoproteins gp110
oder p25 enthalten sind, deren Proteinprecursoren, bio-
logisch exprimierte rekombinante Fusionsproteine und syn-

35

1 thetische Peptide, die ein oder mehrere Epitome inner-
halb des vorbestimmten Sequenzbereiches von gp110 oder p25
enthalten, selektiv zu erkennen. Die Hybridzellen besitzen
ein identifizierbares Chromosom, bei dem sich die Keimbahn-
5 DNA umgeordnet hat, um für einen Antikörper zu kodieren, der
eine Bindungsstelle für ein Epitop an gp110 oder p25 auf-
weist, das einige oder alle klinische HIV-Isolate aufweisen.
Diese monoklonalen Antikörper kann man auf vielfältige Weise
anwenden. Dazu zählen die Anwendungen in der Diagnose und
10 Therapie sowie die Anwendung zur Identifizierung weiterer
kreuz-reaktiver Antikörper, wie blockierende Antikörper.
Peptide oder Polypeptide, die das (die) Epitop(e) enthalten,
mit dem sie reagieren, finden separate Anwendung als Immuno-
gene für Vakzine oder als therapeutische Mittel.

15

Blockierende Peptide

Eine andere Ausführungsform der Erfindung betrifft, haupt-
sächlich zur Anwendung zusammen mit den obigen Peptiden oder
20 neutralisierenden monoklonalen Antikörpern, weitere Peptide
oder Antikörper, die die HIV-Bindung an Rezeptoren stören,
um die HIV-Infektivität weiter zuschwächen. Vorzugsweise kann
man die sogenannten "blockierenden Peptide", die in der Lage
sind, die Virusproliferation zu inhibieren, sowie monoklonale
25 Antikörper, die spezifisch für Epitope sind, die in der-
artigen blockierenden Peptiden enthalten sind, dazu ver-
wenden, die Wirksamkeit der Behandlung von HIV-Infektionen
zu steigern. HIV-blockierende Peptide entsprechen typischer-
weise derjenigen HIV-Aminosäuresequenz, von der man annimmt,
30 daß sie für die Anlagerung des Virus an eine Wirtszelle
wesentlich ist, beispielsweise die env-kodierten Aminosäure-
reste etwa 190 bis etwa 197 von LAV_{BRU} und etwa 185 bis etwa
192 von ARV-2 und HTLV-III(BH-10). Dazu zählen das Peptid
T-Oktapeptid (Ala-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr) und dessen
35 verschiedene Derivate (z.B. IX unten) und Analoge (z.B. XI,
unten), das von Pert et al (1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
83:9254-9258, worauf hiermit Bezug genommen wird) be-

1 geschrieben ist und das sich auf dem Hüllglykoprotein (gp110
oder 120) befindet.

5 Von besonderem Interesse sind beispielsweise blockierende
Peptide mit den nachfolgenden Sequenzen, wobei vorzugsweise
der NH₂-Terminus acetyliert und der COOH-Terminus amidiert
ist:

IX (173D)

10 Y-dAla-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y';

X (186)

Y-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y';

XI (187)

Y-Thr-Thr-Ser-Tyr-Thr-Y';

15 XII (188)

Y-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y';

XIII (189)

Y-Asn-Thr-Ser-Tyr-Gly-Y';

XIV (190)

20 Y-Asp-Thr-Asn-Tyr-Ser-Y';

XV (191)

Y-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y';

25 worin bei jedem Peptid Y und Y', soweit vorhanden, jeweils
eine Aminosäuresequenz von bis zu etwa 20 Aminosäuren be-
deutet. Epitope oder antigene Determinanten innerhalb dieser
Peptide sind typischerweise durch wenigstens 5 benachbarte
Aminosäuren definiert und finden Anwendung beispielsweise
30 für die Nachahmung natürlich vorkommender HIV-Antigen
Stellen bei der Herstellung von HIV-reaktive Antikörpern und
Vakzinen.

Gewinnung monoklonaler Antikörper

35 Die Herstellung monoklonaler Antikörper kann erfolgen, indem
man die Expression von Nukleinsäuresequenzen immortalisiert,
die für

- 1 Antikörper kodieren, die spezifisch für HIV sind, durch Einführung derartiger Sequenzen, typischerweise von für den Antikörper kodierender cDNA, in einen zur Kultivierung fähigen Wirt. Die immortalisierte Zelllinie kann eine solche Säugetierzelllinie
5 sein, die durch Onkogenese, Transfektion, Mutation oder dergleichen transformiert wurde. Zu derartigen Zellen zählen Myelomlinien, Lymphomlinien oder andere Zelllinien, die in der Lage sind, die Expression und Sekretion des Antikörpers in vitro herbeizuführen. Der Antikörper kann ein natürlich vorkommendes Immunglobulin eines
10 Säugetieres sein, das durch Transformation eines Lymphocyten, insbesondere eines Splenocyten, mit Hilfe eines Virus oder mittels Fusion des Lymphocyten mit einer neoplastischen Zelle, beispielsweise einem Myelom, unter Bildung einer Hybridzelllinie produziert wird. Typischerweise erhält man den
15 Splenocyten von einem Tier, das gegen das HIV-Virus oder ein Fragment mit einer epitopen Stelle davon immunisiert wurde.
- 20 Immunisierungsmethoden sind bekannt, sie können beträchtlich variieren und dennoch wirksam bleiben, siehe Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 2. Aufl. (1986), auf das hiermit Bezug genommen wird. Zerstörte Viren, synthetische Peptide und bakterielle Fusionsproteine, die die antigenen Fragmente des gp110 oder
25 p25-Moleküls enthalten, kann man als Immunogene verwenden. Vorzugsweise wird das Immunogen zerstörter Viren, Peptide oder rekombinanter Proteine durch Proteine oder Fragmente davon angereichert, welche die Epitope enthalten, wofür Antikörper produzierende B-Zellen oder Splenocyten gewünscht sind. Insbesondere kann man Lösungen, die Lysate
30 oder Extrakte zerstörter Viren enthalten, oder Überstände von biologisch exprimierten rekombinanten Proteinen oder zerstörten Expressionsvektoren durch Glykoproteine wie gewünscht anreichern, wobei man Reinigungsmethoden, wie beispielsweise die Polyacrylamid-Gelelektrophorese, verwendet.
35

1 Die Lektin-Affinitätsreinigung ist eine bevorzugte zweck-
mäßige Methode zur Reinigung von gp110 und anderen Glyko-
proteinen, beispielsweise die Affinitätsreinigung unter Ver-
wendung von lentilem Lektin. Das Ausmaß, in dem die Glyko-
5 proteine aus den Lösungen zur Anwendung als Immunogen ge-
reinigt werden, kann stark schwanken, d.h. von weniger als
50 % bis zu üblicherweise wenigstens 75 bis 95 %, wünschens-
werterweise 95 bis 99 % und besonders erwünscht bis zur
absoluten Homogenität.

10 Wenn man die Proteine in dem gewünschten Maß gereinigt hat,
kann man sie in einem zur Immunisierung geeigneten
physiologischen Träger suspendieren oder darin lösen oder
man kann sie an ein Adjuvans koppeln. Eine bevorzugte
15 Technik umfaßt beispielsweise die Adsorption der Proteine und
der Fragmente davon an lentiler Lektinagarose oder einem
anderen makromolekularen Träger für die Injektion. Immunogene
Mengen antigener Präparate, die mit HIV-Proteinen, ein-
schließlich dem gp110-Glykoprotein und dem p25-Kernprotein,
20 oder den antigenen Teilen davon angereichert sind, werden
im allgemeinen in Konzentrationen im Bereich von 1 µg bis
20 mg/kg des Wirtes injiziert. Die Verabreichung kann, bei-
spielsweise durch intramuskuläre, peritoneale, subkutane,
intravenöse etc., Injektion erfolgen. Die Verabreichung
25 kann 1 x oder mehrere Male und üblicherweise in 1- bis
4-wöchigen Intervallen erfolgen. Die immunisierten Tiere
kontrolliert man hinsichtlich der Produktion von Antikörpern
gegen die gewünschten Antigene, anschließend entfernt man die
Milz, isoliert die B-Lymphocyten der Milz und fusioniert sie
30 mit einer Myelomzelllinie oder transformiert sie. Die
Transformation oder Fusion kann man in üblicher Weise durch-
führen, die Fusionsmethode ist in zahlreichen Patenten be-
schrieben, beispielsweise in US-PS'en 4 172 124, 4 350 683,
4 363 799, 4 381 292 und 4 423 147; man vergleiche auch,
35 Kennett et al, Monoclonal Antibodies (1980) und die darin an-
geführten, sowie Godin wie oben erwähnt; auf alle diese
Publikationen wird hiermit Bezug genommen.

1 Die immortalisierten Zelllinien kann man klonieren und gemäß
üblichen Verfahren einem Screening unterziehen. In den Zell-
überständen kann man die Antikörper, die in der Lage sind,
an die gewünschten gp110 oder p25-HIV-Proteine zu binden,
5 die rekombinanten Fusionsproteine oder die synthetischen
Peptide nachweisen, die den gewünschten epitopen Bereich
enthalten. Geeignete immortalisierte Zelllinien kann man dann
in vitro wachsen lassen oder in die Peritonealkavität eines
geeigneten Wirts zur Gewinnung von Ascites-Flüssigkeit
10 injizieren. Weil erfindungsgemäße Antikörper vorliegen,
die als spezifisch für Epitope bekannt sind, welche bei-
spielsweise innerhalb der Bereiche vorhanden sind, die durch
den LAV_{BRU}-Genombereich von etwa bp6688 bis etwa bp 6750
(kodierend für Peptid 29) oder von etwa bp7246 bis etwa
15 7317 (kodierend für Peptid 36) (bp-Numerierung gemäß
Wain-Hobson et al., Cell 44:9 1985, auf die hiermit Bezug
genommen wird), kodiert sind, kann man die Überstände mit den monoklonalen
Antikörpern einem kompetitiven Assay unterziehen. Somit
können weitere immortalisierte Hybridom-Zelllinien mit den
20 gewünschten Bindungseigenschaften leicht aufgrund der Ver-
fügbarkeit der erfindungsgemäßen, für ein bestimmtes
Antigen spezifischen Antikörper aus einer Vielzahl von
Quellen herstellen. Alternativ kann man diese Zelllinien
mit anderen neoplastischen B-Zellen fusionieren, wobei diese
25 anderen B-Zellen als Empfänger für die Genom-DNA, die für
die Antikörper kodiert, dienen kann.

Neoplastische B-Zellen von Nagetieren, insbesondere Mäusen
oder Ratten, sind bevorzugt. Sie können jedoch auch von
30 anderen Säugetierspezies stammen, beispielsweise von
Lagomorpha, Rindern, Schafen, Pferden, Schweinen, Vögel
(Avian) oder dergleichen. Man kann die Immunisierung dieser
Tiere auf einfache Weise durchführen und ihre Lymphocyten,
insbesondere die Splenocyten, für Fusionen gewinnen.

35

- 1 Die von den transformierten oder Hybridzelllinien sekretierten
monoklonalen Antikörper können von einer der Klassen oder
Unterklassen der Immunoglobuline sein, wie IgM, IgD, IgA,
IgG₁₋₄ oder IgE. IgG ist bevorzugt, weil es sich dabei um
5 den üblichsten Isotyp handelt, der in Diagnose-Assays ver-
wendet wird. Die monoklonalen Antikörper können intakt oder
als Fragmente, wie Fv, Fab, F(ab')₂, verwendet werden. Sie
werden üblicherweise jedoch intakt verwendet.
- 10 Um eine mögliche Antigenität eines monoklonalen Antikörpers,
der nicht vom Menschen stammt, in einem Humanwirt zu um-
gehen, kann man chimere Antikörper konstruieren, bei denen
das Antigen-Bindungsfragment eines Immunoglobulinmoleküls
(variabler Bereich) mittels einer Peptidverknüpfung von
15 wenigstens einem Teil eines anderen Proteins gebunden ist,
das beim Menschen nicht als fremd erkannt wird, wie bei-
spielsweise die "cast out portion" eines Humanimmuno-
globulinmoleküls. Dies kann dadurch erfolgen, daß man die
Exone des variablen Bereichs des Tieres mit Human-Kappa-
20 oder -gammaexonen des konstanten Bereichs fusioniert. Hier-
für sind dem Fachmann mehrere Methoden bekannt, beispiels-
weise diejenigen, die in PCT 86/01533, EP-A-171496 und
EP-A-173494 beschrieben sind, auf die hiermit Bezug ge-
nommen wird.

25

Pharmazeutische Formulierungen und Anwendungen

- Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper mit
neutralisierender Wirkung, beispielsweise diejenigen, die mit
30 einer Epitopstelle auf gp110 oder p25 oder mit einem
blockierenden Peptid reagieren, können pharmazeutischen
Mitteln als eine Komponente einverleibt werden, um HIV-
Infektionen zu schwächen. Das Mittel soll eine therapeutische
oder prophylaktische Menge von wenigstens einem der er-
35 findungsgemäßen monoklonalen Antikörper zusammen mit einem
pharmazeutisch wirksamen Träger enthalten. Der pharmazeutische

- 1 Träger soll eine kompatible, nicht-toxische Substanz
sein, die geeignet ist, die monoklonalen Antikörper an den
Patienten zu vermitteln. Man kann steriles Wasser, Alkohol,
Fette, Wachse und inerte Feststoffe als Träger verwenden.
5 Pharmazeutisch annehmbare Adjuvantien (Puffer, Dispergier-
mittel) können den erfindungsgemäßen Mitteln ebenfalls
einverleibt werden. Diese Mittel können einen einzelnen
monoklonalen Antikörper enthalten, um beispielsweise
spezifisch für HIV-Stämme mit Hüllglykoproteinen zu sein,
10 die eine Epitopstelle innerhalb eines Bereiches enthalten,
der durch bp6688 bis bp6750 kodiert ist. In alternativer
Weise kann ein pharmazeutisches Mittel einen oder mehrere
monoklonale Antikörper enthalten und einen "Cocktail"
bilden. Beispielsweise ein Cocktail, der monoklonale Anti-
15 körper gegen verschiedene HIV-Stämme enthält, stellt ein
universell anwendbares Produkt mit therapeutischer oder
prophylaktischer Aktivität gegen die meisten klinischen
HIV-Isolate dar. Der Cocktail kann monoklonale Antikörper
enthalten, die an HIV-Proteine oder -glykoproteine binden,
20 die sich von gp110 oder p25 unterscheiden, wie beispiels-
weise gp41-Glykoprotein oder p34-Nuklease/Integrase.
Das Molverhältnis der verschiedenen monoklonalen Anti-
körperkomponenten unterscheidet sich im allgemeinen um
nicht mehr als den Faktor 10, insbesondere um nicht mehr
25 als den Faktor 5 und liegt im allgemeinen bei etwa
1:1-2 pro jeder anderer Antikörperkomponente.
- Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper kann man
30 als separat zu verabreichende Mittel einsetzen, die zu-
sammen mit anderen anti-retroviralen Mitteln, einschließ-
lich blockierenden Peptiden, gegeben werden. Der gegen-
wärtige Stand der Entwicklung anti-retroviraler Mittel und von
Anti-HIV-Mittel ist im einzelnen in Mitsuya et al.,
35 Nature 325:773-778, 1987 beschrieben, worauf hiermit Bezug
genommen wird.

- 1 Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper, Peptide und
pharmazeutischen Mittel sind insbesondere zur oralen und
parenteralen Verabreichung brauchbar. Vorzugsweise werden
5 die pharmazeutischen Mittel parenteral verabreicht, d.h.
subkutan, intramuskulär oder intravenös. Die vorliegende
Erfindung stellt deshalb auch Mittel zur parenteralen Ver-
abreichung zur Verfügung, die eine Lösung der monoklonalen
Antikörper, Peptide oder eines Cocktails davon in einem
10 annehmbaren Träger, vorzugsweise einem wäßrigen Träger,
umfassen. Man kann eine Vielzahl wäßriger Träger einsetzen,
beispielsweise Wasser, gepuffertes Wasser, 0,4%-ige Koch-
salzlösung, 0,3%-iges Glycin und dergleichen. Diese Lösungen
sind steril und im allgemeinen frei an Teilchen. Die Mittel
15 kann man mit Hilfe herkömmlicher und bekannter Methoden
sterilisieren. Die Mittel können pharmazeutisch annehmbare
Hilfsstoffe enthalten, wie sie erforderlich sind, um an-
nähernd physiologische Bedingungen einzustellen, wie Mittel
zur Einstellung des pH-Werts und Puffer, Mittel zur Ein-
stellung der Toxizität und dergleichen, beispielsweise
20 Natriumacetat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calcium-
chlorid, Natriumlactat und dergleichen. Die Menge an Anti-
körper in diesen Formulierungen kann in weitem Umfange
variieren, d.h. von weniger als ungefähr 0,5 Gew.-%, üblicher-
weise etwa oder wenigstens etwa 1 Gew.-% bis zu 15 oder
25 20 Gew.-%. Diese Menge wird hauptsächlich im Hinblick auf
die Flüssigkeitsvolumina, Viskositäten und dergleichen, und
vorzugsweise im Hinblick auf die Art der Verabreichung ge-
wählt.
- 30 Ein typisches pharmazeutisches Mittel zur intramuskulären
Injektion kann somit 1 ml steriles gepuffertes Wasser und
50 mg monoklonale Antikörper enthalten. Ein typisches Mittel
zur intravenösen Infusion kann 250 ml sterile Ringer-Lösung
und 150 mg monoklonale Antikörper enthalten. Methoden zur
35 Herstellung parenteral verabreichbarer Mittel sind bekannt
oder dem Fachmann geläufig und sind detailliert beispiels-

- 1 weise in Remington's Pharmaceutical Science, 15. Aufl.,
Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) be-
schrieben, worauf hiermit Bezug genommen wird.
- 5 Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper und Peptide
kann man zur Lagerung lyophilisieren und vor der Anwendung
in einem geeigneten Träger rekonstituieren. Dieses Ver-
fahren hat sich bei üblichen Immunoglobulinen als wirksam
erwiesen. Dabei kann man bekannte Lyophilisierungs- und
10 Rekonstitutionstechniken anwenden. Es ist für den Fachmann
ersichtlich, daß die Lyophilisierung und Rekonstitution
zu einem unterschiedlichen Grad an Antikörperaktivitäts-
verlust führen kann (bei herkömmlichen Immunoglobulinen
neigen IgM-Antikörper dazu einen größeren Aktivitätsverlust
15 zu erleiden als IgG-Antikörper) und daß daher die angewandte
Menge angepaßt werden muß, um den Verlust zu kompensieren.
- Die Mittel, die die erfindungsgemäßen monoklonalen Anti-
körper, Peptide oder Cocktails davon enthalten, kann man
20 zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung
von HIV-Infektionen verabreichen. Bei der therapeutischen
Verabreichung werden die Mittel einem Patienten, der be-
reits mit HIV infiziert ist, in einer Menge verabreicht, die
ausreicht, um die Infektion und die damit verbundenen
25 Komplikationen zu heilen oder zumindest teilweise zum Stehen zu
bringen. Die Dosis, die man benötigt, um dies zu erreichen,
ist als "therapeutisch wirksame Dosis" definiert. Die bei
dieser Anwendung wirksamen Mengen richten sich nach der
Schwere der Infektion und dem allgemeinen Zustand des Immun-
systems des Patienten, sie liegen im allgemeinen im Bereich
30 von etwa 1 bis 200 mg Antikörper pro kg Körpergewicht, wobei
Dosierungen von 5 bis 25 mg pro kg üblicherweise zur An-
wendung kommen. Da die erfindungsgemäßen Produkte im allge-
meinen bei schweren Erkrankungen, d.h. in lebensbedrohenden
oder potentiell lebensbedrohenden Situationen zur Anwendung
35 kommen, ist es möglich und kann vom behandelnden Arzt er-

1 wünscht sein, eine wesentlich größere Menge dieser Anti-
körper zu verabreichen.

Bei prophylaktischer Anwendung verabreicht man die Mittel,
5 die die erfindungsgemäßen Peptide, Antikörper oder einen
Cocktail davon enthalten, einem Patienten, der noch nicht
mit HIV infiziert ist, der aber möglicherweise vor kurzem
einer derartigen Infektion ausgesetzt war oder angenommen hat,
10 daß er dieser ausgesetzt war oder einem Risiko unterliegt,
dem Virus ausgesetzt zu sein. Die prophylaktische Verab-
reichung dient dazu, die Widerstandskraft des Patienten
gegen eine potentielle Infektion zu stärken oder den
Patienten gegen das Virus zu impfen. Eine hierfür geeignete
Menge wird als "prophylaktisch wirksame Dosis" definiert.
15 Auch bei dieser Anwendung richten sich die genauen zu ver-
abreichenden Mengen nach dem Gesundheitszustand und dem all-
gemeinen Zustand des Immunsystems des Patienten, sie liegen
im allgemeinen im Bereich von 0,1 mg bis 25 mg pro kg, ins-
besondere 0,5 mg bis 2,5 mg pro kg.

20 Man kann Einzel- oder Mehrfachverabreichungen der Mittel
vornehmen, wobei die Dosis und das Verabreichungsschema
vom behandelnden Arzt ausgewählt werden. Die pharma-
zeutischen Formulierungen sollten in jedem Fall eine Menge
25 an erfindungsgemäßen Antikörpern zur Verfügung stellen, die
ausreicht, um den Patienten wirksam zu behandeln.

Darüber hinaus finden die erfindungsgemäßen monoklonalen
Antikörper als Target-spezifisches Trägermolekül Anwendung.
30 Ein Antikörper kann an ein Toxin zur Bildung eines Immuno-
toxins oder an ein radioaktives Material oder Arzneiproduktmittel
zur Bildung eines Radiopharmakon oder Arzneimittels gebunden
sein. Methoden zur Herstellung von Immunotoxinen und Radio-
pharmaka sind bekannt (siehe beispielsweise Cancer Treatment
35 Reports 68:317 (1984)).

1 Es ist auch möglich, daß Heteroaggregate aus erfindungs-
gemäßen monoklonalen Antikörpern und Human-T-Zell-
aktivatoren, wie monoklonale Antikörper gegen das CD3-
Antigen oder gegen den $F_c\gamma$ -Rezeptor an T-Zellen, Human-
5 T-Zellen oder $F_c\gamma$ -aufweisende Zellen (wie K-Zellen oder
Neutrophile) in die Lage versetzen, HIV-infizierte Zellen
über eine Antikörper abhängige, zellvermittelte Cytolyse
(ADCC) abzutöten. Derartige Heteroaggregate kann man bei-
spielsweise bilden, indem man die Anti-HIV-Antikörper
10 mit den Anti-CD3-Antikörpern unter Verwendung des hetero-
bifunktionellen Reagens N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)
propionat kovalent vernetzt, wie dies von Karpowsky et al.,
J. Exp. Med. 160:1686 (1984) beschrieben ist, worauf hier-
mit Bezug genommen wird.

15 Die erfindungsgemäßen Mittel auf Basis der Peptide alleine
können auch therapeutische Anwendung finden, wobei die
Verabreichung zu einer Reduktion oder zur Eliminierung von
HIV bei einem infizierten Wirt führt. Diese Mittel, wie
20 Peptid 29, die blockierenden Peptide und Peptid 126,
welches in der USSN 930785 beschrieben ist, auf die hier-
mit Bezug genommen wird, kann man in geeigneten
physiologischen Trägern intravenös, subkutan, intra-
muskulär, intraperitoneal usw. verabreichen. Verschiedene
25 Träger sind geeignet, dazu zählen Phosphat-gepufferte
Kochsalzlösung, Kochsalzlösung, Wasser, Kaliumchlorid,
Natriumlactat oder dergleichen. Die Peptidkonzentration
kann in einem weiten Bereich in Abhängigkeit von der end-
gültigen Anwendung, Aktivität und Art der Verabreichung
30 variieren. Vorzugsweise liegt bei den Peptiden eine
Amidierung des COOH-Terminus, eine Formylierung des
 NH_2 -Terminus oder eine andere pharmazeutisch annehmbare
Derivatisierung vor. Die Zugabe blockierender Peptide zu
den Peptiden, die einen neutralisierenden HIV-Bereich nach-
35 ahmen, und/oder die spezifisch reagierenden erfindungsgemäßen

1 Antikörper führen zu einer signifikant erhöhten therapeutischen Wirksamkeit. Die Formulierungen können auch
andere Anti-HIV-Mittel enthalten (die von den die Peptide
bindenden monoklonalen Antikörper verschieden sind), wie
5 beispielsweise 3'-Azido-3'-deoxythymidin, 2',3'-Dideoxycytidin, 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrocytidin etc.

Anwendung der monoklonalen Antikörper bei der Immuno-
affinitätsreinigung

10

Die monoklonalen Antikörper, die spezifisch für Polypeptide sind, welche gp110 oder andere Antigen-Determinanten
enthalten, insbesondere diejenigen Antigen-Determinanten,
15 die von biologisch exprimierten rekombinanten Fusionsproteinen oder Lysaten oder Extrakten von kultivierten HIV erhalten wurden, lassen sich besonders vorteilhaft bei
Reinigungsverfahren anwenden. Im allgemeinen haben die
Antikörper Affinitätskonstanten (affinity association
20 constants) im Bereich von 10^8 bis 10^{12} M. Derartige Antikörper kann man verwenden zur Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen von dem Kulturmedium des rekombinanten Expressionssystems, wenn das exprimierte
Protein sekretiert wird, oder von den Komponenten des zerstörten, biologischen Expressionssystems, wenn das Protein
25 nicht sekretiert wird. Die monoklonalen Antikörper, die in der Lage sind, mit gp110 oder anderen Antigen-Determinanten zu reagieren, werden im allgemeinen an ein Substrat oder einen Träger gebunden oder daran immobilisiert. Die Lösung,
30 die die HIV-Antigendeterminanten enthält, wird dann mit dem immobilisierten Antikörper unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die zur Bildung von Immunkomplexen zwischen dem Antikörper und den die gp110-Antigen-Determinanten enthaltenden Polypeptiden geeignet sind. Ungebundenes Material
35 wird von den gebundenen Immunkomplexen abgetrennt, diese

1 Komplexe oder die gp110-Antigenfragmente werden dann vom
Träger abgetrennt.

Die monoklonalen Antikörper werden typischerweise bevor sie
5 an den Träger gebunden werden, von Ascitesflüssigkeit oder
Zellkulturüberständen grob gereinigt. Derartige Reinigungs-
verfahren sind dem Fachmann bekannt, dazu zählt die
Fraktionierung mit Neutralsalzen bei hoher Konzentration.
Weitere Methoden, wie DEAE-Chromatographie, Gelfiltrations-
10 Chromatographie, präparative Gelelektrophorese oder
Protein-A-Affinitäts-Chromatographie, kann man ebenfalls
verwenden, um die monoklonalen Antikörper zu reinigen bevor
sie als Immunoadsorbens Anwendung finden.

15 Der Träger, an dem die monoklonalen Antikörper immobilisiert
werden, sollte die folgenden allgemeinen Eigenschaften be-
sitzen:

- 20 (a) im allgemeinen schwache Wechselwirkungen mit
Proteinen, um eine nicht-spezifische Bindungen zu
minimieren,
- (b) gute Fließeigenschaften, die einen Durchfluß von
Materialien mit hohem Molekulargewicht erlauben,
- 25 (c) Vorhandensein chemischer Gruppen, die aktiviert oder
modifiziert werden können, um eine chemische Bindung
des monoklonalen Antikörpers zu ermöglichen,
- (d) physikalische und chemische Stabilität unter den Be-
30 dingungen, die für die Bindung des monoklonalen Anti-
körpers Anwendung finden und
- (e) Stabilität gegenüber den Bedingungen und Konstituenten
der Puffer, die für die Adsorption und Elution des
35 Antigens erforderlich sind. Einige üblicherweise ver-

1 wendete Träger sind Agarose, derivatisierte Polystyrole,
Polysaccharide, Polyacrylamidperlen, aktivierte Cellulose,
Glas und dergleichen. Es gibt verschiedene chemische
5 Methoden, um die Antikörper an die Substratträger anzu-
knüpfen, siehe allgemein Cuatrecasas P., Advances in
Enzymology 36:29 (1972). Die erfindungsgemäßen Antikörper
kann man direkt oder in alternativer Weise über ein Binde-
glied oder Zwischenstück (linker, spacer) an dem Träger
10 anknüpfen.

15 Die für die Immobilisierung monoklonaler Antikörper an
chromatographischen Trägern erforderlichen allgemeinen
Bedingungen sind bekannt, siehe beispielsweise P. Tijissen,
1985, Practice and Theory of Enzyme Immunoassay, worauf
hiermit Bezug genommen wird. Das tatsächlich verwendete
Koppelungsverfahren ist in geringem Maße abhängig von
der Eigenschaft und der Art des anzukoppelnden Anti-
körpers. Monoklonale Antikörper besitzen Eigenschaften,
die üblicherweise von Charge zu Charge konsistent sind,
20 so daß die erwähnten Bedingungen optimiert werden können.
Die Verknüpfung erfolgt typischerweise über kovalente
Bindungen.

25 Zu der Separationsmatrix gibt man dann eine Suspension von
Extrakten oder Lysaten von HIV-Viren, den Überstand von
einem kultivierten biologischen Expressionssystem oder
eine Suspension der zerstörten Zellen. Man inkubiert die
Mischung unter Bedingungen und während einer Zeitdauer,
die zur Bildung des Immunkomplexes ausreichend ist,
30 üblicherweise wenigstens 30 Min., zweckmäßiger 2 bis 24 h.
Die Immunkomplexe, die Polypeptide mit antigenen Teilen
von gp110 enthalten, trennt man aus der Reaktionsmischung
ab. Man entfernt die Mischung beispielsweise durch Elution
und wäscht die gebundenen Immunkomplexe extensiv mit
35 Adsorptionspuffer. Die Immunkomplexe kann man dann von der

1 Separationsmatrix eluieren, wobei man ein Eluierungsmittel
verwendet, das mit dem zur Anwendung kommenden Träger ver-
träglich ist. Derartige Eluierungsmittel sind dem Fachmann
bekannt. Auch die Polypeptide, die gp110 oder andere antigene
5 Teile enthalten, kann man selektiv entfernen. Beispielsweise
kann man Peptide, die ein Epitop enthalten, das durch die
Antikörper erkannt wird, dazu verwenden, um um die Anti-
körperbindungsstellen zu konkurrieren. Dies stellt ein
alternatives Elutionsverfahren dar, das unter milden Elutions-
10 bedingungen durchgeführt werden kann. Das selektiv ad-
sorbierte Polypeptid, das das gp110-Antigen enthält, kann man
von einem Antikörper-Affinitätsadsorbens eluieren, indem man
den pH und/oder die Ionenstärke des Puffers ändert. Chaotrope
Mittel finden ebenfalls Anwendung zur Entfernung des ge-
15 bundenen Antigens. Die Wahl eines chaotropen Mittels, dessen
Konzentration und der Eluierungsbedingungen hängen von den
Charakteristika der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung ab,
aber sobald sie festgelegt sind, sollten sie keinen
Änderungen unterworfen werden, die üblicherweise bei poly-
20 klonalen Affinitäts-Separations-Systemen erforderlich sind.

Es kann erforderlich sein, den pH-Wert des eluierten
Materials an den physiologischen pH-Wert anzupassen, wenn ein
hoher oder niedriger pH-Wert oder Ionenstärkepuffer ver-
25 wendet wurden, um die gebundenen gp110-Antigene von der
Separationsmatrix abzutrennen. Auch eine Dialyse oder eine
Gelfiltrations-Chromatographie kann zur Entfernung über-
schüssiger, im Eluierungsmittel verwendeter Salze erforder-
lich werden, um die Rekonstitution von gp110 oder von
30 Polypeptiden, die Antigenfragmente von gp110 enthalten, zu
nativen Konformationen zu ermöglichen.

Die erfindungsgemäßen Verfahren ergeben beispielsweise im
wesentlichen reines gp110 oder im wesentlichen reine Poly-
35 peptide, die Antigenfragmente davon enthalten, hergestellt

1 entweder auf natürliche Weise durch infizierte Zellkulturen
oder rekombinante Expressionssysteme von Bakterien, Hefen
oder in Kultur gehaltenen Insekten oder Säugetierzellen.
gp110, die Fragmente davon oder andere gereinigte Proteine
5 besitzen typischerweise eine Reinheit von mehr als 50 %, üblicherweise von wenigstens 75 % und häufig von mehr als 95 bis 99 %. Diese Produkte finden vielfältige Anwendung.

Die HIV-gp110-Proteine, die Polypeptide, die Antigenfragmente
10 davon enthalten oder andere Proteine, die im wesentlichen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigt wurden, haben viele Anwendungsmöglichkeiten. Dazu zählen AIDS-Subunit-Vakzinformulierungen, bei denen das Immunogen eine wirk-
same Dosis an Antigen-Determinanten von beispielsweise gp110
15 oder einem neutralisierenden Bereich davon umfaßt. Zu weiteren Komponenten der Formulierung können diejenigen anti-
genen Teile von HIV-Proteinen oder -Glykoproteinen zählen, die die Produktion von Antikörpern (vorzugsweise neutralisieren-
den Antikörpern) in einem immunisierten Wirt stimulieren,
20 wobei diese Antikörper in der Lage sind, eine Schutzwirkung gegen eine nachfolgende HIV-Infektion auszuüben.

Anwendung der monoklonalen Antikörper in der Diagnose

25 Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper sind auch für Diagnosezwecke brauchbar. Sie können hierfür markiert oder unmarkiert zur Anwendung kommen. Typischerweise umfaßt ein Diagnose-Assay den Nachweis einer Komplexbildung durch die Bindung eines monoklonalen Antikörpers an ein HIV-Antigen.
30 Unmarkierte Antikörper finden beispielsweise in Agglutinations-Assays Anwendung. Darüber hinaus können unmarkierte Antikörper in Kombination mit anderen markierten Antikörpern (zweiten Antikörpern), die mit den monoklonalen Antikörpern reaktiv sind, wie beispielsweise Antikörper, die spezifisch
35 für Immunglobulin sind, eingesetzt werden. In alternativer Weise können die monoklonalen Antikörper direkt markiert

1 werden. Man kann eine Vielzahl von Markierungsmitteln ein-
setzen, beispielsweise Radionukleide, fluoreszierende
Substanzen, Enzyme, Enzymsubstrate, Enzymkofaktoren, Enzy-
inhibitoren, Liganden (insbesondere Haptene) etc. Zahlreiche
5 Arten von Immunoassays stehen zur Verfügung, dazu zählen
beispielsweise diejenigen, die in den US-PSen 3 817 827,
3 850 752, 3 901 654, 3 935 074, 3 984 533, 3 996 345,
4 034 074 und 4 098 876 beschrieben sind, auf die hiermit
Bezug genommen wird.

10 Üblicherweise verwendet man die erfindungsgemäßen mono-
klonalen Antikörper und Peptide in Enzym-Immunoassays, wobei
beispielsweise die erfindungsgemäßen Antikörper oder die
zweiten Antikörper einer anderen Spezies an ein Enzym
15 konjugiert werden. Wenn man eine biologische Probe mit HIV-
Antigenen, wie Humanblutserum, Speichel, Samen, Vaginal-
sekretionen oder eine Virus-infizierte Zellkultursuspension,
mit den Antikörpern kombiniert, erfolgt eine Bindung zwischen
den Antikörpern und denjenigen Molekülen, die das gewünschte
20 Epitop aufweisen. Man kann dann derartige Proteine oder
Virusteilchen von den ungebundenen Reagentien abtrennen und
einen zweiten Antikörper (mit einem Enzym markiert) zugeben.
Anschließend wird die Anwesenheit des Antikörper-Enzy-
konjugats, das spezifisch an das Antigen gebunden ist, be-
25 stimmt. Man kann auch weitere herkömmliche, dem Fachmann be-
kannte Verfahren verwenden.

Zum Nachweis einer HIV-Infektion oder der Anwesenheit von
HIV-Antigenen kann man auch Kits unter Anwendung der er-
30 findungsgemäßen Antikörper zur Verfügung stellen. Die er-
findungsgemäßen monoklonalen Antikörperzusammensetzungen kann
man, üblicherweise in lyophilisierter Form entweder allein
oder zusammen mit weiteren Antikörpern, die spezifisch für
andere HIV-Epitope sind, zur Verfügung stellen. Die Antikörper,
35 die an ein Markierungsmittel konjugiert sein oder unkonjugiert
vorliegen können, sind in den Kits zusammen mit Puffern, wie

1 Tris-, Phosphat-, Carbonatpuffer etc., Stabilisierungsmitteln, Bioziden, inerten Proteinen, wie Rinderserumalbumin oder dergleichen enthalten. Im allgemeinen liegen
5 diese Materialien in einer Menge von weniger als etwa 5 Gew.-%, bezogen auf die Menge an aktivem Antikörper und üblicherweise in einer Gesamtmenge von wenigstens etwa 0,001 Gew.-%, bezogen auf die Antikörperkonzentration, vor. Es ist häufig wünschenswert, einen inerten Extender oder
10 Excipienten zur Verdünnung der aktiven Bestandteile zugeben, wobei der Excipient in einer Menge von etwa 1 bis 99 Gew.-% der Gesamtzusammensetzung vorliegen kann. Wenn ein zur Bindung an die monoklonalen Antikörper fähiger zweiter Antikörper eingesetzt wird, liegt dieser üblicherweise in einem separaten Vial vor. Der zweite Antikörper
15 ist typischerweise an ein Label konjugiert und in analoger Weise wie die oben beschriebenen Antikörperformulierungen formuliert.

Der Nachweis von gp110- oder p25-Antigenen oder des
20 Ganzvirus in biologischen Proben findet bei der Diagnose einer HIV-Virusinfektion Anwendung. Zu biologischen Proben zählen, ohne darauf begrenzt zu sein, Blutserum, Speichel, Samen, Gewebebiopsieproben (Gehirn, Haut, Lymphknoten, Milz etc.), Zellkulturüberstände, zerstörte eukaryontische
25 und bakterielle Expressionssysteme und dergleichen. Auf die Anwesenheit des Virus testet man, indem man die monoklonalen Antikörper mit der biologischen Probe unter Bedingungen inkubiert, die zu einer Immunkomplexbildung führen und man anschließend die Komplexbildung nachweist. Gemäß einer Ausführungsform weist man die Komplexbildung durch die Anwendung eines zweiten Antikörpers nach, der in der Lage ist, an einen monoklonalen Antikörper zu binden, welcher
30 typischerweise an ein Markierungsmittel konjugiert und in analoger Weise wie die oben beschriebenen Antikörperformulierungen formuliert ist. Gemäß einer anderen Ausführungsform wird der monoklonale Antikörper an einen Fest-

35

1 phasenträger gebunden, der dann mit der biologischen Probe
in Kontakt gebracht wird. Nach der Inkubierung wird der
markierte monoklonale Antikörper zugegeben, um das gebundene
Antigen nachzuweisen.

5

Herstellung und Anwendung synthetischer Peptide

Die Erfindung stellt auch neue Peptide zur Verfügung, die
10 unter anderem immunologisch die Proteinepitope nachahmen, die
durch das HIV-Retrovirus kodiert sind, insbesondere die
Epitope, die innerhalb der env- oder gag-Bereiche des Virus-
genoms kodiert sind, welche für die gp120 oder p25 kodieren.
Zur Anpassung an die unterschiedlichen Verhältnisse von
15 Stamm zu Stamm bei den jeweiligen Isolaten kann man eine
Anpassung bezüglich konservativer Substitutionen und eine
Auswahl unter Alternativen mit nicht-konservativen Sub-
stitutionen vornehmen. Diese Peptide kann man, um die HIV-
Antigenproduktion in vitro oder in vivo zu inhibieren oder
20 eliminieren, als Immungene für den Nachweis des Virus oder
von Antikörpern gegen das Virus in einer physiologischen Probe
einsetzen. In Abhängigkeit von der Art des Schemas kann man
die Peptide an einen Träger oder an andere Verbindungen
konjugieren, die markiert oder unmarkiert, an eine feste
25 Oberfläche gebunden etc. vorliegen.

Gemäß einer Ausführungsform stammen die erfindungsgemäßen
Peptide von dem gp120-Bereich des Virus. Von besonderem
Interesse ist der Bereich innerhalb des env-open-Leserasters
30 der sich etwa vom Basenpaar (bp) 6688 bis etwa bp6750 und
etwa vom bp7246 bis etwa 7317 erstreckt. Die hier
interessierenden Peptide, einschließlich blockierender Peptide,
umfassen wenigstens 5, manchmal 6, manchmal 8, manchmal 12,
manchmal 21, häufig weniger als etwa 50, insbesondere weniger
35 als etwa 35 und vorzugsweise weniger als etwa 25 Aminosäuren
in einer Sequenz, die durch ein HIV-Retrovirus kodiert ist.

- 1 Wünschenswerterweise sind die Peptide so klein wie möglich,
enthalten aber dennoch im wesentlichen die gesamte Immuno-
reaktivität oder antivirale Aktivität eines größeren Peptids.
In einigen Fällen kann es wünschenswert sein, zwei oder
5 mehrere nicht-überlappende Oligopeptide zu verbinden, um
eine einzige Peptidstruktur zu bilden, oder sie als einzelne
Peptide gleichzeitig zu verwenden, wobei diese Peptide separat
oder zusammen eine äquivalente Sensibilität des Ausgangsmaterials
besitzen.
- 10 Die Peptide kann man durch Einführen konservativer oder
nicht-konservativer Substitutionen modifizieren, wobei im
allgemeinen weniger als 20 %-Punkte, insbesondere weniger als
10 %-Punkte der Aminosäuren ausgetauscht werden. Wenn poly-
morphe Bereiche vorliegen, kann es wünschenswert sein, eine
15 oder mehrere bestimmte Aminosäuren zu ändern, um die unter-
schiedlichen Epitope der verschiedene Retrovirusstämme wirk-
samer nachahmen zu können. Häufig wird man Methionin durch
Norleucin (Nor) ersetzen, um eine chemische Stabilität zu
erzielen.
- 20 Es ist darauf hinzuweisen, daß das erfindungsgemäß zur An-
wendung kommende Peptid nicht mit einer bestimmten HIV-Poly-
peptidsequenz identisch sein muß, solange die in Rede
stehende Verbindung in der Lage ist, eine immunologische
25 Kompetition mit den Proteinen von wenigstens einem Stamm des
HIV-Retrovirus herbeizuführen. Die in Rede stehenden Peptide
können deshalb auf vielfältige Weise geändert werden, bei-
spielsweise durch Insertionen, Deletionen und Substitutionen
in konservativer oder nicht-konservativer Weise, wenn der-
30 artige Änderungen Anwendungsvorteile nach sich ziehen. Mit
einer konservativen Substitution sind Substitutionen gemeint,
innerhalb der Gruppen, wie gly, ala; val, ile leu; asp, glu;
asn, gln; ser, thr; lys, arg; phe, tyr; und nor, met.
Üblicherweise unterscheidet sich die Sequenz um nicht mehr als
35 20 % von der Sequenz wenigstens eines Stammes eines HIV-
Retrovirus, außer wenn weitere Aminosäuren an den beiden

1 Termini hinzugefügt werden können, um einen "Arm" zur Ver-
fügung zu stellen, mit Hilfe dessen das erfindungsgemäße
Peptid in einfacher Weise immobilisiert werden kann. Die
Arme sind üblicherweise wenigstens eine Aminosäure lang und
5 können 50 oder mehr Aminosäuren, häufiger 1 bis 10 Amino-
säuren, lang sein.

Das Peptid, dessen Aminosäuresequenz durch Substitution,
Addition oder Deletion von Aminosäureresten modifiziert ist,
10 sollte im wesentlichen die gesamte Immunoreaktivität oder
antivirale Aktivität der unmodifizierten Peptide beibe-
halten. Dies kann auf einfache Weise anhand verschiedener,
hier beschriebener Assays bestimmt werden. Gewünschten-
falls kann man das d-Isomer einer oder mehrerer Aminosäuren
15 verwenden, um die biologischen Eigenschaften, wie die
Aktivität, Abbaurate und dergleichen, zu modifizieren.

Darüber hinaus kann man eine, zwei oder mehrere Aminosäuren
zur leichteren Verbindung der Peptide aneinander an die
20 Termini eines Oligopeptids oder Peptids anfügen und zwar
zur Kopplung an einen Träger oder ein größeres Peptid, aus
den nachfolgend erläuterten Gründen, zur Modifizierung
der physikalischen oder chemischen Eigenschaften des Peptids
oder Oligopeptids oder dergleichen.

25 Aminosäuren, wie Tyrosin, Cystein, Lysin, Glutaminsäure
oder Asparaginsäure oder dergleichen, kann man an C- oder
N-Terminus des Peptids oder Oligopeptids einführen, um eine
geeignete Funktionalität zur Verknüpfung zu schaffen.
30 Cystein ist besonders bevorzugt zur Erleichterung einer ko-
valenten Bindung an andere Peptide oder zur Bildung von
Polymeren durch Oxidation.

Darüber hinaus können sich die Peptid- oder Oligopeptid-
35 sequenzen von der natürlichen Sequenz durch eine Sequenz

1 unterscheiden, die durch terminale NH_2 -Acylierung, bei-
spielsweise Acetylierung oder Amidierung mit Thioglykol-
säure, terminale Carboxyamidierung, beispielsweise mit
5 Ammoniak oder Methylamin, modifiziert sind, um eine bessere
Stabilität, erhöhte Hydrophobizität für eine Verbindung mit
oder Bindung an einen Träger oder ein anderes Molekül oder
für eine Polymerisation zu erzielen.

Eine bevorzugte Ausführungsform der oben beschriebenen
10 Peptide I bis VIII und IX bis XV, wenn Y oder Y' vorhanden
sind, liegt beispielsweise dann vor, wenn Y oder Y' einen
oder mehrere Cysteinreste oder eine Kombination von einem
oder mehreren Cysteinresten mit Spacer-Aminosäuren umfassen.
Glycin ist ein besonders bevorzugter Spacer. Bevorzugte
15 Peptide zur Anwendung bei der oxidativen Polymerisation
sind diejenigen, bei denen Y oder Y' wenigstens zwei
Cysteinreste bedeuten. Wenn zwei Cysteinreste am gleichen
Ende des Peptids vorhanden sind, liegt eine bevorzugte Aus-
führungsform dann vor, wenn die Cysteinreste durch 1 bis
20 3 Spacer-Aminosäurereste, vorzugsweise Glycin, getrennt sind.
Die Anwesenheit von Cysteinresten kann die Bildung von
Peptiddimeren ermöglichen und/oder die Hydrophobizität des
erhaltenen Peptids erhöhen, was die Immobilisierung des
Peptids an Festphasen- oder immobilisierten Assaysystemen
25 erleichtert.

Von besonderem Interesse ist der Gebrauch der Mercaptan-
gruppen der zur Acylierung der terminalen Aminogruppen ver-
wendeten Cysteine oder Thioglykolsäuren oder dergleichen
30 zur Verknüpfung von zwei Peptiden oder Oligopeptiden oder
Kombinationen davon über eine Disulfidbrücke oder eine
längere Brücke, um Polymere zu bilden, die eine Reihe von
Epitopen enthalten. Derartige Polymere besitzen den Vorteil
einer verstärkten immunologischen Reaktion. Wenn unter-
35 schiedliche Peptide zur Herstellung des Polymers verwendet
werden, besitzen sie zusätzlich die Fähigkeit, Antikörper

1 zu induzieren, die mit einigen Antigen-Determinanten ver-
schiedener HIV-Isolate immuno-reagieren.

5 Für die Bildung antigener Polymere (synthetische Multimere)
kann man Verbindungen mit bis-Haloacetylgruppen, Nitro-
arylhalogenide oder dergleichen einsetzen, wobei die
Reagentien spezifisch für Thiogruppen sind. Die Ver-
knüpfung zwischen zwei Mercaptogruppen von verschiedenen
10 Peptiden oder Oligopeptiden kann somit eine Einfachbindung
oder ein Bindeglied von wenigstens 2 , üblicherweise
wenigstens 4 und nicht mehr als etwa 16, üblicherweise
nicht mehr als etwa 14 Kohlenstoffatome sein.

15 Die hier in Rede stehenden Peptide kann man gebunden an
einen löslichen makromolekularen Träger (beispielsweise
nicht weniger als 5 kDal) einsetzen. Zweckmäßigerweise ist
der Träger eine natürlich vorkommende oder synthetische
Poly(aminosäure) gegen die Antikörper im Humanserum un-
wahrscheinlich sind. Beispiele derartiger Träger sind
20 Poly-L-Lysin, Keyhole-Limpet-Hemocyanin, Thyroglobulin,
Albumine, wie Rinderserumalbumin, Tetanustoxoid etc.. Die
Wahl des Trägers ist zur Hauptsache abhängig vom beab-
sichtigten Anwendungszweck für das Antigen und richtet sich
nach der Zweckmäßigkeit und Verfügbarkeit des Trägers. Bei
25 derartigen Konjugaten liegt wenigstens 1 Molekül wenigstens
eines Peptids pro Makromolekül und nicht mehr als 1 pro
0,5 kDal, üblicherweise nicht mehr als etwa 1 pro 2 kDal des
Makromoleküls, vor. Man kann 1 oder mehrere unterschiedliche
Peptide an das gleiche Makromolekül binden.

30 Die Verbindung erfolgt in üblicher Weise unter Verwendung
von Reagentien, wie p-Maleimidobenzoessäure, p-Methyl-
dithiobenzoessäure, Maleinsäureanhydrid, Bernsteinsäurean-
hydrid, Glutaraldehyd etc. Die Bindung kann am N-Terminus,
35 C-Terminus oder zwischen den Enden des Moleküls erfolgen.

- 1 Das Peptid kann man durch Verknüpfung derivatisieren,
kann während es an einem Träger gebunden ist, verknüpft
werden oder dergleichen.
- 5 Um die Anwesenheit von Antikörpern gegen retrovirale Proteine
oder von retroviralen Proteinen selbst nachzuweisen, kann man nach ver-
schiedenen, dem Fachmann geläufigen Assay-Verfahren vor-
gehen. Von besonderem Interesse ist es, das Peptid als
markiertes Reagens zu verwenden, wobei das Markierungs-
10 mittel ein nachweisbares Signal liefert, oder das Peptid
direkt oder indirekt an eine Oberfläche zu binden, wobei der
Antikörper gegen das Peptid in der Probe an das Peptid an
der Oberfläche gebunden wird. Die Anwesenheit eines Human-
Antikörpers, der an das Peptid gebunden ist, kann dann
15 unter Verwendung eines xenogenen Antikörpers, der spezifisch
für Humanimmunoglobulin, normalerweise sowohl Human-
IgM als auch IgG, ist oder eines markierten Proteins er-
folgen, das spezifisch für Immunkomplexe ist, beispielsweise
der Rf-Faktor von S. Aureus-Protein-A.
- 20 Ein Beispiel für ein Assay-Verfahren ist die Verwendung
eines Probenbehälters, beispielsweise die Vertiefungen von
Mikrowellplatten, wobei das Polypeptid oder die Konjugate
davon am Boden und/oder an den Wänden des Behälters kovalent
25 oder nicht-kovalent adsorbiert sind. Die Probe, normaler-
weise Humanblut oder -serum, verdünnt mit einem geeigneten
Puffermedium, gibt man in den Behälter und läßt ausreichend
Zeit vergehen bis die Komplexbildung zwischen dem (den)
Polypeptid(en) und einem entsprechenden Antikörper in der
30 Probe erfolgt ist. Man entfernt den Überstand und wäscht
den Behälter zur Entfernung von nicht-spezifisch gebundenen
Proteinen. Zum Nachweis verwendet man ein markiertes
spezifisch bindendes Protein, das spezifisch an den Komplex
bindet, wie beispielsweise xenogenes Antiserum gegen Human-
35 immunoglobulin.

1 Das Peptid kann auf vielfältige Weise hergestellt werden.
Das Peptid kann aufgrund seiner relativ geringen Länge in
Lösung oder an einem festen Träger gemäß herkömmlichen
Verfahren synthetisiert werden. Verschiedene automatische
5 Synthetisiergeräte sind im Handel erhältlich und können in
bekannter Weise angewendet werden, siehe beispielsweise
Stewart und Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2. Aufl.,
Pierce Chemical Co., 1984; und Tam et al., J. Am. Chem.
Soc. (1983) 105:6442.

10 In alternativer Weise kann man von der Hybrid-DNA-Technologie
Gebrauch machen, bei der man ein synthetisches Gen unter
Anwendung von Einzelsträngen, welche für das Polypeptid
kodieren, oder von im wesentlichen Komplementärsträngen da-
15 von herstellt, wobei die Einzelstränge überlappen und in
einem annealing - Medium zusammengebracht werden können, um
zu hybridisieren. Die hybridisierten Stränge kann man dann
zu einem vollständigen Gen ligieren und das Gen durch Wahl
geeigneter Termini in heute leicht erhältlichen Expressions-
20 vektoren insertieren, siehe beispielsweise Maniatis et al.,
Molecular Cloning, A Laboratory Manual, CSH, Cold Spring
Harbor Laboratory, 1982. Oder man kann den Bereich des
viralen Genoms, der für das Peptid kodiert durch her-
kömmliche rekombinante DNA-Techniken klonieren und
25 exprimieren (siehe oben Maniatis et al.).

DNA-Codesequenzen von LAV_{BRU} und ARV 2-Isolaten von HIV,
die zur Expression der Peptide verwendet werden können,
umfassen die folgenden:

30

35

1 LAV_{PRU} TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT
 ATC CGT ATC CAG AGG GGA CCA GGG AGA GCA TTT
 GTT ACA ATA GGA AAA ATA GGA AAT ATG AGA CAA
 GCA CAT TGT
 5 ARV-2 TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT
 ATC TAT ATA GGA CCA GGG AGA GLA TTT CAT ACA
 ACA GGA AGA ATA ATA GGA GAT ATA AGA AAA GCA
 CAT TGT

10

Zur Expression von Peptidfragmenten kann man Fragmente einer Sequenz verwenden. Man kann konservative Basenänderungen, wobei der (die) modifizierte Kodon(s) für die gleiche Aminosäure(n) kodiert (kodieren), oder nicht konservative Basenänderungen in der Kodierungssequenz durchführen, wobei die erhaltene Aminosäure eine konservative oder nicht-konservative Änderung in der Aminosäuresequenz sein kann, was oben beschrieben wurde.

20

Die Codesequenz kann am 5'- oder 3'-Terminus oder an beiden verlängert werden, um das Peptid zu verlängern, jedoch unter Beibehaltung der epitopen Stelle(n). Die Verlängerung kann dazu dienen, einen Arm zur Anknüpfung beispielsweise an ein Markierungsprodukt, wie ein Enzym, zu schaffen, zwei oder alle Peptide zusammen in der gleichen Kette zu verbinden, Antigen-Aktivität und geeignete Restriktionsstellen zum Klonen zur Verfügung zu stellen oder dergleichen.

25

Die DNA-Sequenz selbst, die Fragmente davon oder größere Sequenzen, üblicherweise wenigstens 15 Basen, vorzugsweise wenigstens 18 Basen, kann man als Nukleotidsonden zum Nachweis von retroviraler RNA oder proviraler DNA oder zur Identifizierung homologer Regionen für das Klonieren oder Sequenzieren verwenden. Es sind zahlreiche Methoden beschrieben, wie die Grunstein-Hogness-Methode, Southern-Methode,

30

35

- 1 Northern-Methode, Dot-blot, Verbesserungen davon sowie
andere Methoden, wie diejenigen, die in der US-PS 4 358 535,
worauf hiermit Bezug genommen wird, beschrieben sind.
- 5 Die erfindungsgemäßen Peptide, einschließlich der
blockierenden Peptide und ihre Analoga finden allein oder
in Kombination in Vakzinen Anwendung. In ähnlicher Weise
kann man in Vakzinen auch anti-idiotypen Antikörper ver-
wenden, d.h. Antikörper, die mit dem Idiotypen der er-
10 findungsgemäßen Antikörper reagieren und dabei Epitope ent-
halten, die die neutralisierenden HIV-Bereiche nachahmen.
Die Peptide oder anti-idiotypen Antikörper kann man in
herkömmlicher Weise formulieren, im allgemeinen in Konzentra-
tionen im Bereich von 1 µg bis 20 mg/kg des Wirts.
- 15 Physiologisch annehmbare Medien kann man als Träger ver-
wenden, beispielsweise steriles Wasser, Kochsalzlösung,
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung und dergleichen. Man kann
Adjuvantien einsetzen, wie Aluminiumhydroxidgel, grenz-
flächenaktive Substanzen, wie Lysolecithin, Pluronic-
20 polyole, Polyanionen, Peptide, Proteine (z.B. Diphtherie
und Choleratoxin) und Ölemulsionen. Die Peptide kann man zur
Anwendung in Vakzinformulierungen auch Liposomen einver-
leiben oder an Polysaccharide, Polypeptide oder Polymere
konjugieren. Die Verabreichung kann durch Injektion er-
25 folgen, beispielsweise intramuskulär, peritoneal, subkutan,
intravenös etc. Die Verabreichung einer immunogen wirksamen
Dosis kann einmal oder mehrfach erfolgen, üblicherweise
in Zeitabständen von 1 bis 4 Wochen. Eine "immunogen wirk-
same Dosis" ist diejenige Menge eines Vakzins, die geeignet
30 ist, eine Immunantwort in einem Wirt auszulösen, wobei der
Wirt eine gesteigerte Infektion zeigt.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne
sie zu begrenzen.

1 Beispiel I5 Erzeugung und Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Beispiel I beschreibt die Erzeugung von Hybridzelllinien, die monoklonale Antikörper produzieren, welche spezifisch für HIV-Hüllglykoproteine sind. Dieses Verfahren umfaßt die Anwendung von Lektin-gereinigten Extrakten von LAV_{BRU'}, das an lentile Lektinagarose als Immunogen gebunden ist. Die anschließend durch die Hybridzelllinien erzeugten monoklonalen Antikörper sind charakterisiert durch ihre Fähigkeit gp110 aus gereinigtem LAV zu immunoblotten und in einem Radioimmun-Assay zu präzipitieren sowie als biologisch exprimiertes rekombinantes Fusionsprotein. Die monoklonalen Antikörper, die an die Epitope an gp110 binden, reagieren auch in ELISA's mit zerstörten ganzen Viren, Fusionsproteinen und synthetischen Peptiden und reagieren mit ganzen Viren in indirekten Fluoreszenz-Assays.

Die Erzeugung der monoklonale Antikörper produzierenden Hybridzelllinien und die Charakterisierung der Antikörper erfolgen folgendermaßen:

25 LAV-Viren, die von infizierten CEM-Zellen (ATCC Nr. CRL 8904) gereinigt waren, wurden in 50 mM Tris, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 1,0 % Aprotinin, 2,0 % Nonidet P-40^(R) (NP-40) (Octylphenoxypolyethoxyethanol) zerstört. Der Extrakt wurde 2 x durch Zentrifugieren geklärt und auf 0,5 % NP-40 durch Zugabe von 3 Volumina Disruptionspuffer ohne NP-40 eingestellt. Lentile Lektinsepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.) wurde in Disruptionspuffer ohne NP-40 vorgewaschen und anschließend in Adsorptionspuffer (50 mM Tris, pH 7,4, 0,15 M NaCl., 1,0 % Aprotinin, 0,5 % NP-40) äquilibriert. 30 Der geklärte Virusextrakt wurde mit lentiler Lektin-

1 sepharose 42 h bei 4°C adsorbiert. Unadsorbiertes Material
wurde durch Waschen mit überschüssigem Adsorptionspuffer
entfernt. Die Eluierung des adsorbierten Materials erfolgte
mit 0,2 M α -Methylmannosid in Adsorptionspuffer. Das
5 Eluat wurde gegen PBS zur Entfernung des Zuckers dialysiert
und das Material wurde erneut an lentiler Lektirsepharose
adsorbiert.

Der Glykoprotein-lentile Lektinsepharose-Komplex wurde
10 dazu verwendet, BALB/c-Mäuse mittels drei intraperitonealen
Injektionen ohne Adjuvans, die in Abständen von 2 bis 3
Wochen gegeben wurden, zu immunisieren. Die Milz der
immunisierten Mäuse wurde entfernt. Es zeigen sich mittels
Immunoblot-RIP und/oder ELISA zirkulierende Antikörper
15 gegen Glykoproteine.

Zur Erzeugung von Zelllinien arbeitete man im allgemeinen
nach den Vorschriften von Kohler und Milstein (Nature
256:495 (1985)) mit den Modifizierungen von L.C. Gold-
20 stein et al., (Infect. Immun. 38:273 (1982)). Die
B-Lymphocyten der Milz aus den immunisierten Mäusen wurden
mit NS-1-Myelomzellen unter Verwendung von 40 % (W/V)
Polyethylenglykol fusioniert. Im Anschluß an die Fusionierung
wurde die Zellmischung erneut in HAT-Medium (RPMI-1640
25 ergänzt mit 15 % fötalem Kälberserum, 1×10^{-4} M Hypoxan-
thin, 4×10^{-7} M Aminopterin und $1,6 \times 10^{-5}$ M Thymidin)
suspendiert, um für das Wachstum der Hybridzellen zu
selektieren und anschließend auf 96-Well-Mikrokulturplatten
bei einer Konzentration von 1 bis 3×10^{-6} Zellen/ml ge-
30 geben und bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre, die
6 % CO₂ enthält, inkubiert. Die Kulturen wurden ernährt,
indem die Hälfte des Überstandes durch frisches HAT-Medium
ersetzt wurde. Die Vertiefungen (wells) wurden unter Ver-
wendung eines Planktonmikroskops auf Anzeichen von Zell-
35 proliferation beobachtet und sobald die Zellen eine aus-

1 reichende Dichte besaßen, wurden die Überstände auf Anti-LAV-Antikörper getestet.

5 Diejenigen Wells, die Antikörper gegen LAV produzierende Hybridzellen enthalten, wurden durch ELISA's identifiziert, wobei die Bindung an gereinigte, zerstörte Ganzviren, oder biologisch exprimierte Fusionsproteine bestimmt wurde. Die ELISA-Assays unter Anwendung zerstörter Viren wurden an LAV EIA-Platten (Genetic Systems, Seattle, Washington)

10 durchgeführt. Die Platten wurden mit Zellkulturflüssigkeit bei 37°C 45 Min. inkubiert und anschließend 3 x mit 0,05 % Tween 20 in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-Tween) gewaschen.

15 Peroxidase-Ziege-Anti-Maus-IgG (1:2.000 Verdünnung in PBS-Tween; Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, California) wurde zugegeben (100 µl pro Well) und die Platten wurden 45 Min. bei 37°C inkubiert und wie oben gewaschen. Es wurde Substrat zugegeben (0,025 M Zitronensäure, 0,05 M

20 dibasisches Natriumphosphat, pH 5, enthaltend 14 mg o-Phenylen-diamin und 10 µl 30%-iges Wasserstoffperoxid pro 50 ml) und die Platten wurden 30 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 3 N Schwefelsäure gestoppt und die kolorimetrischen Reaktionen wurden mit

25 einem automatischen Mikroplattenlesegerät quantitativ bestimmt. Diejenigen Vertiefungen, die positive Ergebnisse erbrachten, wurden durch Grenzverdünnung subkloniert, erneut auf Spezifität getestet und anschließend expandiert.

30 Die von den daraus resultierenden Hybridzelllinien sekretierten monoklonalen Antikörper wurden weiterhin hinsichtlich Spezifität und Reaktivität mittels Immunoblotting, Immuno-präzipitation und ELISA unter Anwendung zerstörter LAV-Viren, rekombinanter LAV-Fusionsproteine und synthetischer LAV-Peptide charakterisiert. Es zeigte sich, daß andere Anti-

35 körper vom IgG₁-Isotyp waren. Die Zelllinien HIV-gp110-1,

1 HIV-gp110-2 und HIV-gp110-3 wurden bei der American Type
Culture Collection vor Einreichen dieser Anmeldung hinter-
legt und haben die Hinterlegungs-Nrn. ATCC HB 9175,
HB9176 und HB9177 erhalten.

5

Die auf ihre Reaktivität getesteten rekombinanten Fusions-
proteine wurden als ENV2, ENV3, ENV4 und ENV5 bezeichnet.
Das Protein ENV2 wird aus pENV2 (ATCC Nr. 53071) exprimiert und
umfaßt den LAV-Bereich vom Basenpaar (bp) 6598 bis bp
10 ,178 (Numerierung gemäß Wain-Hobson et al., Cell 44:9
(1985). ENV3 wird aus pENV3 (ATCC Nr. 53072) exprimiert und
umfaßt den LAV-Bereich von bp 7178 bis bp 7698. ENV4 wird
aus pENV4 (ATCC Nr. 53073) exprimiert und umfaßt bp 7698
bis bp 8572. ENV5 wird aus pENV5 (ATCC Nr. 53074) exprimiert
15 und umfaßt den LAV-Bereich von bp 5889 bis bp 7698. Die
Produktion der rekombinanten Fusionsproteine ist detailliert
in der USSN 721 237 beschrieben, worauf hiermit Bezug ge-
nommen wird.

20 Assembly synthetischer Peptide

Die Peptide I (29) und VIII (110-2-2) wurden an einem
Benzhydrylaminharz (Polystyrol/Divinylbenzol (Applied
Biosystems, Inc., Foster City, California) zusammengebaut.
25 Peptid V (177) wurde an einem t-Butyloxycarbonyl(Boc)-
ethylbenzylcystein-phenylacetamidomethyl-(PAM)-polystyrol/
divinylbenzolharz zusammengebaut. Kopplungen mit symmetrischem
Anhydrid wurden in einem Applied Biosystems 430A-
Synthesisiergerät durchgeführt. Cystein wurde als erster
30 Rest den beiden Peptiden zugegeben.

Kopplungen mit Dicyclohexylcarbodiimid in Anwesenheit von
Hydroxylbenzotriazol wurden für Asparagin und Glutamin ver-
wendet. Als Schutzgruppen kamen Seitenketten auf Benzyl-
35 gruppenbasis und Boc- α -Amingruppen zur Anwendung. Weitere

1 routinemäßig eingesetzte Seitenkettenschutzgruppen waren
Boc(Formyl)-tryptophan, Boc-Methioninsulfoxid, Boc(tosyl)-
arginin, Boc(methylbenzyl)cystein, Boc(tosyl)-histidin,
5 Boc(chlorbenzyloxycarbonyl)lysin und Boc(brombenzyloxy-
carbonyl)tyrosin.

Die Radiomarkierung der Peptide erfolgte durch Acetylierung
des Aminoterminus mit ^3H -Essigsäure und einem Überschuß an
Dicyclohexylcarbodiimid.

10

Entfernung der Schutzgruppen und Abspaltung des Peptids vom
Harz erfolgte gemäß dem Tam "low-high" HF-Verfahren (Tam
et al, siehe oben). Die Extraktion vom Harz wurde mit
5%-iger Essigsäure durchgeführt und der Extrakt wurde
15 einer Gelfiltrations-Chromatographie in 5%-iger Essigsäure
unterzogen.

Zu den synthetischen HIV-Peptiden, die auf Reaktivität mit
den monoklonalen Antikörpern getestet wurden, zählten die
20 Peptide 29, 36 und 39. Das Peptid 29 ist durch den LAV_{BRU}-
Genombereich von etwa bp 6688 bis bp 6750 kodiert; das
Peptid 36 ist durch den Bereich von etwa bp 7246 bis bp 7317
kodiert; und das Peptid 39 ist durch den Bereich von etwa
bp 7516 bis bp 7593 kodiert. Die Peptide 36 und 39 sind
25 detailliert in der US-PS 4 629 783 beschrieben, auf die
hiermit Bezug genommen wird.

Die blockierenden Peptide IX-XV wurden im wesentlichen wie
oben beschrieben an einem Methyl-benzhydrylaminharz
30 (Polystyrol/Divinylbenzol) (Applied Biosystems, Inc. Foster
City, California) zusammengebaut. Kopplungen mit symmetrischem
Anhydrid wurden an einem Applied Biosystems 430A-
Synthetisiergerät durchgeführt. Für Asparagin wurden
Kopplungen mit Dicyclohexylcarbodiimid in Anwesenheit von
35 Hydroxybenzotriazol verwendet. Als Schutzgruppen wurden Seiten-

ketten auf Benzylgruppenbasis und boc- α -Amin-Schutzgruppen verwendet, wohingegen Boc(brombenzyloxycarbonyl) spezifisch für Tyrosin-Seitenketten verwendet wurde. Eine Acetylierung erfolgte, soweit vorhanden, unter Anwendung von Acetanhydrid oder Eisessig und Dicyclohexylcarbodiimid. Die Entfernung der Schutzgruppen und die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte gemäß dem "high" HF-Standardverfahren (Stewart et al., siehe oben). Die Extraktion vom Harz erfolgte mit 50%-iger Essigsäure und der Extrakt wurde anschließend einer Gelfiltrations-Chromatographie in 20%-iger Essigsäure unterzogen. Gewünschtenfalls wurde eine Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie an einer Vydac-C18-Säule (Rainin Instrument Co., Emeryville, CA) unter Anwendung eines 0,1% Trifluoressigsäure-Acetonitril-Gradienten durchgeführt.

Immunoblotting

Die Charakterisierung mittels Immunoblotting erfolgte an Clonüberständen oder Ascitesflüssigkeit unter Anwendung gereinigter LAV-Viren und rekombinanter Fusionsproteine als Antigene. Die Antigene wurden zunächst mittels Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese (7,0 - 15,0 %) getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran (NCM) mittels 4-stündiger Elektrophorese bei 25 V in 25 mM Natriumphosphat (pH 7,0) transferiert. Nach der Übertragung wurde die NCM durch 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur in PBS-Tween oder Blotto (5% fettarme Trockenmilch in PBS) blockiert, um nicht-spezifische Interaktionen zu verhindern. Die NCM wurde mit Zellkulturüberstand oder Ascitesflüssigkeit, verdünnt in PBS-Tween, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und 3 x mit PBS-Tween gespült. In der zweiten Stufe wurde die NCM mit Ziege-anti-Maus-IgG-Meerrettichperoxidase, verdünnt in PBS-Tween, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurde mit PBS-Tween gewaschen, gefolgt von 20-minütigem Eintauchen in Meerrettichperoxidase-Farbenentwicklungslösung (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California).

1 Die Reaktion wurde durch Eintauchen in entsalztes Wasser
gestoppt. Die monoklonale Antikörper-Aktivität wurde mit
einem positiven Kontrollserum, das mit gereinigten zer-
störten Viren oder exprimierten Fusionsproteinen reagiert,
5 verglichen. Es zeigte sich, daß unter Anwendung zerstörter
Viruspräparate alle Antikörper an gp110 oder dessen
Prekursormolekül gp150 banden. Die Antikörper 110-1 und
110-2 erkannten auch das Fusionsprotein ENV3, wohingegen
die Antikörper 110-3, 110-4, 110-5 und 110-6 ENV2 in einen
10 Immunokomplex überführen.

Immunpräzipitation

15 Virusextrakte für die Radioimmun-Präzipitation wurden aus
CEM-Zellen hergestellt, die mit LAV_{BRU}-HIV-Isolat in-
fiziert waren, das durch kontinuierliche Passage dem
lytischen Wachstum angepaßt wurde. Sobald sich frühe
cytopathische Effekte zeigten, wurden die Zellen auf
markierende Medien übertragen, die ³⁵S-Methionin
20 (0,05 mCi/ml) oder ³[H]-Glucosamin (0,025 mCi/ml) ent-
hielten, anschließend 24 h inkubiert, bis die meisten Zellen
lysiert hatten und das Virus in den Kulturüberstand frei-
setzten. Die Viren wurden aus dem zellfreien Überstand
pelletiert (1 h bei 100.000 xg) und Detergenzextrakte wurden
25 in P-RIPA-Puffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, die
1,0 % Triton X-100, 1,0 % Deoxycholat, 0,1 % SDS und 1 %
Aprotinin enthält) hergestellt. Ähnliche Extrakte wurden
von den Überständen von uninfizierten CEM-Zellen herge-
stellt.

30 Immunopräzipitations-Assays wurden mit 100 µl Virusextrakt
durchgeführt, der 1 h auf Eis mit 100 µl Kulturüberstand
von den Hybridzelllinien inkubiert wurde. 4 µl Kaninchen-
Anti-Maus-Ig (Zymed Laboratories, So. San Fransisco,
35 California) wurden zu jeder Probe gegeben und 30 Min. in-
kubiert. Zu jeder Probe wurde Immuno-Präzipitin (100 µl;

1 Bethesda Research Laboratory, Bethesda, Maryland), das in
P-RIPA-Puffer resuspendiert wurde, welcher 1 % Ovalbumin
enthält, gegeben und weitere 30 Min. inkubiert. Die ge-
bundenen Komplexe wurden gewaschen und mittels SDS-Poly-
5 acrylamid-Gelelektrophorese (15,0 % Acrylamid: DATD-Gel)
aufgetrennt. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die
Gele fixiert, in Enhance (New England Nuclear; Boston,
MA) eingeweicht, getrocknet und mit einem Kodak XR-5-Film
in Kontakt gebracht. Ein positives Referenzserum, das mit
10 allen HIV-Virusproteinen ein Immunopräzipitat ergibt, wurde
als positive und negative Kontrolle mit Virus-infizierten
und schein-infizierten CEM-Zellüberständen zur Reaktion
gebracht.

15 Die Ergebnisse zeigen, daß alle sechs monoklonalen Anti-
körper spezifisch gp110 und gp150 immunopräzipitierten.

Enzym-Linked-Immunoabsorbant-Assay

20 Um die von den erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern
erkannten gp110-Epitope zu kartieren, wurden die Kultur-
überstände aus Hybridzelllinien oder Ascitesflüssigkeit
weiter durch die Reaktivität in ELISA-Assays mit bio-
logisch exprimierten Fusionsproteinen und synthetischen
25 Peptiden charakterisiert. Die Verfahren waren die gleichen wie die
oben beschriebenen, mit der Ausnahme, daß die Fusions-
proteine oder synthetischen Peptide die gereinigten Viren
als Antigene ersetzten, welche an die Oberfläche der Mikro-
titerwells adsorbiert sind.

30 Bei der Verwendung von Peptiden als Antigen arbeitete man
nach folgendem Verfahren. Die lyophilisierten Peptide wurden
in 6 M Guanidin-HCl gelöst. Unmittelbar vor Plattieren in
die 96-Well-Platten wurde die Guanidinlösung in 0,05 M
35 Carbonat/Bicarbonat-Puffer (pH 9,6) auf eine Peptid-

1 endkonzentration von bis zu 100 µg/ml verdünnt. 50 µl des
verdünnten Peptids wurden in jede Mikrotiter-Vertiefung
gegeben. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei
4°C inkubiert. Überschüssige Peptidlösung wurde "ausge-
5 schüttelt", die Platten wurden mit Blotto blockiert und
der weitere ELISA-Assay erfolgte gemäß dem oben be-
schriebenen Verfahren. In ähnlicher Weise wurde rekombinantes
Protein auf eine Endkonzentration von etwa 2 µg/ml in
0,05 M Carbonat/Bicarbonat-Puffer (pH 9,6) verdünnt und das
10 gleiche Verfahren wiederholt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle II gezeigt. Die von den
Zelllinien HIV-gp110-1 und HIV-gp110-2 produzierten
monoklonalen Antikörper reagierten mit ENV3, ENV5,
15 Peptid 36 und zerstörten Viren. Die Antikörper von den
Zelllinien HIV-gp110-3, HIV-gp110-4, HIV-gp110-5 und
HIV-gp110-6 reagierten mit ENV2 und Peptid 29 sowie mit
zerstörten Viren.

20 TABELLE II

ELISA-Assays, die die Reaktivität der monoklonalen Anti-
körper mit rekombinanten Proteinen und synthetischen
Peptiden zeigen

25

	Rekombinantes Fusionsprotein					Synthetische Peptide			LAV	CEM
	<u>ENV2</u>	<u>ENV3</u>	<u>ENV4</u>	<u>ENV5</u>	<u>29</u>	<u>36</u>	<u>39</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>Kontrolle</u>	
30	110-1	0.077	3.000	0.113	3.000	ND	2.421	0.054	0.908	0.125
	110-2	-0.003	3.000	0.000	3.000	ND	2.305	-0.005	1.214	0.009
	110-3	3.000	0.011	ND	ND	3.000	ND	0.017	0.363	0.046
	110-4	3.000	0.020	ND	ND	3.000	ND	0.016	0.383	0.067
	110-5	3.000	0.014	ND	ND	3.000	ND	0.016	0.368	0.025
35	110-6	3.000	0.033	ND	ND	1.937	ND	0.017	0.486	0.032

1 Die in Tabelle II zusammengestellten Ergebnisse zeigen,
daß die monoklonalen Antikörper 110-1 und 110-2 eine Anti-
gen-Determinante erkennen, die durch die DNA-Sequenz im
pENV3-Bereich kodiert ist, insbesondere durch den Bereich
5 des HIV-Genoms, der durch eine Sequenz von Aminosäuren im
Peptid 36 definiert ist. D.h., daß die monoklonalen Anti-
körper gp110-1 und 110-2 an einen Peptidbereich von gp110
binden, der in bp 7246 bis 7317 kodiert ist, wie durch die
Bildung von Immunkomplexen mit Peptid 36 und ENV3 gezeigt
10 wird. Dieser Bereich des HIV-Genoms wurde als konserviert
identifiziert, d.h. mit nur geringen Veränderungen in der DNA-
Sequenz in dem Bereich, der durch Peptid 36 bei verschiedenen
Virusisolaten unterschiedlicher geographischer Herkunft
kodiert ist, siehe Starcich et al., Cell 46:637 (1986). Im
15 Gegensatz dazu binden die monoklonalen Antikörper
gp110-3, -4, -5 und -6 an HIV-Peptide, die durch den Be-
reich definiert sind, der durch Peptid 29 von bp6688 bis
etwa bp 6750 kodiert ist. Der Bereich in gp110, der durch
Peptid 29 definiert ist, wurde als Bereich identifiziert,
20 der mehrere Nukleotidsubstitutionen bei verschiedenen Virus-
isolaten enthält. Die monoklonalen Antikörper, die selektiv
gp110-Polypeptide binden, welche konservierte Epitope ent-
halten, wie die Antikörper 110-1 und 110-2, können häufig
besonders brauchbar sein, beispielsweise bei der Affinitäts-
25 Chromatographie etc. Auch bei einem ELISA-Assay reagiert
das Peptid 110-2 mit Sera von der Person, von der LAV-2
isoliert wurde.

Indirekter Immunofluoreszenz-Assay

30 Indirekte Immunofluoreszenz-Assays unter Anwendung mono-
klonaler Antikörper gegen das gp110-Antigen von HIV wurden
an Aceton-fixierten und lebenden Zellen durchgeführt.
Aceton-fixierte Objektträger, die aus LAV-infizierten CEM-
35 Zellen bereiteten wurden, wurden mit verdünntem Kulturüber-

1 stand oder Ascitesflüssigkeit 1 h bei 37°C inkubiert, wo-
hingegen lebende Zellen mit Kulturüberstand oder Ascites-
flüssigkeit 1 h bei 4°C inkubiert wurden, ehe die Zellen auf
die Objektträger gegeben und mit Aceton fixiert wurden.
5 Bei beiden Methoden wurde Fluorescein-Isothiocyant-
markiertes-Anti-Maus-IgG verwendet, um diejenigen Zellen
nachzuweisen, die das reaktive gp110-Antigen aufweisen. Die
monoklonalen Antikörper HIV-gp110-1 ergaben positive Er-
gebnisse sowohl bei Anwendung lebender oder aceton-fixierter
10 LAV-infizierter Zellen.

Beispiel II

15 Neutralisierung der HIV-Infektivität durch Anti-gp110- monoklonale Antikörper

Dieses Beispiel beschreibt und charakterisiert die
Neutralisierung von HIV-Infektivität unter Anwendung
20 monoklonaler Antikörper, die an gp110 und Peptide innerhalb
von gp110 binden. Die Ergebnisse zeigen, daß die Anti-
körper gp110-3, -4, -5 und -6 neutralisierende Aktivität
besitzen und daß gp110-3 und -4 besonders hohe neutralisierende
Aktivität besitzen.

25 Neutralisations-Assay

Ein sensitiver Neutralisations-Assay wurde entwickelt,
um den Effekt der monoklonalen Antikörper auf die HIV-
30 Infektivität quantitativ zu erfassen. Eine CD4+-Zell-
linie, CEM, die besonders empfindlich gegen HIV-Infektionen
ist, wurde als Target-Zelle für Infektivitätsvergleiche ge-
wählt. Ascitesflüssigkeit, hergestellt wie im Beispiel I
beschrieben, oder die IgG-Fraktion davon, die unter An-
35 wendung einer Ammoniumsulfatfällung gereinigt wurde, wurde

1 30 Min. bei 56°C inaktiviert, anschließend in dem erforder-
lichen Maße in RPMI-Medium, das 10 % fötales Kälberserum
enthält, verdünnt. Eine Suspension des HIV-Stammes LAV_{BRU}
wurde von etwa 4 Tage alten CEM-Kulturen in der log-Wachs-
5 tumsphase geerntet, durch einen 0,2 oder 0,45 Mikronfilter
filtriert, in aliquote Teile aufgeteilt und bei -70°C ein-
gefroren. Ein aliquoter Teil wurde aufgetaut, zur Be-
stimmung von TCID₅₀ titriert und anschließend wurden Assays
mit frisch aufgetauten aliquoten Teilen durchgeführt, die
10 im Verhältnis von 1:500 in Kulturmedium auf etwa die
10-fache Konzentration verdünnt wurden, die erforderlich ist,
um 50 % der CEM-Zellen in der Kultur (10 TCID₅₀) zu
infizieren. Die Virussuspension wurde mit dem gleichen
Volumen (250 µl) eines monoklonalen Antikörperpräparates
15 in 5-fach Verdünnungen von 1:5 bis 1:9 765 625 vermischt.
Die Virus/Antikörpermischung wurde 45 Min. bei 37°C in-
kubiert und anschließend von 1:5 bis 1:9 765 625 dupliziert.
Die Virus/Antikörpermischung wurde dann 45 Min. bei
37°C inkubiert. Anschließend wurden duplizierte Proben
20 von 200 µl dazu verwendet, Wells zu inokulieren, die
1 ml mit etwa 2×10^5 -CEM-Zellen pro Well enthielten. Die
Kulturen wurden bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit
5 % CO₂ 14 Tage inkubiert. Die Zellen wurden geerntet,
pelletisiert und mit 1 % Triton-X-100 in PBE etwa 10 Min.
25 lysiert. Die Menge an Viren (oder Virusantigen), die in
den lysierten Zellen vorhanden war, wurde unter Anwendung
eines sensitiven HIV-Antigen-Capture-"Sandwich"-Enzym-
immunoassays wie unten beschrieben quantitativ bestimmt.
Der Titer an neutralisierender Aktivität, soweit vorhanden,
30 wurde als reziproker Wert derjenigen Verdünnung der
monoklonalen Antikörper bestimmt, welche um mehr als 50% die
Antigenproduktion der Viruskontrollkulturen in-
hibiert, welche ohne Antikörper oder mit einem monoklonalen
Antikörper des gleichen Isotyps inkubiert wurden, von dem
35 vorher gezeigt wurde, daß er keine neutralisierende Aktivität
besitzt.

1 Bei dem oben erwähnten HIV-Antigen-Capture-Assay wurden
als Capture-Reagens zwei monoklonale Antikörper gegen
p25-Antigene verwendet. Diese Hybridomzelllinien wurden an-
hand der oben beschriebenen Methoden mit geringfügigen
5 Modifikationen erzeugt, einschließlich der Anwendung eines
gereinigten gag-rekombinanten Fusionsprotein als Immunogen
und der Charakterisierung der erhaltenen monoklonalen
Antikörper hinsichtlich Spezifität und Reaktivität unter
Anwendung der als GAG-1, GAG-2 und GAG-3 bezeichneten re-
10 kombinanten Fusionsproteine und des synthetischen Peptids
141. Das Protein GAG-1 wird aus PGAG-1 (ATCC Nr. 53379)
exprimiert, GAG-2 wird aus pGAG-2 (ATCC Nr. 53111)
exprimiert und GAG-3 wird aus pGAG-3 (ATCC Nr. 53112)
exprimiert. Die Produktion der rekombinanten Fusions-
15 proteine ist detailliert in den USSN 764 460 und 828 828
beschrieben, auf die hiermit Bezug genommen wird. Das
synthetische Peptid 141 wird durch den LAV_{BRU}-Genombereich
kodiert, der den Aminosäureresten 198 bis 242 entspricht.
Die monoklonalen Antikörper, die durch die Hybridomzell-
20 linien p25-2 und p25-3 produziert werden, reagieren mit
den rekombinanten Fusionsproteinen GAG-1, GAG-2 und GAG-3.
Auch die aus p25-3 gewonnenen monoklonalen Antikörper
reagieren mit dem synthetischen Peptid 141.

25 Um den Antigen-Capture-Assay durchzuführen, wurden die
Capture-Reagentien zuerst an einem festen Träger adsorbiert.
Ascitesflüssigkeit, die von den Hybridomzelllinien p25-2 und
p25-3 stammte, wurde 1:5000 in 25 mM Tris-Puffer von pH 8,5
verdünnt. 200 µl wurden in die Vertiefungen von Mikrowell-
30 platten gegeben. Die Vertiefungen wurden versiegelt und
etwa 16 h bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde von den
Platten abgesaugt, ehe eine blockierende Lösung von 0,3 %
Blotto in PBS zugegeben wurde. Das Blockieren erfolgte
15 Min. bei Raumtemperatur. Die blockierende Lösung wurde ab-
35 gesaugt und die Probe wurde zugegeben. 200 µl der lysierten

1 Zellsuspension und 5 µl Detektionskonjugat, hergestellt wie
unten beschrieben, wurden zu jeder Vertiefung gegeben. Die
Wellstreifen oder -platten wurden 2 h bei 37°C inkubiert,
anschließend wurde die Suspension abgesaugt und die Wells
5 wuden 4 x mit Puffer gewaschen (0,05 % Tween 20 in PBS).
Das Detektionskonjugat wurde folgendermaßen hergestellt. Die
monoklonalen Antikörper p25-6 und p26-7 wurden an Meerettich-
peroxidase (HRP) in einem Molverhältnis von 3:1 (Ab:HRP)
3 h unter Anwendung des Periodatoxidationsverfahrens (Nakane
10 et al., J. Histochem. Cytochem. 22:1084 (1974)) konjugiert.
Die Konjugate wurden 1:1500 in 2,5 % (G/V) fettarmer
Trockenmilch, 0,01 Thimerosal und 0,005 % Antifoam A in
20 mM Natriumzitrat verdünnt. Der verbleibende Teil des
ELISA-Assays wurde wie im Beispiel I beschrieben, durchge-
15 führt.

Die Bestimmung der neutralisierenden Aktivität mit den Anti-
körpern gp110-3, -4, -5 und -6 erbrachte folgende Ergebnisse.
Die höchsten Titer mit beibehaltener neutralisierender
20 Aktivität waren: gp110-3 = 15 625; gp110-4 = 9 765 625;
gp110-5 = 125; und gp110-6 = 625.

Aufgrund der vorausgesagten genetischen Variabilität des
durch das Peptid 29 definierten Bereichs wurde die Fähigkeit
25 des monoklonalen Antikörpers gp110-4, andere HIV-Isolate
zu erkennen, untersucht. Die Immunofluoreszenz-Assays wurden
wie oben beschrieben durchgeführt. Der Antikörper gp110-4
konnte Antigen in Kulturen von wenigstens drei von 16 HIV-
Isolaten detektieren.

30 Der Antikörper gp110-4 war in der Lage, Viren zu neutralisieren,
die über einen Zeitraum von 15 Wochen von einem Schimpansen
isoliert wurden, der bei einem AIDS-Impfversuch als Kontroll-
tier mit LAV_{BRU} inokuliert wurde. Der monoklonale Antikörper
35 war in der Lage, die Isolate zu neutralisieren, obwohl das

- 1 Tier Serumantikörper aufwies, die HIV in vitro neutralisierten
und obwohl das Tier eine messbare, zellvermittelte
Immunantwort gegen HIV-Infektion ausgebildet hatte. Dies
zeigt das Fehlen eines Antigen-Drifts in vivo für das
5 Epitop, das durch den gp110-4 Antikörper erkannt wird.

Beispiel III

- 10 Neutralisierung der HIV-Infektivität durch einen Cocktail
von Anti-gp110 und Anti-p25 monoklonalen Antikörpern

- Dieses Beispiels beschreibt die Neutralisierung der HIV-
15 Infektivität unter Anwendung von monoklonalen Antikörpern,
die an gp110 und Peptide innerhalb von gp110 binden, in
Kombination mit monoklonalen Antikörpern, welche an p25 und
an Peptide innerhalb von p25 binden und welche alleine eine
nur geringe oder keine neutralisierende Aktivität aufweisen.
20 Die Ergebnisse zeigen, daß der monoklonale Antikörper gp110-2
in Kombination mit p25-6 oder p25-7 eine besonders große
neutralisierende Aktivität aufweist.

- Die Hybridomze'lllinien p25-6 und p25-7 wurden nach den oben
25 beschriebenen Methoden unter Anwendung der Modifikationen
erzeugt, zu denen die Verwendung inaktivierter zerstörter
Viren oder gereinigter gag rekombinanter Fusionsproteine,
die in E. Coli als Immunogen exprimiert wurden, und die
Charakterisierung der monoklonalen Antikörper bezüglich der
30 Spezifität und der Reaktivität zählen, wobei die als GAG-1, GAG-2
und GAG-3 bezeichneten rekombinanten Fusionsproteine und die
synthetischen Peptide 15, 88, 150, 147 und 148 zur Anwendung
kamen. Die synthetischen Peptide sind vom LAV_{BRU}-Genombe-
reich kodiert, der den folgenden Aminosäureresten entspricht:
35 Peptid 15, Aminosäurereste 329 bis 350; Peptid 88, Amino-
säurereste 315 bis 350; Peptid 150, Aminosäurereste 318 bis

- 1 363; Peptid 147, Aminosäurereste 278 bis 319; und Peptid 148,
Aminosäurereste 290 bis 319. Die von den Hybridomzelllinien
p25-6 und p25-7 produzierten monoklonalen Antikörper
reagieren mit dem rekombinanten Fusionsprotein GAG-3; p25-6
5 reagiert mit den synthetischen Peptiden 147 und 148; und
p25-7 mit den synthetischen Peptiden 15, 88 und 150.

Die Neutralisations-Assays wurden wie oben beschrieben durch-
geführt, außer daß bei Anwendung von Cocktails die einzelnen
10 monoklonalen Antikörper zuerst 1:5 in Kulturmedium ver-
dünnt und anschließend in gleichen Verhältnissen vermischt
wurden, um eine Endverdünnung von 1:10 zu ergeben. Der ver-
bleibende Teil des Assays wurde wie oben durchgeführt.

- 15 Die monoklonalen Antikörper gp110-2, p25-6 und p26-7 zeigen
weniger als 50 % neutralisierende Aktivität, wenn sie alleine
verwendet werden. Bei Verwendung eines Cocktails, der die
monoklonalen Antikörper gp110-2 zusammen mit p25-6 oder
gp110-2 mit p25-7 in einer Verdünnung von 1:10 umfaßt, er-
20 folgt vollständige Neutralisierung. Ein Cocktail, der
die monoklonalen Antikörper p25-6 in Kombination mit p25-7
enthält, ergab eine neutralisierende Aktivität im Bereich
von 60 bis 90 %.

25

Beispiel IV

Immunwirksamkeit des Peptids 29 und der Homologen davon

- 30 Die Fähigkeit des Peptids 29 und der homologen Peptide, ein-
schließlich dem Peptid 177, eine Immunantwort gegen HIV zu
stimulieren, wurde an zwei Mäusestämmen untersucht.
Die Herstellung der Peptidimmunogene, die Immunisierungs-
verfahren und die Charakterisierung der ausgelösten Immun-
35 antworten werden nachfolgend beschrieben.

- 1 Das Peptid 29 wird zur Immunisierung durch Konjugation an
ein gereinigtes Thyroglobulin hergestellt. Thyroglobulin
kann zur Konjugation mit N-Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)
cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) gemäß den in der US-PS
5 4 629 783, Spalte 10, Zeilen 28-51 beschriebenen Verfahren
derivatisiert werden. Als zweites Immunogen wird Thyro-
globulin mit Glutaraldehyd folgendermaßen derivatisiert.
27 mg Schweinethyroglobulin werden in 1 ml 0,1 M Natrium-
bicarbonat gelöst. Dazu trocknet man 8,3 µl einer 25%-igen
10 Glutaraldehydlösung und rührt die Mischung über Nacht bei
Raumtemperatur. Man gibt 1 ml Natriumcarbonat/Bicarbonat-
puffer von pH 9,3 zu der Lösung und dialysiert anschließend
8 h gegen 2 l des gleichen Puffers bei 4°C, wobei ein voll-
ständiger Austausch des Dialysats nach 4 h erfolgt. Das
15 Peptid 29 gibt man dann zu dem derivatisierten Thyro-
globulin in etwa 100-fachem molaren Überschuß und rührt die
Mischung über Nacht bei Raumtemperatur. Man blockiert unumge-
setzt Glutaraldehyd mit 200 µl einer 0,2 M Lysinlösung und
rührt die Mischung mehrere Stunden (oder über Nacht) bei
20 Raumtemperatur. Das Peptid-Thyroglobulin-Konjugat wird dann
extensiv gegen PBS bei 4°C dialysiert.
- Zwei Mäusestämme (C57 schwarz und BALB/c) inokuliert man mit
den Peptiden, die durch das jeweilige Konjugationsverfahren
25 hergestellt wurden. Alle Tiere waren im Zeitpunkt der Inokulation
etwa 2 bis 4 Wochen alt. Die Inokulation kann in den Fuß-
ballen, durch Schwanzskarifikation, subkutan, intranasal
oder intraperitoneal erfolgen. Das Inokulum besteht aus
25 µg des konjugierten Peptids, suspendiert in 0,5 ml
30 kompletten Freund's-Adjuvans, wobei nach der 2., 3. und
5. Woche Booster-Inokulationen mit dem gleichen Immunogen,
suspendiert in inkomplettem Freund's-Adjuvans, gegeben werden.
Man sammelt Serumproben von den einzelnen Mäusen vor der
Immunisierung, 4 Tage nach der Booster-Immunisierung nach
35 der 3. Woche und 4 Tage nach der letzten Booster-Immunisierung
nach 5 Wochen. Die Serumproben wurden auf Antikörper gegen

1 homologe Peptide oder Ganzviren durch ein Screening in einem
ELISA-Assay analysiert. Diejenigen Sera, die Antikörper-
aktivität gegen LAV zeigen, werden einem weiteren Screening
auf neutralisierende Aktivität unterzogen. Im Anschluß daran
5 erfolgt eine Analyse der Sera in Immunoblot-Assays gegen
zerstörtes LAV-Antigen und in Radioimmunopräzipitations-
Assays mit radio-markiertem gp110.

10 Die Ergebnisse der Immunisierungen zeigen, daß die mit
Peptid 29 immunisierten Mäuse Antikörper entwickeln, die
mit Peptid 29 und zerstörten LAV-1-Viren in ELISA-Assays
reagieren. Eine Konjugation des Peptid 29 durch Maleimid
führt zur Bildung von Anti-Peptid-29-Antikörpern in einigen
15 balb/c-Mäusen. Die Konjugation des Peptids 29 durch
Glutaraldehyd ergibt im allgemeinen höhere Titer an
Antikörpern gegen das Peptid 29 in balb/c-Mäusen. Mit
Peptid 177 immunisierte Mäuse entwickeln Antikörper gegen
das Peptid. Eine Konjugation des Peptids 177 durch Glutar-
20 aldehyd war bei der Auslösung einer Immunantwort besser.
C57-Mäuse sprechen stärker auf die Immunstimulierung mit
dem Peptid 177 an als balb/c-Mäuse. Mit dem LAV-2-Peptid
110-2-2 immunisierte Mäuse entwickeln Antikörper gegen
110-2-2 und LAV-2-Viren, wie mittels ELISA-Assays gezeigt
werden konnte. Das durch Glutaraldehyd konjugierte Peptid
25 110-2-2 wirkt sowohl bei C57- als auch bei balb/c-Mäusen
immunogen, wobei die Titer gegen das 110-2-2-Peptid bei
balb/c-Mäusen im allgemeinen höher als bei C57-Mäusen sind,
während die Titer gegen das LAV-2-Virus im allgemeinen bei
30 C57-Mäusen höher sind als bei balb/c-Mäusen.

35

- 1 Diejenigen Serumproben von immunisierten Mäusen, die
(i) Antikörper gegen Ganzviren zeigen; (ii) in der Lage
sind, HIV zu neutralisieren, wie beispielsweise in den in
Beispiel II beschriebenen Assays und (iii) mit Peptid 29
5 in ELISA-Assays reagieren, zeigen kumulativ die Wirksam-
keit der Anwendung des Peptids 29 in einer Vakzinformulierung.

Beispiel V

10 Immunoaffinitätstrennung von gp110 unter Anwendung mono- klonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper gegen das gp110-HIV-Antigen kann man
15 bei Immunoaffinitätstrennverfahren verwenden, um die
bakteriell exprimierten rekombinanten Fusionsproteine zu
reinigen. Wenn das exprimierte Protein von den Bakterien
sekretiert wird, kann das Protein aus dem Kulturüberstand
isoliert werden. Wenn das Protein nicht sekretiert wird,
20 kann eine Zerstörung der Bakterienzellen erforderlich werden.

Die Konstruktion des Plasmids pENV-5 (ATCC Nr. 53074) ist
in der USSN 721 237 beschrieben, auf die hiermit Bezug ge-
nommen wird. Das Plasmid pENV-5 kodiert für den Hauptteil
25 des Carboxylendes von gp110 und einen Teil des Aminö-
terminus von gp41 von LAV, das in den trp Expressions-
vektor insertiert ist. Durch diesen Vektor transformierte
E. Coli C600 exprimieren das gp110 Fusionsprotein,
sekretieren es aber nicht.

30 E. Coli C600, die das Plasmid pENV-5 enthalten, läßt man
über Nacht bei 37°C unter Belüftung in einem Medium wachsen,
das Tryptophan (20 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) ent-
hält. Die Übernachtskulturen inokuliert man dann zu 1:100
in frisches Minimalmedium, das Ampicillin (100 µg/ml), nicht
35 aber Tryptophan enthält. Diese Kulturen läßt man unter Be-

- 1 lüftung bei 37°C 2 bis 3 h wachsen (bis zur frühen log-Phase).
Der Induktor, 3-B-Indol-acrylsäure (Sigma Chemical Co.,
St. Louis, MO) wird aus einer frisch bereiteten Vorrats-
lösung von 20 mg/ml in 95%-igem Ethanol bis zu einer End-
5 konzentration von 20 µg/ml zugegeben. Die induzierten
Kulturen läßt man bei 37°C unter Belüftung 4 bis 5 h wachsen,
pelletisiert anschließend und friert gegebenenfalls ein.
Die Proteinausbeuten von pENV-5 betragen typischerweise
weniger als 1 mg/l.
- 10 Die pelletisierten Bakterienzellen werden unter Verwendung
von P-RIPA-Puffer (PBS, enthaltend 1 % Triton X-100,
1 % Deoxycholat, 0,1 % Natriumdodecylsulfat und 1 %
Aprotinin) lysiert, der E. Coli-Zellen lysiert. Die Sus-
15 pension wird zum Shearing von DNA und RNA einer Ultra-
schallbehandlung unterzogen und anschließend zur Entfernung
von Teilchen zentrifugiert. Eine Verdünnung oder Konzentrierung
kann zur Standardisierung der Proteinkonzentration erforder-
lich sein.
- 20 Der monoklonale Antikörper HIV-gp110-1 wird ursprünglich aus-
gefällt aus Ascitesflüssigkeit oder Zellkulturüberständen
bei Raumtemperatur oder in der Kälte mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder
 Na_2SO_4 -Lösungen, die bei pH 7,3 auf eine Endsättigung von
25 33 oder 18 % gepuffert sind. Die ausgefällten Proteine
werden durch Zentrifugieren entfernt und erneut in PBS ge-
löst und ein zweites Mal mit 33 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder 12 bis 15 %
 Na_2SO_4 gefällt. Falls erforderlich, kann diese Stufe wieder-
holt werden. Das Pellet wird erneut in PBS gelöst und die
30 überschüssigen Salze werden durch Gelfiltration über eine
entsalzende Matrix oder durch erschöpfende Dialyse gegen PBS
entfernt.
- 35 Der gereinigte monoklonale Antikörper 110-1 kann dann an
Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose gekoppelt werden. Die

1 erforderliche Menge an Gel läßt man in 10^{-3} M HCl-Lösung
auf einem Glasfilter quellen (1 g gefriergetrocknetes
Material ergibt ein Gelendvolumen von etwa 3,5 ml), wäscht
15 Min. mit der gleichen Lösung und gibt den Antikörper un-
5 mittelbar danach zu. Im allgemeinen erfolgt die Kopplungs-
reaktion am wirksamsten in einem pH-Bereich von 8 bis 10,
man kann jedoch auch bei einem niedrigeren pH-Wert arbeiten,
wenn dies aus Gründen der Antikörperstabilität erforderlich
ist. Der Antikörper soll in PBS oder in einem Carbonat/Bi-
10 carbonat- oder Boratpuffer von hoher Ionenstärke mit 150 mM
NaCl gelöst sein. Die aktivierte Sepharose und die Anti-
körpersuspension werden bei Raumtemperatur 2 bis 4 h oder
über Nacht bei 4°C leicht gerührt und anschließend auf einer
groben Glasfilterfritte mit Kopplungspuffer gewaschen. Soweit
15 aktive Gruppen verblieben sind, werden diese durch 2-stündige
Behandlung mit 1,0 M Ethanolamin bei pH 8 blockiert. Das
Antikörper-Sepharose-Endprodukt wird anschließend ab-
wechselnd 4 oder 5 x mit Pufferlösungen mit hohem oder
niedrigem pH-Wert gewaschen (Boratpuffer, 0,1 M, pH 8,5,
20 1 M NaCl und Acetatpuffer, 0,1 M, pH 4,0, 1 M NaCl). Durch
das Waschen entfernt man Spuren von nicht-kovalent
adsorbierten Materialien. Die fertige Immunoaffinitäts-
Separationsmatrix lagert man unterhalb von 8°C in Anwesen-
heit eines geeigneten bakteriostatischen Mittels, wie
25 0,01 %-iges Azid.

Die Zugabe der exprimierten Proteinsuspension zu der Immuno-
affinitäts-Separationsmatrix führt zu der selektiven Ent-
fernung des gp110-Antigens. Die Mischung läßt man 2 bis 24 h,
30 vorzugsweise 12 bis 18 h, unter leichtem Rühren oder
Schütteln einwirken. Man kann auch so vorgehen, daß man die
Immunoaffinitätsmatrix in eine Säule gibt, äquilibriert und
die exprimierte Proteinsuspension langsam auf die Säule gibt.
Nach Zugabe der Proteinsuspension sollte der Flow gestoppt
35 werden, um die Bildung des Immunkomplexes auf beste Weise
zu bewerkstelligen.

- 1 Ungebundenes Material wird durch extensives Waschen mit
Adsorptionspuffer ausgewaschen oder abgetrennt. Dazu kann
man eine grobe Glasfilterfritte unter Anlegen eines Vakuums
verwenden oder die Säule im Durchfluß behandeln. Das unge-
5 bundene Material wird dann unter Anwendung von Puffern mit
niedrigem oder hohem pH-Wert (Acetatpuffer, pH 4,0 oder
Boratpuffer, pH 8,56) oder eines chaotropen Agens eluiert.

Beispiel VI

10

Immunoaffinitätsreinigung von rekombinantem gp110 aus einem Säugetier-Expressionssystem

- 15 Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper finden bei der
Immunoaffinitätsreinigung von rekombinantem, durch Säugetier-
zellen exprimierten Fusions-gp110 Anwendung. Die Säugetier-
zellen infiziert man mit rekombinanten Vaccinia (Mackett et
al., J. Virol. 49:857 (1984), worauf hiermit Bezug ge-
20 nommen wird), die Sequenzen enthalten, welche für wenigstens
den Teil von gp110 kodieren, der antigen ist und die Bildung
von neutralisierenden Antikörpern auslöst.

- Die rekombinanten Vaccinia werden gemäß dem Verfahren
25 konstruiert, das in der USSN 842 984 beschrieben ist, auf
die hiermit Bezug genommen wird. Die Sequenzen, die für das
Hüllglykoprotein von HIV kodieren, werden in einem Plasmid-
vektor (pGS20) abwärts von einem Vaccinia-Transkriptions-
Kontrollelement insertiert. Diese chimäre Gen wird
30 flankiert von Sequenzen, die für das virale Thymidinkinase
(TK)-Gen kodieren.

- Die chimären Plasmidvektoren, die Vaccinia-Virus-Promotoren
enthalten, welche an das LAV-Hüllgen ligiert sind, verwendet
35 man zur Transformation des E. Coli-Stamms MC1000. Insertion

- 1 der chimären LAV-env-Sequenzen in das Vaccinia-Virus-Genom
erfolgte durch in vivo-Rekombination, was dadurch möglich
wurde, daß die chimären Gene in den Plasmiden pv-env5 von
Vaccinia-Virus-Sequenzen flankiert sind, die für das TK-Gen
5 kodieren. Dieses Plasmid wird dann in die Zellen eingeführt,
die vorher mit Vaccinia-Viren vom Wildtyp infiziert worden
waren. Man ermöglicht dann eine Rekombination zwischen den
TK-Sequenzen am Plasmid und den homologen Sequenzen in dem
Vaccinia-Virus-Genom unter Insertion des chimären Gens.
- 10 Afrikanische Green-Monkey-Nierenzellen (Stamm BSC-40, eine
von BS-1-Zellen abstammende Zelllinie, ATCC Nr. CCL26) ver-
wendet man als Wirt im Expressionssystem.
- Konfluente BSC-40-Zellen infiziert man in einer Infektions-
multiplizität von 10 durch rekombinante Vaccinia-Viren.
15 Die Infektion läßt man 12 h ablaufen, danach werden die Zellen
geerntet, einmal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Die
Zellpellets suspendiert man in Lysepuffer (1,0 % NP-40,
2,4 % Natriumdeoxycholat, 0,1 M NaCl, 0,01 M M Tris-HCl,
20 pH 7,4, 1 mM EDTA) und klärt das Lysat durch zentrifugieren.
Die Immunoaffinitätstrennung des exprimierten rekombinanten
Fusionsproteins führt man, wie oben für das bakterielle
Expressionssystem beschrieben, unter Anwendung des mono-
klonalen Antikörpers gp110-1 durch. Die durch dieses
25 Expressionssystem produzierten Proteine ähneln aufgrund der
durch die Säugertierzellen erfolgten Behandlung und Glyko-
sylierung stärker natürlich produziertem HIV-gp110.

Beispiel VII

- 30 Inhibierung einer HIV-Infektion mit blockierenden Peptiden

- Die Wirksamkeit von blockierenden Peptiden bei der Inhibierung
der Infektion von Gewebekulturzellen durch den LAV_{BRU}-HIV-
Stamm wurde unter Anwendung einer Modifikation des Verfahrens
35 für die Bewertung von Peptid T, das von Pert et al, siehe

1 oben, publiziert wurde, untersucht. Die bevorzugten HIV-
Inhibitions-Assays erfolgen, indem man gleiche Volumina
blockierender Peptide und CEM-Zellen ($2,5 \times 10^5$) in
Medium (RPMI, 10 % FCS und 2 mg/ml Polybren) kombiniert und
5 45 Min. bei 37°C inkubiert. Das Virus wird dann in unter-
schiedlichen Dosierungen (10, 50, 500 TCID₅₀) zugegeben und
die Mischung wird 14 Tage bei 37°C inkubiert. Der Über-
stand wird anschließend einem Assay auf die Produktion von
Virusantigen (z.B. p25-Kernantigen) unterzogen.

10 Eine Preinkubation der CEM-Zellen mit den Peptiden vor der
Viruszugabe zu den Kulturen verstärkt deninhibierenden
Effekt in den Assays. Es hat sich gezeigt, daß die In-
hibierung von der Virusdosierung abhängig ist, wobei eine
15 große Aktivität bei niedrigen und mittleren Dosierungen,
ein geringerer Effekt dagegen bei höchsten Virusdosierungen
zu beobachten war.

Mit Peptid T war bei Experimenten mit niedrigen Virus-
dosierungen eine Inhibierung der Virusantigenproduktion
20 von etwa 60 % bis 90 % zu erzielen. Weitere Experimente
mit den Peptiden X bis XV, die typischerweise am COOH-
Terminus amidiert und am NH₂-Terminus acetyliert waren,
ergaben ähnliche Ergebnisse, wobei das Peptid XI über einen
25 breiten Dosisbereich besonders wirksam war. Es ist ersicht-
lich, daß auf Basis der erfindungsgemäßen monoklonalen Anti-
körper und Peptide, einschließlich der blockierenden Peptide,
eine bessere Methode zur Neutralisierung und/oder Inhibierung
von HIV-Infektionen zur Verfügung steht. Dies ermöglicht
30 die Schaffung prophylaktischer und therapeutischer Mittel,
die gegen Infektionen durch die meisten, wenn nicht alle,
HIV-Stämme wirksam sind. Darüber hinaus finden die neuen
Materialien in Diagnose-Assays und anderen bekannten Ver-
fahren Anwendung.

35

1 Hinterlegungsnummern der Mikroorganismen

5 Die nachfolgenden Mikroorganismen, die Teil der vor-
liegenden Erfindung sind, wurden bei der American Type
Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville,
Maryland 20852, USA, hinterlegt. Die Hinterlegungsdaten sind
wie folgt:

10

Wissenschaftl. Bezeichnung	Bezeichnung des Hinterlegers	ATCC-Nr.	Hinterlegungs- daten
Mouse hybridoma (balb c/NS-1)	HIV-gp 110-1	HB 9175	August 15, 1986
"	HIV-gp 110-2	HB 9176	August 15, 1986
"	HIV-gp 110-3	HB 9177	August 15, 1986
"	HIV-gp 110-6	HB 9404	April 30, 1987
"	HIV-gp 110-4	HB 9405	April 30, 1987
"	HIV-gp 110-5	HB 9406	April 30, 1987
"	HIV-p 25-2	HB 9407	April 30, 1987
"	HIV-p 25-3	HB 9408	April 30, 1987
"	HIV-p 25-6	HB 9409	April 30, 1987
"	HIV-p 25-7	HB 9410	April 30, 1987

25

Die Hybridome HB9175, HB 9176 und HB 9177 wurden getestet und
waren am 26. August 1986 lebensfähig. Die übrigen Hybridome
wurden ebenfalls getestet und waren am 4. Mai 1987 lebens-
fähig.

30

35