

(19) HU
MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

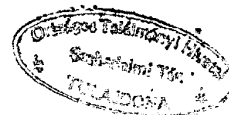
SZABADALMI LEÍRÁS

(11) (13)
195247 B

(22) A bejelentés napja: 85.08.05. (21) 3663/85
(86) PCT/US85/01481
(87) W086/01517
(33) US:
(32) 84.08.24.
(31) 644 205

(51) Int.Cl.
C 12 N 5/00
C 12 N 15/00
C 12 P 21/00
G 01 N 33/537
G 01 N 33/571
A 61 K 39/42
C 07 K 3/18

(41) (42) A közzététel napja: 1987.01.28.
(45) Megjelent: 1989.06.30.



(72) Feltalálók:
COHEN Gary, Havertown, Pennsylvania,
EISENBERG Roselyn, Haddonfield, New Jer-
sey, US

(71) Bejelentő:
University Patents, Inc., Westport, Connec-
ticut, US

(54) ELJÁRÁS HERPEZS VÍRUSOKRA FAJLAGOS IMMUNOLÓGIAI ANYAGOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA ÉS KIMUTATÁSUKRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás herpesz víru-
sokra fajlagos monoklonális antitest előállí-
tására, oly módon, hogy

gD—1 vagy gD—2 glikoproteinnel hiper-
immunizált állat tumor sejtjeiből és lépsejtjei-
ből hibridómákat állítanak elő, majd ezek kö-
zül elkülönítik az 1. és 2. típusú Herpes simp-
lex vírus D-glikoproteinjéhez, valamint olyan

fehérje-jellegű anyagokhoz, melyek az alábbi
szekvencia részét vagy egészét tartalmazzák:

PELA(vagy V)PEDPEDSALLEDPV(vagy A)GTVA(vagy S)

specifikusan kapcsolódni képes antitest ki-
választására alkalmas hibridómákat és a ki-
választott hibridómák tenyészetéből elkülöní-
tik a monoklonális antitesteket.

A találmány tárgya eljárás antitestek, pontosabban olyan antitestek előállítására, amelyek egyedi, több irányban fajlagos immunreaktivitást mutatnak az 1. és 2. típusú Herpes simplex vírus D-glikoproteinjeit (HSVgD-1 és gD-2) és szerkezetileg rokon anyagokat illetően.

A közelmúltban jelentős kutatási erőfeszítés irányult a Herpes simplex vírus glikoproteinek izolálására és jellemzésére, amelyek a virion burkolat szerkezeti komponenseit alkotják, és amelyek valószínűleg fontos szerepet játszanak a virális fertőzés beindításában. Az erre a kutatásra alapozott legjelentősebb előrehaladás a HSVD-glikoprotein új készítményeinek felfedezése, amely a jelen bejelentők munkája; ezek, amikor vakcina kompozíciók aktiv immungénjeként alkalmazták, jelentős védelmet váltanak ki a HSV fertőzés ellen; a jelen találmány megalkotói továbbá felfedeztek immunológiailag jelentős olyan polipeptidet is, amelyek a HSV gD-ben jelenlévő folyamatos aminosavszekvencia másolatai vagy lényegében annak felelnek meg (WO 83/02897 közzétételi számú Nemzetközi Szabadalmi Bejelentés).

A HSV gD-1 és gD-2 jellemzésére folyó kutatásban jelentős segítséget nyújtottak a rekombináns DNS technikák alkalmazása útján nyert eredmények, amely technikák a gD-1 és gD-2 polipeptid szekvenciák részét vagy egészét kódoló DNS szekvenciák mikrobiológiai gazdaszervezetekben (pl. baktériumokban, élesztőkben és emlős-sejt

tenyészetekben) való klónozására és kifejeződésére vonatkoztak. A fehérjéket kódoló gén DNS szekvencia-elemzése ezek elsődleges szerkezeti elrendezésének (aminosav-szekvencia) előrejelzését eredményezték. Watson és munkatársai pl. [Science, **218**, 318–384 (1982)] a gD-1-hez nyújtanak előrejelzett szekvenciát, beleértve egy „vezető” területet, és egy olyan területet, amelyet „érett” fehérje területnek jelölnek. Hasonló rekombináns módszerek lehetővé tették a gD-2 szekvencia előrejelzését, és ennek összehasonlítását gD-1-el. Watson egy másik ismertetése [Gene, **26**, 307–312 (1983)] általános információt nyújt az „érett” HSVgD-1 és gD-2 DNS szekvenciaelemzés alapján előrejelzett elsődleges szerkezeti elrendezése (aminosav-szekvencia), összehasonlítására, ez az információ az alábbi I. Táblázatban látható.

Az említett Táblázatban és a továbbiak folyamán a következő egyes és hármas betű „kódok”-at alkalmazzuk az egyes aminosav-gyökök jelölésére: A = Ala = Alanin; C = Cys = Cisztein; D = Asp = aszparaginsav; E = Glu = Glutaminsav; F = Phe = Fenilalanin; G = Gly = glicin; H = His = hisztidin; I = Ile = Isoleucin; K = Lys = Lizin; L = Leu = Leucin; M = Met = Metionin; N = Asn = Aszparagin; P = Pro = Prolin; Q = Gln = Glutamin; R = Arg = Arginin; S = Ser = Szerin; T = Thr = Treonin; V = Val = Valin; W = Trp = Triptofán; és Y = Tyr = Tirozin.

I. TÁBLÁZAT

	1	
gD-1	KYALADASLKMADPNRFRGKDLPLVDQLTDPPGVRRVYHI	40
gD-2	-----P-----N-----K-----	
gD-1	QAGLPDPFQPPSLPITVYYAVLERACRSVLLNAPSEAPQI	80
gD-2	-PS-E-----I-----H-----	
gD-1	VRGASEDVRKQPYNLTIWFRMGGNCAIPITVMEYTECSY	120
gD-2	-----DEA-----HT-----Y-----D-----P-----	
gD-1	NKSLGACPIRTQPRWNYYSFSAVSEDNLGFLMHAPAFET	160
gD-2	-----V-----S-----	
gD-1	AGTYLRLVKINDWTEITQFILEHRAKGSKYALPLRIPPS	200
gD-2	-----RA-----A	
gD-1	ACLSPQAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQPTVAVYSLKIAI	240
gD-2	-----TSK-----L-----	
gD-1	WHGPKAPYTSTLLPPELSETPNATQPELAPEDPEDSALLE	280
gD-2	-----P-----D-T-----V-----	
gD-1	DPVGTVAPQIPPNNWHIPSIQDAATPYHPPATPNNMGLIAG	320
gD-2	---A---SS-----V---H-A---A-S-P---I---	319
gD-1	AVGGSLLAALVICGIVYWMHRRTRKAPKRIRLHPIREDDQ	360
gD-2	-LA---T-----G---AF---VR---AQM---L---D---A	359
gD-1	PSSHQPLFY	369
gD-2	-P-----	368

Röviden összefoglalva a gD—1 és gD—2 érett formája az előrejelzés szerint 369, illetve 368 aminosavból áll, a gD—2-nél „hiányzik” egy gyök, amely a gD—1 304. gyökének felel meg, és mintegy 85% homológia áll fenn a két szekvencia között. [Lásd még Lasky és munkatársai: DNA, 3, 23—29 (1984) és Rawls és munkatársai: J. Virol. 51, 263—265 (1984)].

A HSV gD—1 és gD—2 jellemzésében kutatásokat folytattak ezen anyagok antigén determinánsai elhelyezkedésének meghatározására fajta-specifikus és általános típusú monoklonális anyagok alkalmazása segítségével [Eisenberg és munkatársai: J. Virol. 41, 1099—1104 (1982); Cohen és munkatársai: J. Virol. 49, 102—108 (1984); Eisenberg és munkatársai: J. Virol. 49, 265—268 (1984) és az ezekben található további referenciák]. Ennek a munkának lényegében kettős célja az volt, hogy kiderítsen egy vagy több determinánst, amely stimulálja a semlegesítő antitestek termelését HSV gazdaszervezetben, és azonosítson olyan antitest anyagokat, amelyek az ilyen immunológiai jelentős anyagok kimutatásában, mennyiségi mérésében és affinitásos tisztításában megfelelően használhatók.

A szakterületen a fentebb jelzett fejlődés ellenére továbbra is igény van a gD—1-nek, gD—2-nek és szerkezetileg rokon anyagoknak, pl. a gD—1 és gD—2 fragmenseknek és/vagy anológoknak természetes és rekombináns forrásaikból való kimutatásában, mennyiségi elemzésében és affinitás kromatográfiával való izolálásában alkalmazható antitest-anyagokra.

A találmány szerint olyan új antitest anyagokat állítunk elő, amelyek egyedi, többirányú immunreaktivitást mutatnak a 1. és 2. típusú Herpes simplex vírus D-glikoproteint (HSV gD—1 és gD—2) és lényegében rokon anyagait illetően; valamint a gD—1, gD—2 és szerkezetileg rokon anyagaik kimutatásához, mennyiségi elemzéséhez és affinitás-kromatográfiával történő izolálásához használhatók.

A találmány tárgya tehát eljárás 1. és 2. típusú Herpes simplex vírusra fajlagos monoklonális antitestet termelő hibridómák előállítására és kiválasztására. A találmány értelmében tumor sejteket és gD—1 vagy gD—2 glikoproteinnel hiperimmunizált rágcélók lépsejtjeit fuzionálva hibridómákat állítunk elő, és elkülönítjük azokat a hibridómákat, amelyek 1. és 2. típusú Herpes simplex vírus D-glikoproteinjéhez, valamint

PELA(vagy V)PEDPEDSALLEDPV(vagy A)GTVA(vagy S) aminosavszekvencia részének vagy egészének, de legalább

PEDPEDSALL

aminosavszekvenciának a másolatát jelentő aminosavszekvenciájú fehérjeszerű anyagokhoz kötődni képes antitestet termelnek.

A találmány tárgya továbbá eljárás 1. és 2. típusú Herpes simplex vírusra fajlagos monoklonális antitestek előállítására. A talá-

mány értelmében tumor sejteket és gD—1 vagy gD—2 glikoproteinnel hiperimmunizált rágcélók lépsejtjeit fuzionálva hibridómákat állítunk elő, elkülönítjük azokat a hibridómákat, amelyek 1. és 2. típusú Herpes simplex vírus D-glikoproteinjéhez, valamint

PELLA(vagy V)PEDPEDSALLEDPV(vagy A)GTVA(vagy S)

aminosavszekvencia részének vagy egészének, de legalább

PEDPEDSALL

aminosavszekvenciának a másolatát jelentő aminosavszekvenciájú fehérjeszerű anyagokhoz kötődni képes antitestet termelnek, és a hibridómák által termelt monoklonális antitesteket elkülönítjük.

A találmány szerint 1. vagy 2. típusú Herpes simplex vírus D-glikoproteinjének, vagy ezek immunológiailag aktív fragmenseinek vagy analógjainak mennyiségét úgy határozzuk meg, hogy a szelektív immunológiai reakcióban egy a fentiekben előállított monoklonális antitestet alkalmazunk.

A fentiekben előállított monoklonális antitesttel képzett immuno-adszorbenssel 1. vagy 2. típusú Herpes simplex vírus D-glikoproteinjét vagy más, olyan fehérjeszerű anyagokat, amelyek a

PELA(vagy V)PEDPEDSALLEDPV(vagy A)GTVA(vagy S)

aminosav szekvencia részét vagy egészét tartalmazzák, affinitásos módszerrel tisztíthatunk.

A találmány szerinti antitest anyagok jellemzője, hogy közönséges típusú kötással kötődnek mint gD—1-hez, mind gD—2-hez, amelyek mind természetes, mind denaturált állapotban lehetnek. Ez azt jelzi, hogy az antitestek ugyanahhoz vagy közel ugyanahhoz az epitóphoz kötnek a két glikoproteinben belül, és hogy a kötött epitópok lineárisok, és nem konformációs epitópok. A találmány szerinti antitest anyagok további jellemzője, hogy reverzibilis immuno-kötéssel kötődnek olyan fehérje-szerű anyagokhoz, amelyek tartalmazzák az aminosav gyökök azon folyamatos szekvenciáinak egészét vagy egy immunológiailag jelentős részét, amely a gD—1 és gD—2 előrejelzett szekvenciáinak 266. és 287. gyökei közt terül el, vagyis a

PELA(vagy V)PEDPEDSALLEDPV(vagy A)GTVA(vagy S)

szekvenciát. A találmány szerinti antitest anyagok előnyösen hibridóma sejtvonalak által termelt monoklonális antitestek.

A találmány szerint előállított antitestekre példaként az ATCC HB8606 egér-egér hibridóma sejtvonal által termelt monoklonális antitesteket írjuk le, mely sejtvonalat 1984. október 26-án helyeztük letétbe az American Type Culture Collection-nál (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852), az USA Szabadalmi és Védjegy Hivatal mikroorganizmusok letétbe helyezésével kapcsolatos követelményeivel összhangban.

A találmány szerint előállított egyik előnyös antitest a „DL—6”-nak nevezett IgG

monoklonális antitest, amelyet az ATCC HB8606 hibridóma sejtvonal állít elő. Ez az antitest a következőkkel jellemezhető: (a) „A” fehérjét kötő kapacitás; (b) HSV—1 és HSV—2 in vitro fertőzőképességének semlegesítésére szolgáló kapacitás; (c) fajlagos immunológiai reaktivitás természetben előforduló és rekombináns gD—1 és gD—2-vel, és kapacitás reverzibilis immuno-kötésekre ezekhez, természetes és denaturált állapotban egyaránt, akár glikozilezett, akár nem glikozilezett formában; és (d) fajlagos immunológiai reaktivitás és kapacitás reverzibilis immuno-kötésekre fehérje-szerű anyagokhoz, beleértve egy olyan aminosav szekvencia egészét vagy immunológiailag jelentős részét, amely a gD—1 és gD—2 előrejelzett, 266.—287. közötti gyökeinek másolata, azaz

PELA(vagy V)PEDPEDSALLEDPV(vagy A)GTVA(vagy S).

Az itt speciálisan DL—6 antitesttel immunreaktívnak jelzett fehérjeszerű anyagok között vannak a rekombináns módszerekkel termelt gD—1 fragmensek, mint pl. a transzformált *E. coli* sejtekben termelt „8—300 [1]” nem glikozilezett fragmens, a Hep—2 sejtekben termelt glikozilezett „1—287 [1]” fragmens, az *E. coli* sejtekben termelt „—5—369 [1]” termék, és az aminosavak polimerizálásával termelt „266—279 [1]”, „266—279 [2]” és „268—287 [1]” szintetikus peptidek. A DL—6 antitesttel nem immunreaktívak a rekombinánsok által termelt gD—1 fragmensek, mint pl. a CHO sejtekben termelt „1—275 [1]” glikozilezett fragmens, valamint a gD—1 és gD—2 aminosav-terminális kezdő 23 gyöke különböző részeinek másolatát jelentő szintetikus peptidek és ezek „hibridjei” és a „340—356 [1]” szintetikus peptid, amely a gD—1 340. és 356. közti gyökei előrejelzett primer szerkezeti elrendezésének másolata.

A DL—6 antitest alkalmazása a természetes forrásból eredő gD—1 affinitásos tisztításában nagyon hatásosnak bizonyul, az előzetesen meghatározott immunológiailag aktív gD—1 két-háromszoros termelését nyújtva ahhoz viszonyítva, mint amennyit korábban monoklonális anti-gD antitest készítményt alkalmazva nyertek. A fertőzött sejt eredetű, így izolált gD—1 előzetes vizsgálatok szerint legalább olyan aktív protektív immunogénként, mint a korábban izolált anyagok.

Az alábbi példák a találmány szerinti eljárás gyakorlati kivitelezését mutatjuk be az ATCC HB8606 hibridóma sejtvonal előállítására. Leírjuk az ezekkel a sejtvonalakkal termelt monoklonális antitestek jellemzőit, szaporítását és tulajdonságainak vizsgálatát, különös tekintettel az ATCC HB8606 hibridóma sejtvonal által termelt, jelenleg előnyös „DL—6” antitest immunológiai tulajdonságaira és alkalmazására.

Részletesebben, az 1. példa az utána következő példákban alkalmazott általános módszerekre és anyagokra vonatkozik. A 2. példá-

ban ismertetett módszerrel egereket stimulálunk gD—1 elleni poliklonális antitestek termelésére; az egér lépsejtet egér mielóma-sejtekkel fuzionáljuk, és az ATCC HB8606 sejtvonalat tartalmazó hibridóma sejteket kiválasztjuk, klónozzuk és tenyésztjük. A 3. példa a négy fentebb jelzett sejtvonal által termelt monoklonális antitestek immun-reaktivitásának előzetes szűrővizsgálatára vonatkozik. A 4. példa a DL—6 monoklonális antitest részletesebb vizsgálatára vonatkozik, mely során részletesebben feltárjuk az antitest immunológiai tulajdonságait és azoknak az epitópoknak a természetét, amelyekhez ez kötődik. Az 5. példában a DL—6 antitestnek a természetes anyagokból származó gD—1 affinitásos tisztításában való alkalmazását írjuk le.

1. Példa

A. Sejtek, vírusok és radioaktív jelzési eljárások

A BHK és KB sejtek tenyésztéséhez és fenntartásában és a vírus szaporításában alkalmazott általános körülményeket a Cohen és munkatársai által leírtak szerint határozzuk meg [J. Virol. 14, 20—25 (1974)] és J. Virol. 10, 1021—2030 (1972)]. A fertőzéshez 20 PFU (tarfoli-képző egység) mennyiséget alkalmazunk a HSV—1-nél (HF törzs) és 10 PFU-t a HSV—2-nél (Savage törzs). A HSV-vel fertőzött sejtek jelzéséhez alkalmazott eljárások [³⁵S]-metioninnal (fajlagos aktivitás 600 Ci/mmól) és [2,3-³H]-argininnel (fajlagos aktivitás 15 Ci/mmól) azok, amelyeket a következő irodalmi helyeken írtak le: Cohen és munkatársai, J. Virol. 27, 172—181 (1978); Eisenberg és munkatársai: J. Virol. 31, 608—620 (1979); Eisenberg és munkatársai, J. Virol. 41, 478—488 (1982); és Eisenberg és munkatársai: J. Virol. 35, 428—435 (1980).

B. Monoklonális antitestek

Az összehasonlítási célokkal alkalmazott monoklonális antitestek („MCAb's”) a következő példákban az alábbiak: MCAb HD—1 (I. csoport) és MCAb 170 (VII. csoport), amelyek a következő irodalmi helyek szerinti antitestek: Pereira és munkatársai: Infect. and Immun. 35, 363—367 (1982) és Eisenberg és munkatársai: J. Virol. 41, 478—488 (1982); MCAb's55S, 57 S (V. csoport), 11 S (III. csoport), 41 S (IV. csoport) és 45 S (VI. csoport), amelyek a következő irodalmi hely szerinti antitestek: Showalter és munkatársai: Infect. and Immun. 34, 684—692 (1981).

C. Szintetikus peptidek

Az antitestek peptidekkel való reaktivitásának a gD—1 és gD—2 1—23 helyzetein belüli gyökeire alapozott átvizsgálásában alkalmazott szintetikus peptideket a Cohen és munkatársai szerinti módszerrel állítjuk elő [J. Virol. 49, 102—108 (1984)]. A 340—356 [1] szintetikus peptideket ciszteinnel, amelyeket az amino-terminálshoz adunk, és

a 268—287[1] szintetikus peptideket ciszteinnel, amelyeket a karboxi-terminálisához adunk, a Peninsula Labs. Inc. állítja elő. A 266—279[1] és 266—279[2] szintetikus peptideket a jól ismert szilárd fázisú eljárásokkal állíthatjuk elő, Merrifield módszerét követve [J. Am. Chem. Soc. **85**, 2149—2154 (1963)]. A kürtőcsiga hemocianinhoz (keyhole limpet hemocyanin, KLH) való peptid kapcsolás eljárásait általában úgy végezzük, ahogyan ezt Liu és munkatársai leírták [Biochemistry, **18**, 690—697 (1979)]. Az immunfolt mérésekben (immunoblot assay) való alkalmazásához a peptideket 0,1 mól/liter triszt (pH 7,8) és 0,15 mól/liter HCl-t tartalmazó oldatban alkalmazzuk.

D. Natív és denaturált gD előállítás

Hacsak másképpen nem jelezzük, a gD—1-et és gD—2-t fertőzött sejtek citoplazma-extraktumaiból tisztítjuk affinitás kromatográfiával, amint ezt Eisenberg és munkatársai leírták [J. Virol. **41**, 477—488 (1982)]. Az immun-abszorbens oszlopról KSCN-el eluált és 0,01 mól/liter triszt (pH 7,5), 0,15 mól/liter NaCl-t, 0,1% Nonidet-P40-et (NP—40) tartalmazó pufferrel (TSN puffer) szemben dializált fehérjéket nevezzük „natív” konformációjú fehérjéknek. A denaturált anyagok előállításához tisztított gD—1-et vagy gD—2-t szuszpendálunk „szétzúzó” pufferben, hogy a végső koncentráció 3% SDS, 100 mmól/liter trisz, pH 7,0, 10% 2-merkaptó-etanol és 0,5% glicerín legyen. A mintát 5 percig forraljuk. Jód-acetamidot (0,1 mól/liter 0,1 mól/literes trisz-ben, pH 8,0) adunk hozzá, hogy a jód-acetamid végső koncentrációja 33 mmól/liter legyen, és a keveréket egy órán át inkubáljuk szobahőmérsékleten. A mintákat erőteljesen dializáljuk TSN pufferrel szemben.

E. Rekombináns gD anyagok

1.) Egy első megcsonkított glikoproteint („1—275[1]”), amely az érett gD—1 előrejelzett 1—275 gyökeit tartalmazza, állítunk elő a Lasky és munkatársai által leírt eljárással [Biotechnology, **2**, 527—532 (1984)], mint a transzformált kínai hörsőg petefészek sejtek szekréciós termékeit, és tisztítjuk ezeket Eisenberg és munkatársai szerint [J. Virol. **41**, 1099—1104 (1982)] affinitáskromatográfiával.

2.) Egy második megcsonkított glikoproteint („1—287[1]”), amely a gD—1 előrejelzett 1—287 gyökeinek és a HSV timidin kináz (TK) 48 karboxi-terminális gyökeinek fúziós termékét tartalmazza, állítunk elő Gibson és munkatársai által leírt eljárásokkal [J. Cell. Biochem, **8B**, Kiegészítő kötet, (1984): Kivonatok a 13. Éves UCLA Symposiumokról (Abstract, 13th Annual U.C.L.A. Symposia), N° 1337, 191. oldal; valamint J. Virol. **48**, 396—404 (1983)], mint vírussal fertőzött Hep—2 sejtek szekréciós termékeit. Röviden ismertetve, a vírus vektor tartalmazza a gD—1 gén egy megcsonkított

formáját (amely a gén SacI helyétől „fölfelé” terjed ki a 287. gyöknél levő NarI helyig), amelyet beiktatunk a TK gén BgIII helyébe. A fehérjét affinitás kromatográfiával tisztítjuk, MCAB11—436—1-et alkalmazva, amint ezt Noble és munkatársai leírják [J. Virol. **129**, 218—224 (1983)].

3.) Egy harmadik megcsonkított polipeptidet („8—300[1]”), amely a 8.-tól mintegy 300.-ig terjedő gyököket tartalmazza, állítjuk elő E. coli-ban Watson és munkatársai általános módszere szerint [Science, **218**, 381—384 (1982)].

4.) Egy fúziós polipeptidet („5—369[1]”), amely a gD—1 —5. helyzete és 369. helyzete közt terül el és a β -galaktosidáz II amino-terminális gyökét tartalmazza, E. coli gazdasejtek transzformálásával nyerjük olyan M13 mp8 vírus-vektorral, amelybe előzőleg egy NcoI—NruII gD—1 gént fragmenst iktattunk be Watson és munkatársai eljárása szerint (lásd fentebb) a vektorban jelen levő β -galaktosidáz génen belül.

F. Immuno-precipitáció és nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS—PAGE)

A glikoprotein D-t HSV—1-el vagy HSV—2-vel fertőzött sejtek extraktumaiból (a sejteket 6 órán át fertőzzük), immun-kicsapással nyerjük, antiszérumokat vagy MCAB-t és Staphylococcus aureus A fehérjét (IgG Sorb, New England Enzyme Center) alkalmazva. Az SDS—PAGE-t 10%-os akrilamid lapokon hajtjuk végre, amely akrilamid 0,4%-os N,N'-dialil-borkősav-diamiddal (DATD) végzett keresztkötésekkel van ellátva, amint ezt Eisenberg és munkatársai [J. Virol. **31**, 608—620 (1979)] és Watson [Gene, **26**, 307—312 (1983)] leírták. Az autoradiográfiához a géleket szűrőpapíron megszárítjuk és Kodak XAR—5 filmmel hozzuk érintkezésbe. A fluorográfiához a géleket Amplify nevű anyaggal (Amersham) kezeljük, szűrőpapíron szárítjuk, és Kodak XAR—5 filmre exponáljuk —70°C hőmérsékleten.

G. Immunfolt- és semlegesítési vizsgálatok

Az immunfolt vizsgálatokat úgy végezzük, amint ezt Cohen és munkatársai [J. Virol. **49**, 102—108 (1984)] és Hebrink és munkatársai [J. Immunol. Methods, **48**, 672—682 (1983)] leírták. A HSV—1-et (HF) vagy HSV—2-t (Savage) alkalmazó vírus-semlegesítési vizsgálatokat (50% tarfolt-csökkenési módszer) úgy hajtjuk végre, amint ezt Cohen és munkatársai leírták [J. Virol. **47**, 172—181 (1978), és J. Virol. **10**, 1021—2040 (1972)].

2. példa

Egér-egér hibridóma sejteket nyerünk a következő eljárás szerint. BALB/c egereket hiperimmunizálunk az 1. példa szerinti, affinitás kromatográfiával tisztított gD—1-el, 6ug kezdeti gD—1 dózissal intraperitoneálisan [lásd Long és munkatársai: Infect.

Immun. 37, 761—764 (1984)]. Három nap múlva intravénás emlékeztetőt adunk, amely 1 µg immunogént tartalmaz, a lépeket eltávolítjuk és a sejteket BALB/c SP2/O sejtekhez fuzionáljuk, PEG (polietilén-glikol) fúzió elősegítő anyagot alkalmazva McKearn módszere szerint [Kennett és munkatársai: „Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension In Biological Analysis“ (Monoklonális antitestek, hibridómák: új dimenzió a biológiai elemzésben) című munkájában, a 368—369 oldalon, Plenum Press kiadás, New York, New York (1980)]. A HAT kezelés után élő sejteket tartalmazó üregekből a felülúszókat átvizsgáljuk gD-re fajlagos antitestek jelenlétére immunfolt módszerrel. A gD—1-re és gD—2-re pozitív sejteket szubklonózásnak vetjük alá, és a reprezentatív sejtvonalat, amely a „DL—6“ monoklonális antitestet termeli, elhelyezzük az ATCC-nél HB8606 letéti számon. A monoklonális antitesteket lehet izolálni négy pozitív sejtvonal növesztésének tenyészfolyadékjából, AMICON szűrőes koncentrációval, amelyet ammónium-szulfátos kicsapás követ. Egy másik módszer szerint a koncentrált tenyészfolyadékot lehet abszorbeálni „A“ fehérje Sepharose oszlopon (Protein A Sepharose, Pharmacia Corp.). Megint másik változat szerint a monoklonális antitesteket lehet felerősített formában előállítani az ascites módszerrel, amint ezt általános módszerként Kennett és munkatársai leírták (lásd fentebb). Röviden ismertetve mintegy $3 \cdot 10^6$ — $3 \cdot 10^7$ hibridóma sejtet injektálunk BALB/c egerek 0,25 ml Pristan-nal feltöltött peritoneális üregeibe. Az antitesteket az ascites folyadékokból ammónium-szulfátos kicsapással és DEAE Sephadexen lehet izolálni, amint ezt Eisenberg és munkatársai leírták [J. Virol. 41, 1099—1104 (1982)]. Annak érdekében, hogy immun-adszorbens oszlopokat készítsünk, izolált 2. típusú IgG antitesteket kapcsolhatunk össze cianogén-bromiddal aktivált Sepharose 4B oszlopokkal, típikusan az 5—12 mg IgG/g Sepharose közti tartománynak megfelelő mennyiségekben. A tisztított antitesteket lehet jódózni 125 I-vel Greenwood és munkatársai klóramin—T módszere szerint [Biochem. J. 89, 114—123 (1963)] vagy, előnyösen, Liu és munkatársai laktoperoxidáz módszerével (lásd fentebb).

3. példa

A DL—6 monoklonális antitestet előzetesen átvizsgáljuk tisztított gD elleni immunfolt-elemzéssel és immunreaktív-nak találjuk a natív és denaturált gD—1 és gD—2 ellen egyaránt, de nem találjuk immunreaktív-nak az 1—275[1] rekombináns glikoprotein ellen. Ez azt jelzi, hogy a felismert, típusra közös epitóp nem az a szekvenciális epitóp (V. csoport), amelyről azt képzelték, hogy a gD—1 és gD—2 340. és 356. gyökei között van.

6

A gD—1 és gD—2 1.—23. gyökeinek másolatát jelentő szintetikus peptidekhez való kötődés hiányára alapozva, a (VII csoport) szekvenciális epitóp ebben a területben történő antitest felismerését kizárjuk. Az ATCC HB8606 tenyészfolyadékjában termelt és az ascites módszerrel felerősített DL—6 monoklonális antitesteket alkalmazzuk kiterjedtebb szűrővizsgálati eljárásokban, amint ezt a következő példában ismertetjük.

4. példa

A DL—6 antitestet fluorescens antitest-vizsgálatban vizsgáljuk fertőzött sejteken, és feltárjuk a típusra közös membrán immunfluoreszcenciát, amely jelzi hogy a felismert gD—1 és gD—2 epitópok rendelkezésre állnak a glikoproteineken való kötéshez, amikor ezek bele vannak iktatva a sejt-membránba.

A semlegesítési vizsgálatok (in vitro) feltárják, hogy a HSV—1-el 1:50 hígításnál és HSV—2-vel 1:20 hígításnál semlegesítődik a DL—6 antitest, az 50% végpontot alkalmazva Eisenberg és munkatársai módszere szerint [J. Virol. 41, 1099—1104 (1982)].

Immunfolt-vizsgálatot alkalmazunk az alábbi II. Táblázatban felsorolt szintetikus peptidek sorozatához való kötések átvizsgálására. Ebben a táblázatban a vizsgált peptidekben levő aminosav-szekvenciát az induló két számmal jelöljük és a zárójelben levő számok jelzik a szekvencia fajlagosságának típusát. A zárójelben levő H azt jelzi, hogy a szekvencia a vélt 1. típusú és 2. típusú szekvenciák hibridje.

A II. Táblázat peptidjeivel végzett immunfolt-vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy nincs immuno-reaktivitás a DL—6 és az (a) — (l) és a (p) peptidek között, de a DL—6 jelentős reaktivitást mutat az (m), (n) és (o) peptidekkel, amelyek a gD—1 és gD—2 266—279 gyökeinek és a gD—1 268—287 gyökeinek képviselői.

Mivel a DL—6 immunfolt vizsgálatok feltárják, hogy a tunikamicin jelenlétében nőtt, HSV—1-el és HSV—2-vel fertőzött sejtekből nyert durva csapadékokban jelentős reaktivitás van jelen gD—1-el és gD—2-vel, a DL—6 által felismert epitópban a szénhidrátok jelenléte kizárható.

A DL—6 immuno-reaktivitását rekombináns módszerekkel termelt különböző D-glikoproteinszerű fragmensekkel és analóg anyagokkal immunfolt-módszerrel határozzuk meg. Amint korábban említettük, a DL—6 lényegében nem reaktív a Lasky és munkatársai eljárásával (lásd fentebb) előállított 1—275[1] rekombináns glikoproteinnel. A DL—6 azonban immuno-reaktív minden olyan rekombináns termékkel, amely olyan aminosav-gyök szekvenciát tartalmaz, amely a gD—1 266. és 287. gyökei között terül el,

ilyenek az 1—287 [1] rekombináns, a 8—300 [1] rekombináns és az —5—396 [1]

rekombináns, amelyek az 1. példában vannak leírva.

II. TÁBLÁZAT

Peptidek		Aminosav-szekvencia
	1	23
/a/1—23 [1]		KYALADASLKMADPNRFRGKDL
/b/1—23 [2]		KYALADPSLKMADPNRFRGKNLP
/c/1—23 [H]		KYALADPSLKMADPNRFRGKDL
/d/1—16 [1]		KYALADASLKMADPNR
/e/1—16 [2]		KYALADPSLKMADPNR
/f/3—23 [H]		ALADPSLKMADPNRFRGKDL
/g/8—23 [1]		SLKMADPNRFRGKDL
/h/8—23 [2]		SLKMADPNRFRGKNLP
/i/12—23 [1]		MADPNRFRGKDL
/j/13—23 [2]		ADPNRFRGKNLP
/h/17—23 [1]		RFRGKDL
	266	279
/l/17—23 [2]		RFRGKNLP
/m/266—279 [1]		PELAPEDPEDSALL
/n/266—279 [2]		PELVPEDPEDSALL
	268	287
/o/340—356 [1]		LAPEDPEDSALLEDPVGTVA
	340	356
/p/340—356 [1]		HRRTKAPKRIRLPHIR

A fenti vizsgálatokkal feltárt immuno-reaktivitási „profil“-ra alapozva az alábbi következtetéseket lehet levonni a jelen találmány szerinti antitestek, ezen belül főleg az ezeket itt képviselő DL—6 antitest által felismert epitópot illetően. Az antitest felismeri mind a gD—1-et, mind a gD—2-t, mind natív, mind denaturált, mind nem glikozilezett formában, jelezve, hogy az epitóp tartalmaz egy típus-közös vagy lényegében típus-közös folyamatos aminosav gyök szekvenciát. Az antitest felismeri az összes rekombináns gD—1 másolatot és analógot, amelyek a gD—1 266.—287. gyökei közti folyamatos szekvenciát tartalmazzák. Az 1—275 [1] rekombináns glikoprotein felismerésének hiánya azt jelzi, hogy legalább bizonyos gyökök az előrejelzett 275. gyökön túl lényegesek az epitóp felismeréséhez (és összhangban a 266—279 [1] peptiddel való reaktivitással, valószínűleg négy vagy több további gyök érdekelt benne). Másrészt az antitest gD—1 és gD—2 típus-közös felismerő kapacitása, amikor összhangban van a 266—279 [1], 266—279 [2] és 268—287 [1] reaktív peptidek típus-fajlagos természetével, jelzi, hogy felismert epitóp magában foglalja azt a típus-közös szekvenciát, vagy a felismert epitóp bennfoglaltatik abban a típus-közös szekvenciában, amely közös a szintetikus peptideknél, ez az előrejelzett 270—279 gyökököt tartalmazó szekvencia, a PEDPEDSALL.

A megelőző példák arra a célra szolgáltak, hogy bemutassák a jelen találmány szerinti nagyon fajlagos monoklonális antites-

tek nyilvánvaló előnyeit a gD—1, gD—2 és szerkezetileg rokon anyagok kimutatásában és mennyiségi értékelésében, a rokon anyagokba beleértve azokat a peptideket és fehérjeszerű anyagokat, amelyek aminosav gyökök olyan folyamatos szekvenciáit tartalmazzák, amelyek részben vagy egészben másolatai a gD—1 és gD—2 266—287 aminosav-gyökeinek. A következő bemutató példák a találmány szerinti antitestekkel olyan összefüggésben foglalkoznak, hogy megállapítják általában az affinitás mértékét az itt kifejlesztett antitestek és a gD—1, gD—2 és szerkezetileg rokon vegyületek között.

5. példa

Ascites eredetű DL—6 antitestet abszorbeálunk cianogén bromiddal aktivált Sepharose 4B oszlopon, amint ezt korábban leírtuk, és ezt alkalmazzuk feltöltött sejtekből gD—1 affinitásos tisztítással végzett izolálására. Azonos körülményeket alkalmazva a DL—6 antitestet tartalmazó oszlop 2—3-szor több cél-glikoproteint képes megkötni, mint amikor MCAB HD—1-et (I. csoport) alkalmazunk. Ezen túl, egereken végzett előzetes vakcinációs tanulmányok, amelyekben a DL—6 affinitás-kromatográfiával tisztított anyagot alkalmazunk aktív immunogénként, azt mutatják, hogy az anyag legalább annyira aktív egy letális vírus-fertőzés elleni védő immunválasz kiváltásában, mint a HD—1 affinitás-kromatográfiával tisztított anyag.

Egy „versengéses” vizsgálatot hajtunk végre, ahol a DL—6; HD—1; 11S, 45S és 170

monoklonális antitesteket (100–200 µl, amely 150–600 µg IgC-t képvisel) kötünk Sepharose 4B oszlopra és az oszlopot felhasználjuk HSV-1-el fertőzött sejtek citoplazmás extraktumainak adszorbeálására (100 µl extraktum 37°C hőmérsékleten 2 órán át inkubálva). Az immunoadszorbenseket tízszer mossuk puifferral és jódózott második antitestet (kb. 250 000 cpm) adunk hozzá. Erőteljes mosás után az oszlopot gamma-számlálóban számlálásnak vetjük alá. Elméletileg mivel antitestek főlegesen alkalmazzuk az oszlopon, azonos típusú jelzett antitest nem kötődhet az oszlophoz. Az összes antitest között, amelyet jelzett partnerjeik ellen vizsgálunk, a DL-6 mutatja a legnagyobb kapacitást a gD-1-hez való kötődésben, jelzett partnerének kiszorításával.

A megelőző bemutatató példák egér lép- és tumorsejtek standard, kémiai elősegített fúziójának segítségével képzett monoklonális antitest-termelő hibridóma sejtvonalakra vonatkoztak. Nyilvánvaló azonban, hogy hibridóma sejt termelő technikák széles választéka alkalmazható különböző emlős fajok sejtjeihez a találmány szerinti hibridóma sejtvonalak előállítására, amelyek gD-1-re, gD-2-re és szerkezetileg rokon anyagokra fajlagosan immunológiailag reaktív antitestek termelésére képesek, a szerkezetileg rokon anyagok közé beleértve az RNHPED-PEDS ALLCOR' aminosav-szekvenciát, ahol R és R' azonos vagy különböző aminosav-gyököket jelentenek, vagy R jelentése hidrogénatom, vagy R' jelentése hidroxilcsoport.

Speciálisan vonatkozik a jelen találmány azokra a hibridóma sejtvonalakra, amelyek ember, patkány vagy más emlős fajok sejt-anyagainak genetikai fúziójával képződnek (vagy ezek fajok közti keverékeivel), a fúziót akár kémiai, akár elektromos közvetítéssel végezve, és akár teljes sejttel, akár ezek genetikailag fontos töredékeivel végezve. Hasonlóképpen, bár a megelőző bemutatató példákban a hibridómák kifejlesztésében alkalmazott immunogén természetes forrásokból származó, affinitás-kromatográfiával tisztított gD-1 volt, egy sor más immunogén is szolgálhat ennek megfelelő helyettesítésére. Jellegzetes helyettesítések lehetnek erre a célra a gD-2, valamint a gD-1 és gD-2 polipeptid másolatok natív és denaturált formában, amely másolatok rekombináns módszerekkel készülnek megfelelő mikrobiológiai gazdaszervezetekben, pl. baktériumokban, elesztőkben és emlős sejtekben megfelelő tenyésztésben, és amelyek lehetnek glikozilezett vagy nem glikozilezett formában, további amino- vagy karboxi-terminális aminosavakkal vagy azok nélkül. További előnyös helyettesítések lehetnek azok a szintetikus peptidok, amelyek a gD-1 vagy gD-2 266–287. helyzeteinél jelen levő aminosavgyök-szekvenciák egészének vagy immunológiailag fontos részének másolatai, ilyen pl. az RNHPED-PED SALLCOR' folyamatos szekvencia, ahol

R és R' azonos vagy különböző aminosav-gyököket jelent, vagy R jelentése hidrogénatom vagy R' jelentése hidroxilcsoport.

Számos módosítás és változat képzelhető el a fentebb bemutatott példákban leírtakhoz képest azok számára, akik a szakterületen jártasak, következésképpen nem a bemutatásra szánt példák, hanem az ez után következő igénypontok szabják meg a találmány oltalmi körét.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás 1. és 2. típusú Herpes simplex vírusra fajlagos monoklonális antitestet termelő hibridómák előállítására és kiválasztására, *azzal jellemezve*, hogy tumor sejteket és gD-1 vagy gD-2 glikoproteinnel hiperimmunizált rágcslók lépsejtjeit fuzionálva hibridóma sejteket állítunk elő, és kiválasztjuk azokat a hibridóma sejteket, amelyek 1. és 2. típusú Herpes simplex vírus D-glikoproteinjéhez, valamint

PELA(vagy V)PEDPEDSALLEDPV(vagy A)GTVA(vagy S)

aminosavszekvencia részének vagy egészének, de legalább PEDPEDSALL

aminosavszekvenciának a másolatát jelentő aminosavszekvenciájú fehérjeszerű anyagokhoz kötődni képes antitestet termelnek.

2. Eljárás 1. és 2. típusú Herpes simplex vírusra fajlagos monoklonális antitestek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy tumor sejteket és gD-1 vagy gD-2 glikoproteinnel hiperimmunizált rágcslók lépsejtjeit fuzionálva hibridóma sejteket állítunk elő, kiválasztjuk azokat a hibridóma sejteket, amelyek 1. és 2. típusú Herpes simplex vírus D-glikoproteinjéhez, valamint

PELA(vagy V)PEDPEDSALLEDPV(vagy A)GTVA(vagy S)

aminosavszekvencia részének vagy egészének, de legalább PEDPEDSALL

aminosavszekvenciának a másolatát jelentő aminosavszekvenciájú fehérjeszerű anyagokhoz kötődni képes antitestet termelnek, és a hibridóma sejtek által termelt monoklonális antitesteket elválasztjuk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás 1. és 2. típusú Herpes simplex vírus D-glikoproteinjéhez, valamint

PELA(vagy V)PEDPEDSALLEDPV(vagy A)GTVA(vagy S)

aminosavszekvencia részének vagy egészének, de legalább PEDPEDSALL

aminosavszekvenciának a másolatát jelentő aminosavszekvenciájú fehérjeszerű anyagokhoz fajlagosan kötődni képes monoklonális antitestek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy ATCC HB 8606 hibridóma sejtvonal által termelt monoklonális antitesteket választunk el.

4. Immunológiai eljárás 1. vagy 2. típusú Herpes simplex vírus D-glikoproteinjének vagy immunológiailag aktív fragmenseinek

vagy analógjainak elválasztására ezekre fajlagos antitesttel végbemenő szelektív immunológia reakció alapján, *azzal jellemezve*, hogy a 2. igénypont szerinti eljárással előállított monoklonális antitestet alkalmazunk.

5. Immunológiai eljárás 1. vagy 2. típusú Herpes simplex vírus D-glikoproteinjének vagy immunológiailag aktív fragmenseinek vagy analógjainak kvantitatív meghatározására ezekre fajlagos antitesttel végbemenő szelektív immunológiai reakció alapján, *azzal jellemezve*, hogy a 2. igénypont szerinti eljárás-

5

10

rással előállított monoklonális antitestet alkalmazunk.

6. 1. és 2. típusú Herpes simplex vírus D-glikoproteinjének vagy más,

PELLA(vagy V)PEDPEDSALLEDPV(vagy A)GTVA(vagy S)

aminosavszekvencia részét vagy egészét, de legalább PEDPEDSALL

aminosavszekvenciát magában foglaló fehérjeszerű anyagok affinitás-tisztítására alkalmazható immunadszorbens, *azzal jellemezve*, hogy szilárd hordozóhoz kapcsolt, 2. igénypont szerinti eljárással előállított monoklonális antitestből áll.

Rajz nélkül

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető

№ 3086. Nyomdaipari vállalat, Uzsgorod.