

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 987/92

(51) Int.Cl.⁶ : C07K 7/06
A61K 39/21

(22) Anmeldetag: 14. 5.1992

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 3.1997

(45) Ausgabetag: 27.10.1997

(73) Patentinhaber:

KATINGER HERMANN DIPL.ING. DR.
A-1190 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

STEINDL FRANZ DIPL.ING. DR.
WIEN (AT).
MUSTER THOMAS DIPL.ING. DR.
GRAZ, STEIERMARK (AT).
RÜKER FLORIAN DIPL.ING. DR.
WIEN (AT).
KATINGER HERMANN DIPL.ING. DR.
WIEN (AT).
MAIWALD GEORG ANDREAS
WIEN (AT).

(54) PEPTIDE, DIE ANTIKÖRPER BINDEN

(57) Die Erfindung bezieht sich auf Peptide, die, in geeigneter Form präsentiert, *in vivo* und *in vitro* die Bildung von Antikörpern induzieren, welche *in vivo* und *in vitro* HIV-1 Viren neutralisieren. Diese Peptide werden zusammen mit einem Adjuvans, als rekombinante Fusionsproteine, chemisch an ein Trägermolekül gekoppelt oder in der Form rekombinanter chimärer Viren zur aktiven Immunisierung eingesetzt. In der Form rekombinanter immunologischer "Supermoleküle" können diese Peptide gleichzeitig zur aktiven und passiven Impfung eingesetzt werden. Weiters kann mit diesen Peptiden immunchemisch aus Vollseren von HIV-1 positiven Personen der Status der Infektion bestimmt und der zu erwartende weitere Verlauf der Infektion prognostiziert werden.

AT 403 050 B

Aquired Immunodeficiency Syndrom (AIDS) ist das späte Stadium einer persistenten Infektion mit dem Human Immunodeficiency Virus Typ 1 (HIV-1). Die gegen das Virus und Virus infizierte Zellen gerichtete Immunantwort reicht in den meisten Fällen nicht aus, um die Progression einer HIV-1 Infektion zum Stadium AIDS zu verhindern. Eine Möglichkeit, das Immunsystem in einen Status zu bringen, welcher das Etablieren einer persistenten Infektion beziehungsweise die Progression zu AIDS verhindern kann, stellen Impfstoffe dar. Herkömmliche Impfstoffstrategien gegen HIV-1 konzentrieren sich auf das Oberflächenprotein GP160 (Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 160 kD), das für die Bindung des Virus an den zellulären Rezeptor CD4 und für die Fusionsaktivität verantwortlich ist. Das GP160 setzt sich aus den Untereinheiten GP120 und GP41 zusammen. In letzter Zeit wurden im Zusammenhang mit GP160 mehrere Phänomene beobachtet, welche gegen die Verwendung des gesamten GP160 als Immunogen sprechen. Es wurde *in vitro* beobachtet, daß GP120 und anti-GP120 Antikörper zusammen die Aktivierung von CD4⁺ Zellen blockieren können (1). Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, daß auch *in vivo* die humorale Immunantwort gegen das GP120 von HIV-1 indirekt die T-Zell Aktivierung supprimiert, was in weiterer Folge zur Immundefizienz führt. Als Ursache der Blockierung der T-Zell Aktivierung nimmt man eine Vernetzung von CD4⁺-Zellen durch anti-GP120 Antikörper über das GP120 an. Eine weitere Hypothese, wonach das GP160 aufgrund von Sequenzhomologien mit den Major Histo-Compatibility Complex (MHC) Molekülen zur Immundefizienz führt, kommt von Kion et al (2). Außerdem verursachen mehrere antigene Domänen am GP160 die Bildung von Antikörpern, welche eine HIV Infektion verstärken können (3). Solche, durch das GP160 auftretende Effekte könnten mit einem Subunitimpfstoff, der nur ausgewählte immundominante Regionen oder Epitope enthält, vermieden werden.

Immunogene Peptide wurden schon in mehreren Fällen erfolgreich zur Immunisierung eingesetzt (4, 5, 6). Der Einsatz von Peptiden als Immunogene bietet eine Reihe von Vorteilen. Die durch solche Peptide induzierten Antikörper zeichnen sich durch eine maßgeschneiderte Spezifität aus. Im Falle der Immunisierung gegen Viruserkrankungen können die für eine effektive Immunantwort am besten geeigneten Peptide ausgewählt werden. Bei HIV-1 Viren wurde gezeigt, daß es möglich ist, mit einem synthetischen Peptid, welches ein Teil der V3-Loop Region des Hüllproteins GP120 vom Isolat HTLVIII B ist, die Bildung von neutralisierenden Antikörpern zu induzieren, wodurch eine Infektion mit demselben Isolat verhindert werden konnte (7, 8). Weiters wurde zum Beispiel im Falle des Hämagglutinins von Influenza Virus gezeigt, daß durch Immunisierung mit synthetischen Peptiden die Bildung neutralisierender Antikörper induziert werden kann, deren Bindungsspezifitäten bei Immunisierung mit ganzem Influenza Virus nicht beobachtet werden (4). Somit ist es möglich, mittels Peptiden Antikörper zu induzieren, die ein breiteres Wirkungsspektrum haben, als solche, die durch die Verabreichung von ganzen Proteinen gebildet werden. Andererseits wurden Arbeiten publiziert, in denen die Immunisierung verschiedener Versuchstiere mit Peptiden beschrieben wird, welche von der Nukleotidsequenz des Maul- und Klauenseuche Virus abgeleitet wurden. Diese Immunisierung führte im Gegensatz zu der Immunisierung mit dem entsprechenden ganzen Protein des Maul- und Klauenseuche Virus zu der Bildung neutralisierender Antikörper in den Versuchstieren, und damit zu einem kompletten Schutz gegenüber einer nachfolgenden Infektion mit virulentem Maul- und Klauenseuche Virus (5).

Ein Nachteil von Peptidimpfstoffen ist allgemein die geringe Immunogenität von kleinen Molekülen. Eine Lösung dazu ist, das Peptid mit Molekülen von guter Immunogenität, wie zum Beispiel Tetanus Toxoid oder Keyhole Limpet Hämocyanin, chemisch zu koppeln (5). Eine andere Möglichkeit ist die Klonierung von Peptiden als Fusionspeptid mit der Glutathion S-Transferase von *Schistosoma japonicum* (9, 10). Weiters kommen attenuierte Viren wie Vaccinia, Polio Sabin Typ1 oder Influenza A NA/B-NS als Vektoren für Immunogene in Frage. So wurde das Vaccinia Virus schon vielfach als Vektor für fremde Gene von unterschiedlichen Pathogenen eingesetzt. Unter anderen wurde zum Beispiel das Hepatitis B Surface-Antigen (HBsAg) exprimiert, und erfolgreich zur Immunisierung von Versuchstieren eingesetzt (11). Am Poliovirus Sabin Typ 1 ist es gelungen, eine antigene Region im Capsid Protein VP 1 gegen ein Epitop von HIV-1 auszutauschen. Dieses chimäre Virus war in der Lage, in Versuchstieren neutralisierende Antikörper gegen GP160 zu induzieren (12). Seit kurzem ist es auch möglich, Influenzaviren mittels *in vitro* Mutagenese zu verändern (13). So war es möglich, ein genetisch stabiles attenuiertes Influenza A Virus zu erhalten (14). Weiters konnte ein intertypisch antigenes chimäres Virus konstruiert werden (15). Ein Vorteil von Influenza Viren in diesem Zusammenhang ist die Verfügbarkeit von vielen unterschiedlichen Serotypen, so daß wiederholte Impfungen möglich sind. Außerdem induzieren Influenza Viren eine starke humorale und zelluläre Immunantwort, was ein Vorteil für eine anti-HIV-1 Impfstoffstrategie sein könnte. Weiters ist eine Transformation von befallenen Zellen durch Influenza Viren unwahrscheinlich, da es keine DNA-Phase im Replikationszyklus gibt, was eine chromosomale Integration von viralen Influenza Genen ausschließt.

Die Anwendung antiidiotyper Antikörper stellt eine weitere Möglichkeit zur Erzielung einer spezifischen Immunreaktion und damit Immunität dar. Antiidiotypische Antikörper sind Antikörper, welche die

Antigen-Bindungsstelle eines anderen Antikörpers spezifisch erkennen und binden. Da die Bindungsstellen von Antikörpern strukturell als Spiegelbild des gebundenen Epitops angesehen werden können, kann ein antiidiotypischer Antikörper wiederum als Spiegelbild des Spiegelbildes, also als das innere Abbild des Epitops, gesehen werden. Es ist zwar nicht immer vollkommene Identität zwischen der Struktur bzw. der Aminosäuresequenz des antiidiotypischen Antikörpers mit der Struktur bzw. der Aminosäuresequenz des Epitops zu erwarten, sehr wohl beobachtet man in der Praxis aber Effekte, die auf eine strukturelle, sequenzmäßige oder funktionelle Ähnlichkeit schließen lassen. Die mögliche Anwendung antiidiotypischer Antikörper als Vakzine wurde ursprünglich von Nisonoff und Lamoyi (16) vorgeschlagen. Am Beispiel der afrikanischen Schlafkrankheit wurde zum erstenmal gezeigt, daß es in BALB/c Mäusen möglich war, eine schützende Immunreaktion gegen den Erreger, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, durch die Verabreichung antiidiotypischer Antikörper zu erzielen (17). Im Zusammenhang mit viralen Antigenen wurde in einer anderen Studie die Bildung antiidiotypischer Antikörper zu dem neutralisierenden Epitop des Hemagglutinin Moleküls von Reovirus Typ III untersucht. Diese antiidiotypischen Antikörper erkannten den zellulären Rezeptor des Reovirus-Hemagglutinins sowohl auf zytolytischen T-Zellen als auch auf neuronalen Zellen, und induzierten in der Maus sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort spezifisch gegen Reovirus-Hemagglutinin (18, 19, 20)

Peptide bestehend aus 6 Aminosäuren, welche spezifisch an den anti-HIV-1 monoklonalen Antikörper 2F5 binden und gemäß SEQ ID NO:1 aufgebaut sind, wurden gemäß vorliegender Erfindung als Immunogene zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen HIV-1 verwendet. Zur Identifikation der gegenständlichen Peptide wurden verschiedene überlappende Fragmente vom GP41 vom Isolat BH10 als Glutathion S-Transferase Fusionsproteine kloniert. Die verschiedenen GP41 Fragmente wurden durch Hybridisieren von entsprechenden Oligonukleotiden erhalten, und in die BamHI-EcoRI Stelle des Plasmids pGEX-2T (Pharmacia) im synchronen Leserahmen kloniert. Die rekombinanten Plasmide wurden in den *E. coli* Stamm DH5 transformiert, und die Expression des Fusionproteins wurde durch Zusatz von Isopropylthiogalaktosid (IPTG) induziert. Der gesamte *E. coli* Extrakt wurde anschließend auf Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) aufgetragen, aufgetrennt und die Proteinexpression mittels Silberfärbung analysiert. Fusionspeptide, die am neutralisierenden monoklonalen Antikörper 2F5 binden, wurden über Western-Blots nachgewiesen. Auf diese Art wurden die gegenständlichen Peptide, welche spezifisch an den Antikörper 2F5 binden, identifiziert. So zeigt Fig. 1 Western Blots von Fusionspeptiden mit verschiedenen langen überlappenden Fragmenten vom GP160 vom HIV-1 BH10 Isolat. Während Konstrukte, welche die Aminosäuren 597 bis 677, 634 bis 677 und 648 bis 677 (die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich in der ganzen Patentschrift auf GP160 vom HIV-1 Isolat BH10, wie in der Datenbank "SWISSPROT" im Sequenzeintrag "ENV\$HIV10" angegeben) umfassen, eine positive Reaktion mit dem monoklonalen Antikörper 2F5 zeigten, ist mit dem Fusionspeptid welches die Aminosäuren 667 bis 677 vom GP160 umfaßt, keine Reaktion erfolgt. Dies war der erste Hinweis, daß das gegenständliche Epitop in der Region 648 bis 667 liegt. Es wurden daraufhin von dieser Region überlappende 6er Peptide mit der Glutathion-S-Transferase fusioniert. Wie in Fig. 1b ersichtlich, zeigt das Peptid, welches die Aminosäuren GLU LEU ASP LYS TRP ALA (Aminosäuren 662-667) enthält eine starke Reaktion und Peptide, welche die Aminosäuren LEU ASP LYS TRP ALA SER (Aminosäuren 663-668) und ASP LYS TRP ALA SER LEU (Aminosäuren 664-669) umfassen eine deutlich schwächere Färbung. Das Peptid, welches die Aminosäuren LEU GLU LEU ASP LYS TRP (Aminosäuren 661-666) enthält, zeigt keine Reaktion. Aus diesen Daten geht hervor, daß das Epitop vom 2F5 Antikörper den Aminosäuren GLU LEU ASP LYS TRP ALA, das heißt den Aminosäuren 662 bis 667 vom GP160 vom HIV-1 Isolat BH10 entspricht. Weiters ergab ein Sequenzvergleich des GP160 in der Region des Epitops des Antikörpers 2F5, daß die entsprechende Aminosäuresequenz in verschiedensten HIV-1 Isolaten hochkonserviert ist (Tab. 2). Lediglich in der ersten Aminosäure konnten wir in einigen HIV-Isolaten Abweichungen gegenüber der Sequenz GLU LEU ASP LYS TRP ALA feststellen. In diesem Zusammenhang konnten wir zeigen daß auch Peptide mit den entsprechenden Abweichungen von der Sequenz GLU LEU ASP LYS TRP ALA an den Antikörper 2F5 binden (Fig. 1c). Das Epitop des Antikörpers 2F5 ist somit auf den verschiedensten HIV-1 Isolaten vorhanden. Fusionspeptide wurden, wie unter "Gegenstand der Erfindung" beschrieben in *E. coli* exprimiert, auf 20% Polyacrylamidgele aufgetragen und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Diese Membranen wurden zunächst mit PBS (pH 7.2) 0.1% Tween 20 Puffer (TPBS) der 0.5% Trockenmilchpulver enthielt blockiert. Danach wurde nacheinander mit 2F5 Antikörper (500 ng/ml TPBS) und Anti-Human IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat jeweils 30 Minuten inkubiert und diese "Blots" mittels einem Alkalische Phosphatase Substrat entwickelt. In Fig. 1a in Reihe 1 wurde als negative Kontrolle eine analog den Fusionspeptiden exprimierte Glutathion S-Transferase (GST) aufgetragen. Reihe 2 entspricht einem Fusionspeptid in welchem an die GST die Aminosäuren (As) 597 bis 677 vom GP41 gekoppelt wurden. Reihe 3 entspricht der GST mit den Aminosäuren 634 bis 677, Reihe 4 der GST mit den Aminosäuren 648 bis 677, und Reihe 5 der GST mit

den Aminosäuren 667 bis 677. Reihe 1 in Fig. 1b zeigt wiederum die negative Kontrolle, Reihe 2 entspricht der GST mit den Aminosäuren GLU LEU ASP LYS TRP ALA (As 662-667), Reihe 3 der GST mit den Aminosäuren LEU ASP LYS TRP ALA SER (As 663-668), Reihe 4 der GST mit den Aminosäuren ASP LYS TRP ALA SER LEU (As 664-669) und Reihe 5 der GST mit den Aminosäuren LEU GLU LEU ASP LYS TRP (As 661-666). Wie in Fig. 1b zeigen Reihe 1 und Reihe 2 von Fig. 1c die negative Kontrolle und die GST mit den HIV-1 BH10 Isolat entsprechenden Aminosäuren 662 bis 667 GLU LEU ASP LYS TRP ALA. In Reihe 3 wurde die vom GP160 HIV-1 BH10 Isolat stammende Peptidsequenz entsprechend den HIV-1 Isolaten Z-84, CDC-451, und CDC-4 zu GLN LEU ASP LYS TRP ALA, in Reihe 4 entsprechend den HIV-1 Isolaten Zaire HZ321, ADA, und U455 zu ALA LEU ASP LYS TRP ALA und in Reihe 4 entsprechend dem HIV-1 Isolat JH3 zu GLY LEU ASP LYS TRP ALA abgewandelt.

Die Vorliegen antigener Stellen in der weiteren Region der gegenständlichen Peptide wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (21, 22). Teeuwsen et al. berichten von einem monoklonalen Antikörper, der mit einem Peptid entsprechend dem Abschnitt von Aminosäure 643 bis 692 des GP160 reagiert. Weiters haben Broliden et al. gefunden, daß Vollsera von HIV-positiven Trägern unter anderem an die Region 657-671 binden. In beiden Fällen ist ein spezifisches Epitop allerdings nicht identifiziert worden. Für den von Teeuwsen et al. beschriebenen monoklonalen Antikörper konnte keine neutralisierende Wirkung festgestellt werden. Auch die von Broliden et al. untersuchten Vollsera, welche an die betreffende Region binden, zeigen nur bedingt neutralisierende Eigenschaften: in verschiedenen Neutralisationsversuchen konnte von dieser Forschergruppe eine neutralisierende Aktivität nur gegen das HIV-1 Isolat HTLVIIIB gezeigt werden, während gegen SF2 und RF keine neutralisierende Wirkung gezeigt werden konnte. Dies steht in krassem Gegensatz zu dem von den Erfindern etablierten und wegen seiner *in vitro* neutralisierenden Eigenschaften in großem Detail untersuchten humanen monoklonalen Antikörper 2F5, welcher in der Lage ist, alle bisher getesteten HIV-1-Isolate (inclusive SF2 und RF) zu neutralisieren (Tab. 1). Die Antikörper der Vollsera von Broliden et al., wie auch der monoklonale Antikörper von Teeuwsen et al. haben daher eine andere Spezifität und erkennen somit ein anderes Epitop als der Antikörper 2F5.

Die Verwendung der gegenständlichen Peptide als Immunogene hat mehrere Vorteile. Die Peptide umfassen nur 6 Aminosäuren. Dadurch können Effekte, die von anderen HIV-1 oder GP160 Peptidsequenzen ausgehen, wie zum Beispiel eine Induktion von Antikörpern, die eine HIV Infektion verstärken oder Regionen die einen immunosuppressiven Effekt auslösen, vermieden werden (2, 3).

Im Hinblick auf einen HIV-1 Impfstoff ist es wichtig, eine Immunantwort gegen möglichst alle bekannten HIV-1 Isolate zu induzieren. Weiters entstehen während der HIV-1 Virusreplikation Mutanten, die einer Immunantwort entgehen können. Aufgrund des bereits oben erwähnten Sequenzvergleichs in der Region des Epitops vom 2F5 am GP160 (Tab.2) und der Tatsache daß alle gegenständlichen Peptide mit dem Antikörper 2F5 reagieren (Fig. 1c) kann davon ausgegangen werden, daß Antikörper die von den gegenständlichen Peptiden induziert werden gegen ein breites Spektrum von verschiedenen HIV-Isolaten gerichtet sind. Weiters wurden für den humanen monoklonalen Antikörper 2F5 *in vitro* neutralisierende Eigenschaften gegen eine Vielzahl verschiedener HIV-1-Isolate gezeigt, wodurch der Beweis erbracht ist, daß die gegenständliche Peptidsequenz bei unterschiedlichen HIV-1 Isolaten als neutralisierendes Epitop präsentiert wird (Tab. 1).

Der klinische Verlauf einer HIV-1 Infektion variiert zwischen verschiedenen Patienten erheblich. Während einige Patienten Symptome entwickeln, die als AIDS-related complex (ARC) und AIDS bezeichnet werden, bleiben andere asymptomatisch. Es wurde gezeigt, daß Antikörpertiter gegen bestimmte Peptid-Epitope in AIDS Patienten im Gegensatz zu asymptomatischen HIV-1-Trägern signifikant niedriger oder überhaupt nicht vorhanden sind (23). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Sera von HIV-1-Trägern, die das gegenständliche Peptid binden, gefunden (Fig. 2). Die in der Fig. 2 gezeigten Patienten Nummer 20, 25, 29, 35, 41, 44, 46, welche einen hohen Antikörpertiter gegen das gegenständliche Peptid aufweisen sind, im Gegensatz zu den anderen gezeigten Patienten bereits seit etwa 5 Jahren frei von Symptomen von ARC oder AIDS. Daraus folgt, daß die Stimulierung der Bildung solcher Antikörper, die durch das gegenständliche Peptid induziert werden, die Progression einer HIV-1 Infektion aufhalten kann. Zudem läßt die geringe Häufigkeit von Antikörpern im Vollserum von HIV-1 infizierten Individuen, welche auch an das gegenständliche Peptid spezifisch binden (vergleiche Fig. 2) den Schluß zu, daß dieses Epitop vom humanen Immunsystem nur unzulänglich erkannt wird und daher nur selten solche neutralisierende Antikörper entstehen. Die Antikörpertiter wurden mittels ELISA bestimmt. Das Peptid wurde in Form eines Fusionsproteins (gekoppelt an Glutathion-S-Transferase) in Mikrotiterplatten an die Oberfläche gebunden (2,5 µg/ml). Nach dem Auswaschen des ungebundenen Anteils wurden die Patientensera in einer 2ⁿ Verdünnungsreihe aufgetragen und 1h inkubiert. Nach dem Auswaschen des ungebundenen Anteiles wurde mit Anti human IgG (mit Peroxidase konjugiert) inkubiert. Nach dem Auswaschen wurde gefärbt und ausgewertet. Als Cutoff wurde der doppelte Reaktionsblindwert definiert.

Die Spender der Sera mit den Nummern 20, 25, 29, 35, 41, 44, 46 sind, wie angeführt, seit etwa 5 Jahren HIV-1 positiv und noch immer symptomfrei. Da es sich bei dem gegenständlichen Epitop um ein generell neutralisierendes Epitop handelt, das hochkonserviert ist, ist es besser geeignet zur immunchemischen Bestimmung des Neutralisationstiter von Patientensera als das hochvariable Epitop in der V3-Region am GP-120.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es daher auch, das gegenständliche Peptid in geeigneter Form anzubieten um die Ausbildung neutralisierender Antikörper in der Immunreaktion zu fördern.

Beispiel 1

10

Beispiel 1 beschreibt die Klonierung und Expression des Peptids mit der Sequenz GLU LEU ASP LYS TRP ALA gemäß SEQ ID NO: 1 als Fusionsprotein mit Glutathiontransferase sowie die Immunisierung von Mäusen mit diesem Fusionsprotein. Sämtliche hier und weiter unten beschriebenen Klonierungsvorgänge wurden nach Standardmethoden durchgeführt (24). Die beiden dem gegenständlichen Peptid entsprechenden Oligonukleotide (in ihrer codierenden Sequenz entsprechend dem plus- und dem minus- Strang aus SEQ ID NO: 2), flankiert von zusätzlichen Nukleotiden als Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme, wurden miteinander hybridisiert und in die BamH1-EcoR1 Stelle des Plasmids pGEX-2T (Pharmacia) kloniert. Dadurch wurde das NH₂-terminale Ende des gegenständlichen Peptids mit dem COOH-terminalen Ende der Glutathiontransferase fusioniert. Am COOH-Terminus des gegenständlichen Peptids wurde außerdem ein Transkriptions-Stop-codon angefügt. Dieses Konstrukt wurde in den E. coli Stamm DH5 transformiert und die Expression des entsprechenden Fusionsproteins durch Induktion mit IPTG induziert. Nach 3 Stunden Induktion wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet, in Phosphate Buffered Saline (PBS) Puffer (pH 7,2) mit 1% Triton-X-100 suspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Bakterienbruchstücke wurden wiederum abzentrifugiert, und der Überstand auf eine Glutathion-Sepharose 4B Säule (Pharmacia) aufgetragen. Das Fusionsprotein wurde mit 20mM Glutathion in 100mM Tris (pH 8,0), 120mM NaCl Puffer eluiert. Das auf diese Art gereinigte Fusionsprotein wurde zur Immunisierung von 3 Mäusen gemäß Standardprotokollen eingesetzt. 2 Wochen nach der Grundimmunisierung wurde mit 100µg der gleichen Fusionsprotein-Präparation geboostert. Als Kontrolle dienten 3 Mäuse welche mit einer mit der gleichen Methode präparierten Glutathion S-Transferase immunisiert wurden. Keine dieser Kontrollmäuse hatte HIV-1 spezifische beziehungsweise HIV-1 neutralisierende Antikörper. Vollsera, welche den Mäusen 1 Woche nach der letzten Immunisierung entnommen wurden, zeigten hohe spezifische Neutralisationstiter gegen das gegenständliche Peptid und inhibierten *in vitro* die Infektion mit HIV-1 Viren (Fig. 3b und c). Fig. 3b betrifft den Antikörpertiter. Dazu wurden je 3 Balb/c Mäuse entweder mit 100 µg Glutathiontransferase (K), 100 µg des Fusionspeptids (F), 100 µg des immunologischen "Supermoleküls" (SM), 100 µg des rekombinanten idiotypischen Antikörpers (rA), bzw. 4,0 log₁₀ TCID₅₀ des chimären Influenza/HIV Virus (V) subcutan geimpft, und 2 Wochen später mit derselben Menge der entsprechenden Präparation geboostert. Am Tag 30 wurden ELISA Antikörper bestimmt. Resultate sind als reziproke Werte der Serumverdünnung, die noch signifikant positive Meßwerte ergaben, angegeben. Fig. 3c zeigt die Neutralisation der HIV-1 Infektion. Die Neutralisationstiter wurden bestimmt, indem 10µl Hitze inaktivierter Antisera mit 3,0 log₁₀ TCID₅₀ bei 37°C inkubiert wurden, und die verbleibende HIV-1 Infektiosität wie in Fig. 3a beschrieben durchgeführt wurde. Abkürzungen: P, Fusionspeptid; V, chimäres Influenza/HIV Virus; SM, immunologisches Supermolekül; rA, rekombinanter Antikörper. Die reziproken Neutralisationstiter der Kontrollen waren in allen Fällen kleiner als 10.

Beispiel 2

Beispiel 2 beschreibt die Expression des Peptids GLU LEU ASP LYS TRP ALA gemäß SEQ ID NO: 1 als Teil des Hämagglutinins von Influenzavirus. Mittels *in vitro* Mutagenese wurden jeweils 6 Aminosäuren der antigenen Stellen A, B, C, D, und E (26, 27) vom Hämagglutinin von Influenzavirus A/WSN/33 gegen die Aminosäuresequenz des gegenständlichen Peptids ausgetauscht. Diese chimären DNA-Konstrukte wurden jeweils in das Influenzavirus HK/WSN transfiziert (13). Von den resultierenden chimären Influenza/HIV-1 Viren wurde über Genreassortment das entsprechende Hämagglutinin in das attenuierte Influenza A NA/B-NS Virus gebracht (14). Diese attenuierten chimären Influenza/HIV-1 Viren hatten die antigenen Eigenschaften des gegenständlichen Peptids. In Antikörper-Adsorptionsexperimenten inhibierten diese chimären Viren HIV-1-Neutralisation durch den monoklonalen Antikörper 2F5 (Abb.3a). Antisera von Mäusen, die durch subcutane Injektion mit chimären Influenza/HIV-1 Viren induziert wurden, reagierten spezifisch mit dem gegenständlichen Peptid (Abb.3b). Außerdem neutralisierten diese Antisera *in vitro* verschiedene HIV-1 Isolate (Fig. 3c). Fig. 3a zeigt Influenza/HIV Inhibierung von HTLV_{III}B Neutralisation. Resultate sind als %

verbleibende Neutralisation nach Inkubation mit Kulturmedien (Mock), Influenza WSN bzw. Influenza/HIV angegeben. 2F5 ist der monoklonale Antikörper, welcher an das gegenständliche Peptid bindet. Der monoklonale Antikörper 2G12 erkennt ein vom gegenständlichen Peptid verschiedenes neutralisierendes Epitop am GP120 von HIV-1. Die verbleibende HIV-neutralisierende Aktivität wurde bestimmt, indem

5 Antikörper mit Kulturmedium, Influenza WSN bzw. Influenza/HIV jeweils mit $3,0 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ von HTLV_{III}B 1h bei 37°C inkubiert wurden. Aliquote (100 μl) des Kulturmediums mit 10^4 Zellen wurden zugegeben, und Syncytienbildung als Indikator für eine HIV Infektion bestimmt.

Beispiel 3

10

Beispiel 3 beschreibt die Expression des gegenständlichen Peptids als Teil eines sogenannten immunologischen "Supermoleküls", wobei die gegenständliche Peptidsequenz in den Linker, welcher die variable Region der schweren Kette mit der variablen Region der leichten Kette eines single chain Fv (25) verbindet, eingefügt wurde. Die Fusion des Antikörperfragmentes, das je nach Spezifität einerseits an ein

15 beliebiges Epitop des Targetantigens bindet und gleichzeitig auch ein erwünschtes Epitop präsentiert, eröffnet völlig neue Möglichkeiten der Einflußnahme auf die Topographie der Moleküle und damit der Beeinflussung des Immunsystems. Die hier gezeigte Verabreichung eines immunologischen "Supermoleküls" stellt eine Möglichkeit dar, gleichzeitig eine passive und aktive Immunisierung zu erzielen. Prinzipiell werden dabei die antigenbindenden Domänen eines neutralisierenden Antikörpers und die Präsentation

20 eines oder mehrerer Epitope miteinander verknüpft. Ein solches Molekül hätte zum Beispiel bei bereits HIV-positiven Personen den Vorteil, das Ausmaß der Infektion bereits ab dem Zeitpunkt der ersten Verabreichung einzudämmen. Im speziellen bedeutet das, daß die Zeitspanne bis zum effektiven Einsatz der durch die präsentierten Epitope induzierten Immunantwort ohne besondere Progression der Krankheit überbrückt wird. Weiters wird das Peptid während der Neutralisation von bereits vorhandenen HIV-1 Viren durch die

25 antigenbindenden Domänen des "Supermoleküls" besonders effizient präsentiert.

Es wurde ein single chain Fv Konstrukt gemäß Standardmethoden (25) ausgehend von einem neutralisierenden anti-HIV-1-GP120 Antikörper hergestellt, wobei in der Region des Linkers, welcher die variable Region der schweren Kette mit der variablen Region der leichten Kette verbindet, eine oder zwei Kopien des Peptids GLU LEU ASP LYS TRP ALA gemäß SEQ ID NO: 1 eingefügt wurden. Das rekombinante

30 Protein wurde in *E. coli* zur Expression gebracht und nach Standardmethoden gereinigt. Dieses Konstrukt erfüllte 2 Funktionen. Einerseits wurden *in vitro* die antigenbindenden Eigenschaften des ursprünglichen Antikörpers beibehalten, und andererseits induzierte dieses Konstrukt, wenn es in Mäuse geimpft wurde, Antikörper, welche spezifisch mit dem gegenständlichen Peptid reagieren und *in vitro* unterschiedliche HIV-1 Isolate neutralisieren (Fig. 3b und c).

35

Beispiel 4

Beispiel 4 beschreibt die Bildung antiidiotypischer Antikörper gegen den Antikörper 2F5, sowie die Herstellung eines antiidiotypischen Antikörpers mittels gentechnischer Methoden. Es wurden Mäuse mit

40 dem Antikörper 2F5 immunisiert, um die Bildung antiidiotypischer Antikörper zu induzieren. Das Impfschema wurde nach Standardmethoden speziell für die Ausbildung antiidiotypischer Antikörper ausgelegt. Die erhaltenen Sera wurden auf Immunreaktivität untersucht, wobei mittels Antigen-Verdrängungs-ELISA festgestellt wurde, daß ein Teil der humoralen Immunantwort tatsächlich gegen die Bindungsregion des Antikörpers 2F5 gerichtet war. Somit war bewiesen, daß in den betreffenden Sera antiidiotypische Antikörper

45 vorlagen. Um das Konzept der Vakzinierung mittels antiidiotypischer Antikörper zu überprüfen, wurden die mittels Immunaффinitätschromatographie isolierten antiidiotypischen Antikörper in weiterer Folge dazu verwendet, um wiederum andere Mäuse damit intraperitoneal zu immunisieren. Tatsächlich konnte in diesen Mäusen eine Immunreaktion nachgewiesen werden, die qualitativ vergleichbar mit der oben beschriebenen Immunreaktion gegen den HIV-1 Peptid-Anteil des in Beispiel 1 beschriebenen Glutathion-S-Transferase

50 Fusionsproteins war.

Da bewiesen war, daß das beschriebene Peptid die für ein Immunogen erforderlichen Qualitäten besitzt, und daß außerdem unter Verwendung antiidiotypischer Antikörper mit innerer-Abbild-Qualität des gegenständlichen Peptids die Induzierung einer HIV-1 neutralisierenden Immureaktion gezeigt worden war, wurde unter Verwendung gentechnischer Methoden ein antiidiotypischer Antikörper konstruiert. Dabei wurden eine

55 oder mehrere hypervariable Regionen (oder Teile davon) eines bestehenden monoklonalen Antikörpers gegen die Peptidsequenz GLU LEU ASP LYS TRP ALA gemäß SEQ ID NO: 1 ausgetauscht. Die entsprechenden Konstrukte wurden in Form von single chain Fv Fragmenten in *E. coli* zur Expression gebracht und die rekombinanten Proteine wurden mittels Standardmethoden gereinigt. Immunisierung von

Mäusen mit diesen antiidiotypischen rekombinanten Proteinen führte zur Ausbildung einer HIV-1 neutralisierenden Immunantwort (Fig. 3b und 3c).

Tabellen

Tabelle 1

1a) <i>in vitro</i> Neutralisationstest:						
	Isolat					
	IIIB	MN	RF	SF2	A	C
Zahl der positiven Tests	8/8	2/2	2/2	n.t.	8/8	4/4
neutralisierende Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	50	10	10		50	10
1b) Syncytieninhibierungstest:						
	Isolat					
	IIIB	MN	RF	SF2	A	C
Zahl der positiven Tests	18/18	11/11	6/10	1/1	1/1	2/3
EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	12,8	12	13,7	1,9	27	10

Tab. 1: Neutralisierende Eigenschaften des humanen monoklonalen Antikörpers 2F5.

a) *in vitro* Neutralisationstest. Verschiedene Konzentrationen vom humanen monoklonalen Antikörper 2F5 wurden mit zellfreien Virus Präparationen (10^2 - 10^3 TCID₅₀) 1h bei 37 °C inkubiert. 50 μl Aliquote davon wurden zu 10^5 H9 Zellen/Well gegeben und anschließend inkubiert. Nach 20 Tagen wurde von den Kulturüberständen die p24 Antigenkonzentration als Maß für die Virusreplikation nach Standardmethoden bestimmt.

b) Syncytieninhibierungstest. Analog zu Tabelle 1a wurden 50 μl Virus/Antikörper-Gemisch zu 10^5 AA2 Zellen/Well gegeben und nach 5 bis 6 Tagen die Syncytienbildung als Indikator für eine HIV-1 Infektion bestimmt. Die Berechnung der 50% Effektiven Dosis (EC₅₀) wurde nach Reed und Muench bestimmt. Abkürzungen : A und C sind klinische HIV-1 Isolate aus Wien.

Tabelle 2

Sequenzvergleich HIV-1 Peptid	
HIV-1 ISOLAT:	SEQUENZ:
BH10	ELDKWA
Z-84	Q----
Z2/CDC-Z34	-----
BH8	-----
ARV2/SF2	-----
BRU	-----
CDC-451	Q----
JRCSE	-----
ELI	-----
SF33	-----
SF162	-----
ZAIRE HZ321	A----
BRAIN	-----
JH3	G----
NDK	-----
MN	-----
MAL	-----
OYI	-----
PV22	-----
RF/HAT	-----
SC	-----
MFA	-----
WMJ2	-----
HXB2	-----
HXB3	-----
ZAIRE 6	-----
LAI	-----
NL43	-----
BRVA	-----
ALA1	-----
BAL1	-----
NY5CG	-----
SF162	-----
JFL	-----
CDC4	Q----
HAN	-----
ADA	A----
Z2Z6	-----
JY1	-----
U455	A----

Tabelle 2: Sequenzvergleich zwischen verschiedenen HIV-1 Isolaten. Die dem Isolat BH10 entsprechende Aminosäuresequenz ELDKWA (662-667) am GP160 wurde mit den entsprechenden GP160 Aminosäuresequenzen von anderen HIV-1 Isolaten verglichen. Identische Aminosäuren sind mittels Querstrich dargestellt.

Literatur

1. Mittler, R.S., and K.Hoffmann. 1989. Synergism between HIV gp120 and gp 120-specific antibody in blocking human T cell activation, Science 245: 1380-1382
2. Kion, T.A., and G.W. Hoffmann. 1991. Anti-HIV and anti-anti-MHC antibodies in alloimmune and autoimmune mice, Science 253: 1138-1140

3. Jiang S., K. Lin and A.R. Neurath. 1991. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by antisera to peptides from the envelope glycoproteins gp120/gp41, *J.Exp.Med. USA* 174: 1557-1563
4. Green, N., H.Alexander, A. Olson, S.Alexander, T. M. Shinnick, J.G. Sutcliffe, and R.A. Lerner. 1982. Immunogenic Structure of the Influenza Virus Hemagglutinin, *Cell* 28: 477-487
5. Bittle, J.L., R.A. Houghten, H. Alexander, T.M. Shinnick, J.G.Sutcliffe and R.A. Lerner. 1982. Protection against Foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence, *Nature* 298: 30-33
6. R. A.Lerner. 1982. Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity, *Nature* 299: 592-596
7. Wahren, B., G. Bratt, J. Hinkula, G. Gilljam, S. Nordlund, P.A. Broliden, L. Akerblom, B. Morein, and E. Sandström. 1990. Monoclonal antibodies given as passive treatment to HIV-infected individuals, *Cinquieme Colloque des Cent Gardes* :263-268
8. Emini, E.A., W.A. Schleif, J.H. Nunberg, A.J. Conley, Y. Eda, S. Tokiyoshi, S.D. Putney, S. Matsushita, K.E. Cobb, C.M. Jett, J.W. Eichberg, and K.K. Murthy. 1992. Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp 120 V3 domain- specific monoclonal antibody, *Nature* 355: 728-730
9. Fikrig E., S.W. Barthold, F.S. Kantor,, and R.A. Flavell. 1990. Protection of mice against the lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA, *Science* 250: 553-556
10. Johnson K.S., G.B.L. Harrison, M.W. Lightowlers, K.L. O'Hoy, W.G. Cogle, R.P. Dempster, S.B. Lawrence, J.G. Vinton, D.D. Heath, and M.D. Rickard. 1989. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen, *Nature* 338: 585-587.
11. Perkus, M.E., A. Piccini, R.R. Lipinskas, and E. Paoletti. 1985. Recombinant vaccinia virus:Immunization against multiple pathogens, *Science* 229: 981-984
12. Evans J.D., J.McKeating, J.M. Meredith, K.L. Burke, K. Katrak,I A. John, M. Ferguson, P.D.Minor, R.A. Weiss, and J.W. Almond. 1989. An engineered poliovirus chimaera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies, *Nature* 339: 385-388.
13. Enami M., W.Luytjes, M. Krystal, and P.Palese et al. 1990. Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3802-3805.
14. Muster T., E.K.Subbarao, M.Enami, B.R. Murphy, and P. Palese. 1991. An influenza A virus containing influenza B virus 5' and 3' noncoding regions on the neuraminidase gene is attenuated in mice, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5177-5181.
15. Li, S, J.L. Schulmann, T. Moran, C.Bona, and P.Palese. 1992. Influenza-A virus transfectants with chimeric hemagglutinins containing epitopes from different subtypes, *J.Virol.*66.: 399-404
16. Nisonoff A., E. Lamoyi. 1981. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 21: 397
17. Sacks D.L., K.M. Esser and A. Sher. 1982. *J. Exp. Med.* 155: 1108
18. Kauffman R.S., J.H. Noseworthy, J.T. Nepom, R. Finberg, B.N. Fields, and M.I. Greene. 1983. *J. Immunol.* 131: 2539
19. Sharpe A.H., G.N. Gaulton, K.K. McDade, B.N. Fields, and M.I. Greene. 1984. *J. Exp. Med.* 160: 1195
20. Gaulton G.N., and M.I. Greene. 1986. *Ann. Rev. Immunol.* 4: 253
21. Broliden, P., A. Gegerfelt, P. Clapham, J. Rosen, E. Fenyő, B. Wahren, and K. Broliden. 1992. Identification of human neutralizing regions of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89/2:461-465.
22. Teeuwssen V.J., K.H. Siebelnik, S. Crush-Stanton, A.D.B. Swerdlow, J.J. Schalken, J. Goudsmit, R. Van De Akker, M.J. Stukart, F.G. Uytdehaag, and A.D. Osterhaus. 1990. Production and characterization of a human monoclonal antibody, reactive with conserved epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1, *AIDS Res Hum Retroviruses* 6: 381-392.
23. Neurath, A.R., N. Strick, P.Taylor, P. Rubinstein, and C.E. Stevens. 1990. Search for epitope- specific antibody responses to the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoproteins signifying resistance to disease development, *AIDS Res Hum Retroviruses* 6: 1183-1191
24. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
25. Kohl, J., F. Rüker, G. Himmler, E. Razazzi, and H. Katinger. 1991. Cloning and expression of a HIV-1 specific single-chain Fv region fused to Escherichia coli Alkaline Phosphatase, *Ann. New York Acad. Sci.* 646: 106-114
26. Wharton, S.A., W. Weis, J.J. Shekel, and D.C. Wiley. 1989. Structure, function and antigenicity of the hemagglutinin of influenza virus, in: R.M. Krug (ed), *The Influenza Viruses*, Plenum Press, New York
27. Wiley, D.C., I.A. Wilson and J.J. Shekel. 1981. Structural identification of the antibody binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinin and their involvement in the antigenic variation, *Nature* 289: 373-378

Sequenzprotokoll

5

SEQ ID NO: 1

SEQUENZLÄNGE: 6 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäuresequenz

10

ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

Xaa: entweder Glu oder Gln oder Ala oder Gly

15

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: GP160 von HIV-1 Isolat BH10

POSITION DER SEQUENZ IM GP160: von 662 bis 667

20

EIGENSCHAFTEN: Epitop eines humanen monoklonalen Antikörpers gegen HIV-1 GP160

25

Xaa Leu Asp Lys Trp Ala

6

1 5

Xaa: entweder Glu oder Gln oder Ala oder Gly

30

SEQ ID NO:2

SEQUENZLÄNGE: 18 Basenpaare

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz

35

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE DER SEQUENZ: linear

40

ART DES SEQUENZIIERTEN MOLEKÜLS: cDNA zu viraler RNA

ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: GP160 von HIV-1 Isolat BH10

45

POSITION DER SEQUENZ IM HIV-1 GENOM: von 8238 bis 8255

50

SVATTAGATA AATGGGCA

18

1 11

55 **Patentansprüche**

1. Peptide, die Antikörper binden, die gegen unterschiedliche Stämme und klinische Isolate von HIV-1 neutralisierende Wirkung zeigen sowie die durch HIV-1 gesteuerte Fusion von Zellen verhindern,

dadurch gekennzeichnet, daß diese Peptide gemäß SEQ ID NO: 1 aufgebaut sind.

2. Peptide nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie genetisch durch die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2 bzw. durch mit SEQ ID NO: 2 hybridisierende Sequenzen bzw. durch aus SEQ ID NO: 2 durch Degeneration abgeleitete Sequenzen codiert sind.
3. Peptide nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie - chemisch an ein Adjuvans gebunden - in Form von Fusionspeptiden vorliegen.
4. Fusionspeptide nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Adjuvans ein virales Protein, ein Antikörper oder ein Teil eines Antikörpers ist.
5. Fusionspeptide nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Adjuvans das Hämagglutinin oder die Neuraminidase von Influenzavirus, das surface-Antigen oder das core-Antigen von Hepatitis-B-Virus oder ein Fab- oder Fv-Fragment eines Antikörpers ist.
6. Fusionspeptide nach Anspruch 4 oder 5 mit einem Antikörperfragment als Adjuvans, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein oder mehrere Peptide gemäß Anspruch 1 oder 2 als Linker bzw. als Teil eines Linkers zwischen den beiden variablen Domänen eines Einzelketten Fv-Fragments eingebaut sind.
7. Fusionspeptide nach Anspruch 4 oder 5 mit einem monoklonalen Antikörper als Adjuvans, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein oder mehrere Peptide gemäß Anspruch 1 oder 2 einen oder mehrere Teile der Peptidsequenz des Antikörpers substituieren.
8. Fusionspeptide nach Anspruch 4 oder 5 mit einem monoklonalen Antikörper als Adjuvans, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein oder mehrere Peptide gemäß Anspruch 1 oder 2 als Teil einer oder mehrerer hypervariabler Regionen eines monoklonalen Antikörpers vorliegen.
9. Fusionspeptide nach Anspruch 4 oder 5 mit einem viralen Protein als Adjuvans, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein oder mehrere Peptide gemäß Anspruch 1 oder 2 einen oder mehrere Teile der Peptidsequenz des viralen Proteins substituieren.
10. Fusionspeptide nach Anspruch 4, 5 oder 9 mit einem viralen Protein als Adjuvans, **dadurch gekennzeichnet**, daß das virale Protein als integrierter Bestandteil eines Virus vorliegt.
11. Verwendung mindestens eines Peptids nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Mittels zur Ausbildung von HIV-1 neutralisierenden Antikörpern.
12. Verwendung nach Anspruch 11, zur Herstellung eines Mittels zur passiven und/oder aktiven Immunisierung gegen eine HIV-1-Infektion.
13. Verwendung mindestens eines Peptids nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10 zur Feststellung, Bestimmung und/oder spezifischen Anreicherung von an HIV-1 bindenden Antikörpern und/oder Antikörperfragmenten *in vitro*.
14. Verwendung nach Anspruch 13 in einem Testverfahren zur Bestimmung des Status einer HIV-1 Infektion eines Patienten anhand einer Serumprobe *in vitro*.
15. Verfahren zur Herstellung eines Fusionspeptids nach einem der Ansprüche 3 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 2 mit einer Nukleotidsequenz des Adjuvans fusioniert und die fusionierte Nukleotidsequenz in einem biologischen Expressionssystem exprimiert wird, oder daß mindestens ein Peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 mittels chemischer Methoden mit dem Adjuvans verbunden wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15 mit einem biologischen Expressionssystem, worin das biologische Expressionssystem auf dem Bakterienstamm E.coli DH5 basiert.

AT 403 050 B

Hiezu 5 Blatt Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Fig. 1

Western Blot Fusionspeptide

Fig. 1a

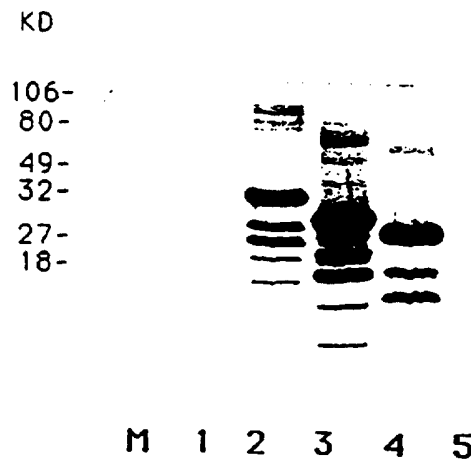


Fig. 1b

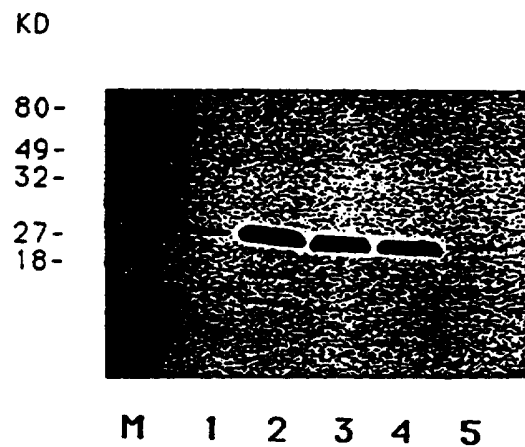


Fig. 1c

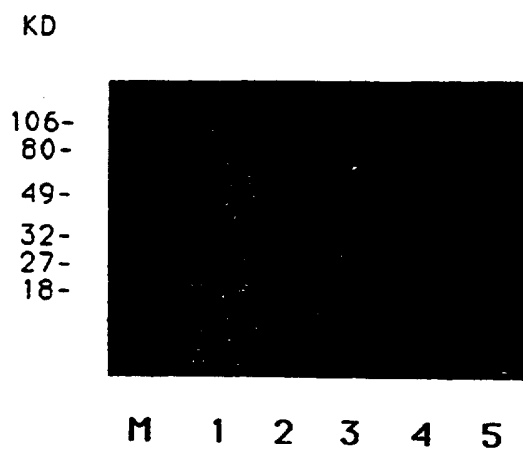


Fig. 2

Darstellung der Antikörper-Titer gegen das Peptid mit der Aminosäuresequenz

"ELDKWA" von 65 Sera HIV-1 positiver Personen

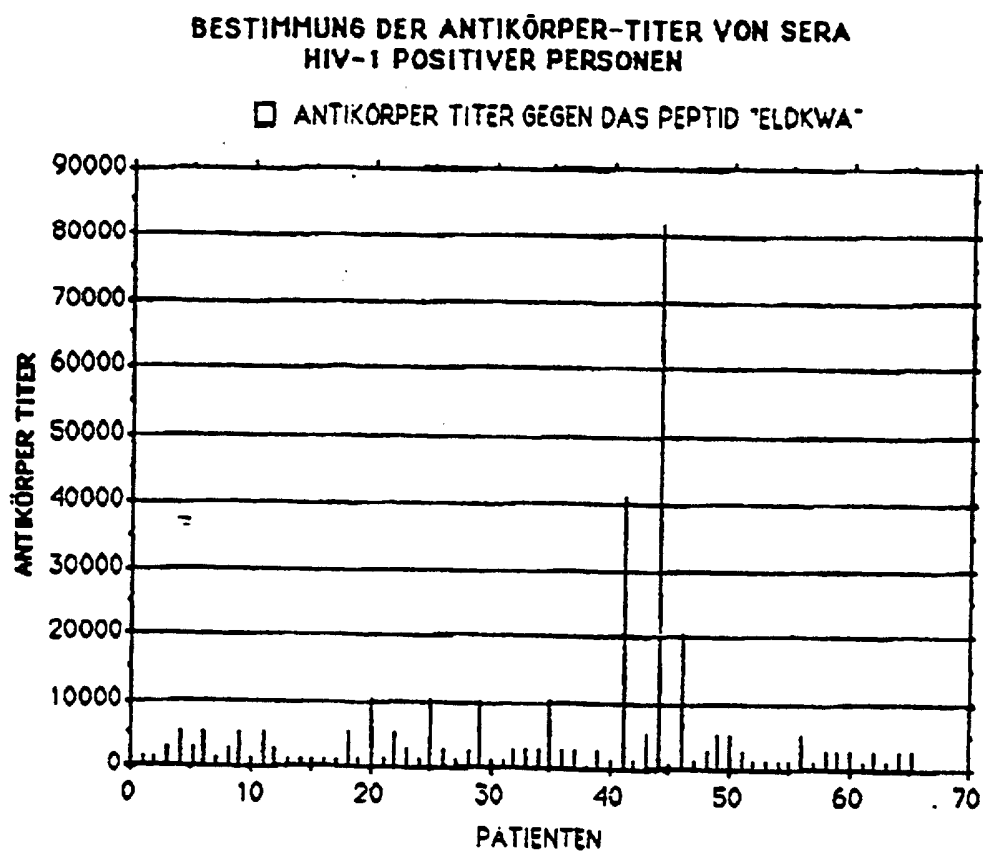


Fig. 3a

Influenza/HIV Inhibierung von HTLVIII_B Neutralisation

Monoklonaler Antikörper:	verbleibender III _B Neutralisationstiter in % nach Inkubation mit		
	Mock	Influenza WSN	Influenza/HIV
2F5	100%	100%	10%
2G12	100%	100%	100%

Fig. 3b

Antikörpertiter

Immunogen: Antikörpertiter:

K1 < 10

K2 < 10

K3 < 10

F1 1600

F2 6400

F3 800

SM1 3200

SM2 400

SM3 800

V1 3200

V2 3200

V3 6400

rA1 < 10

rA2 400

rA3 800

Fig. 3c

reziproke Neutralisationstiter
HIV-1 Isolat

Antiserum	IIIB	RF	MN
F1	40	40	40
F2	80	40	40
F3	40	20	20
V1	40	80	40
V2	20	40	<10
V3	160	80	80
SM1	320	160	320
SM2	80	40	40
SM3	80	80	80
rA1	40	40	40
rA2	40	80	20
rA3	80	40	40