(19) DANMARK

(12) PATENTSKRIFT (11) 166732 B1

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1872/86
(22) Indleveringsdag: 23 apr 1986
(24) Løbedag: 05 aug 1985
(41) Alm. tilgængelig: 23 apr 1986
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 05 jul 1993
(86) International ansøgning nr.: PCT/US85/01481
(86) International indleveringsdag: 05 aug 1985
(85) Videreførelsesdag: 23 apr 1986
(30) Prioritet: 24 aug 1984 US 644205 31 jan 1985 US 696582

(51) Int.Cl.5 C 07 K 15/28
C 12 N 15/38
C 12 P 21/08

(73) Patenthaver: *UNIVERSITY PATENTS INC.; 1465 Post Road East; Westport, CT 06880, US
(72) Opfinder: Gary H. *Cohen; US, Roselyn J. *Eisenberg; US

(83) Deponering af mikroorganismer

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Monoklonalt antistof, hybridomacellelinie, som kan producere det samt dets anvendelse ved immunologiske fremgangsmåder til isolering eller kvantitativ påvisning af glycoprotein D i herpes simplex virus type 1 eller type 2 og i et immunoabsorptionsmateriale til brug ved affinitetsrensning af glycoprotein D

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: Journal of Virology bind 41 (1982), side 478-488

(57) Sammendrag:

1872-86

Antistoffer, der udviser enestående, multispecifikke immunoreaktiviteter med hensyn til glycoprotein D fra herpes simplex virus type 1 og 2 (HVS gD-1 og gD-2) og strukturelt beslægtede forbindelser. Til illustrering er et IgG type 2 monoklonalt antistof produceret af mus-mus-hybridomcellelinie A.T.C.C. nr. HB8606 i stand til in vitro at neutralisere HSV-1 og HSV-2 infektivitet og specifik immunologisk reaktivitet og reversibel immunbinding med naturligt forekommende og rekombinant gD-1 og gD-2 både i nativ og denatureret form såvel som proteinholdige materialer (produceret f.eks. ved proteolytisk fordøjelse af naturligt forekommende materialer, ved rekombinantmetoder eller ved polymerisation af aminosyrer), som omfatter en primær strukturel konformation, der i alt væsentligt gengiver en del eller alle de rester, der er forudsagt at eksistere som resterne 266--287 i gD-1 og gD-2 (dvs. PELA(eller V) PEDPEDSALLEDPV(eller A)GTVA(eller S)). Beskrevet er desuden særlige fremgangsmåder til påvisning, kvantificering og isolering ved affinitetsrensning af gD-1, gD-2 og strukturelt beslægtede for-

Den foreliggende opfindelse angår et monoklonalt antistof, der udviser enestående, multispecifikke immunoreaktiviteter med hensyn til glycoprotein D i herpes simplex virus af både type 1 og 2 (HSV gD-1 og gD-2) og strukturelt beslægtede forbindelser.

Opfindelsen angår endvidere en hybridomcellelinie, som kan producere det her omhandlede, monoklonale antistof, dettes anvendelse ved immunologiske fremgangsmåder til isolering eller kvantitativ påvisning af ovennævnte glycoprotein D samt et immunoabsorptionsmiddel til brug ved affinitetsrensning af ovennævnte glycoprotein D og indeholdende det omhandlede monoklonale antistof.

I den seneste tid har en væsentlig del af forskningen været rettet mod isoleringen og karakteriseringen af herpes simplex virus glycoproteinerne, som udgør strukturelle komponenter i virionkappen og sandsynligvis spiller en vigtig rolle ved initiering af virusinfektion. Blandt de mere betydelige fremskridt, der er baseret på denne forskning, er ansøgernes opdagelse af hidtil ukendte præparater af HSV glycoprotein D, som ved anvendelse som det aktive immunogen i vaccinesammensætninger udløser betydelig beskyttelse mod HSV infektion, og ansøgernes yderligere opdagelse af immunologisk betydningsfulde polypeptider, som gengiver eller i alt væsentligt gengiver kontinuerte sekvenser af aminosyrer, der findes i HSV gD. Dette er beskrevet i US-patentskrift nr. 4.762.708.

Forskning i karakteriseringen af HSV gD-1 og gD-2 er blevet væsentligt understøttet af de resultater, der er fremkommet ved anvendelsen af rekombinant DNA-teknikker på kloning og ekspression i mikrobielle værter (f.eks. bakterier, gær og pattedyrsceller i kultur) af DNA sekvenser, der koder for en del eller alle polypeptidsekvenserne i gD-1 og gD-2. DNA sekvensordningen af gener, der koder for proteinerne, har resulteret i forudsigelse af deres primære strukturelle konformation (aminosyresekvens), jvf. f.eks. Watson et al., Science, 218, s. 318-384 (1982), hvori er anført

den forudsagte sekvens for gD-1 inklusive både et "leder" område og et område betegnet som området for det-"fuldt udviklede" protein. Lignende rekombinantmetoder har gjort det muligt at forudsige gD-2 sekvensen og at sammeligne denne med gD-1. Jvf. i denne forbindelse Watson, Gene, 26, s. 307-312 (1983), som giver en generel information som vist i tabel I om den komparative primære strukturelle konformation (aminosyresekvenser) forudsagt for "fuldt udviklet" HSV gD-1 og gD-2 baseret på DNA sekvensordning.

I tabellen og i beskrivelsen er anvendt følgende enkelt- og trebogstavs- "koder" for aminosyreresterne: A = Ala = alanin, C = Cys = cystein, D = Asp = asparaginsyre, E = Glu = glutaminsyre, F = Phe = phenylalanin, G = Gly = glycin, H = His = histidin, I = Ile = isoleucin, K = Lys = lysin, L = Leu = leucin, M = Met = methionin, N = Asn = Asparagin, P = Pro = prolin, Q = Gln = glutamin, R = Arg = arginin, S = Ser = serin, T = Thr = threonin, V = Val = valin, W = Trp = tryptophan og Y = Tyr = tyrosin.

Tabel I

	1	
gD-1	KYALADASLKMADPNRFRGKDLPVLDQLTDPPGVRRVYHI	40
gD-2	------P----------N----------K-----	
gD-1	QAGLPDPFQPPSLPITVYYAVLERACRSVLLNAPSEAPQI	80
gD-2	-PS-E-------I------------------H--------	
gD-1	VRGASEDVRKQPYNLTIAWFRMGGNCAIPITVMEYTECSY	120
gD-2	-----DEA--HT-------Y---D----------P-	
gD-1	NKSLGACPIRTQPRWNYYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFET	160
gD-2	-----V---------S----------	
gD-1	AGTYLRLVKINDWTEITQFILEHRAKGSCKYALPLRIPPS	200
gD-2	----------RA----------A	
gD-1	ACLSPQAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQRTVAVYSLKIAG	240
gD-2	---TSK----------L-------	
gD-1	WHGPKAPYTSTLLPPELSETPNATQPELAPEDPEDSALLE	280
gD-2	-----P----------D-T--------V----------	

Tabel I (fortsat)

```
gD-1  DPVGTVAPQIPPNWHIPSIQDAATPYHPPATPNNMGLIAG    320
gD-2  --A---SS-------------V- -H-A--A-S-P---I- -  319

gD-1  AVGGSLLAALVICGIVYWMHRRTRKAPKRIRLPHIREDDQ    360
gD-2  -LA--T------G--AF-VR--AQM----L------D--A    359

gD-1  PSSHQPLFY   369
gD-2  -P-------   368
```

Kort beskrevet forudsiges det, at fuldt udviklede former af gD-1 og gD-2 består af henholdsvis 369 og 368 aminosyrerester, idet gD-2 "mangler" en rest svarende til rest nr. 304 i gD-1, og idet der eksisterer en omtrent 85% homologi mellem de to sekvenser, jvf. også Lasky, et al., DNA, 3, s. 23-29 (1984), og Rawls, et al., J. Virol., 51, s. 263-265 (1984).

Ledsagende forskning med hensyn til karakteriseringen af HSV gD-1 og gD-2 har været rettet mod lokaliseringen af antigene determinanter i disse materialer, jvf. Eisenberg, et al., J. Virol., 41, s. 1099-1104 (1982), Cohen, et al., J.Virol., 49, s. 102-108 (1984), Eisenberg, et al., J.Virol., 49, s. 265-268 (1984), med referencer, ved at anvende typespecifikke og typefælles, monoklonale antistoffer. Det i alt væsentligt dobbelte mål med dette arbejde har været konstateringen af én eller flere determinanter, der stimulerer produktionen af neutraliserende antistoffer i HSV værter, og identifikationen af antistoffer tilsvarende anvendelige til påvisning, kvantificering og affinitetsrensning af sådanne immunologisk signifikante stoffer.

Endvidere er der i J. Virol 41, side 478-488 (1982), beskrevet en række monoklonale antistoffer mod gD-1 og gD-2, som er blevet sammenlignet for neutralisation og radioimmunoudfældning (RIP). Disse antistoffer falder i 8 separate grupper, hvoraf det for gruppe II er vist, at de antistoffer deri, betegnet HD-3 og 12S, er typefælles, hvad angår RIP, men typespecifikke for gD-1 med hensyn

til neutralisation.

Også det her omhandlede, monoklonale antistof hører til gruppe II; men til forskel fra de kendte (ikke mere tilgængelige) antistoffer har det her omhandlede antistof typefælles reaktivitet. Som nærmere belyst i det følgende viser dette sig ved, at det immunobinder reversibelt til aminosyresekvensen 266-287 fra ovenstående tabel I, uanset de viste forskelle mellem gD-1 og gD-2. Det er ikke kendt, til hvilke(n) aminosyresekvens(er) de kendte antistoffer HD-3 og 12S binder.

Til trods for de ovenfor anførte fremskridt inden for den kendte teknik, er der stadig et behov for antistoffer, der er anvendelige til påvisning, kvantificering og isolering ved affinitetsrensning fra naturlige og rekombinantkilder af gD-1, gD-2 og strukturelt beslægtede forbindelser, såsom gD-1 og gD-2 fragmenter og/eller analoge forbindelser.

Med henblik på opfyldelse af dette behov er der ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebragt et hidtil ukendt, monoklonalt antistof, der er ejendommeligt ved, at det specifikt kan binde med glycoprotein D fra herpes simplex virus af både type 1 og 2 og med et proteinholdigt materiale, som indeholder en aminosyresekvens, der gengiver en del af eller hele følgende sekvens:

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

Det her omhandlede, monoklonale antistof anvendes til påvisning, kvantificering og isolering ved affinitetsrensning af gD-1, gD-2 og strukturelt beslægtede forbindelser.

Det har nemlig vist sig, at det her omhandlede antistof er i stand til at binde mere gD-1 og gD-2 end de kendte, monoklonale antistoffer, og at præparater af specielt gD-1 isoleret ved hjælp af det her omhandlede antistof har større immunogenicitet end tilsvarende præparater iso-

leret ved hjælp af kendte antistoffer, som erkender andre aminosyresekvenser end den ovenfor viste (aminosyrerne 266-287 i tabel I).

I overensstemmelse hermed angår den foreliggende opfindelse tillige en fremgangsmåde til isolering eller til kvantitativ påvisning af glycoprotein D fra herpes simplex virus type 1 eller type 2 eller immunologisk aktive fragmenter eller analoge deraf på basis af en selektiv immunologisk reaktion med et antistof, der er specifikt herfor, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man anvender det her omhandlede, monoklonale antistof.

Desuden angår opfindelsen et immunoabsorptionsmiddel til brug ved affinitetsrensning af glycoprotein D fra herpes simplex virus type 1 eller 2 eller andre proteinholdige materialer indeholdende en del af eller følgende sekvens af aminosyrer,

PELA(eller V)PEDPEDSALLEDPV(eller A)GTVA(eller S),

hvilket middel er ejendommeligt ved, at det udgøres af en fast understøtning og forbundet dermed det her omhandlede, monoklonale antistof.

Antistoffer ifølge opfindelsen er blandt andet karakteriseret ved typefælles binding både til gD-1 og gD-2 både i nativ og denatureret tilstand, hvilket viser, at antistofferne binder til den samme eller i alt væsentligt den samme epitop indenfor de to glycoproteiner, og at den bundne epitop er en lineær snarere end en konformationel epitop. Antistofferne ifølge opfindelsen er yderligere karakteriseret ved reversibel immunbinding til proteinholdige materialer, som omfatter alle eller en immunologisk signifikant del af den kontinuerte sekvens af aminosyrerester, der strækker sig fra resterne 266 til 287 i den forudsagte sekvens for gD-1 og gD-2, dvs. PELA(eller V)-PEDPEDSALLEDPV(eller A)GTVA(eller S).

I foretrukne udførelsesformer omfatter antistofferne ifølge opfindelsen monoklonale antistoffer produceret af hybridomcellelinier.

Derfor angår opfindelsen også en hybridomcellelinie, som er ejendommelig ved, at den kan producere det her omhandlede, monoklonale antistof. Det foretrækkes, at hybridomcellelinien indeholder et genetisk materiale fra mus eller mennesker, og især foretrækkes hybridomcellelinie A.T.C.C. nr. HB8606.

Sidstnævnte cellelinie A.T.C.C. nr. HB8606, er en mus-mus hybridomcellelinie deponeret den 26. oktober 1984 hos the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, i overensstemmelse med U.S. Patent and Trademark Office's krav til mikroorganismedeponeringer.

Den specielt foretrukne udførelsesform for antistoffet ifølge opfindelsen er det monoklonale antistof IgG betegnet "DL-6", som er produceret af hybridomcellelinien A.T.C.C. nr. HB8606.

Dette antistof er karakteriseret ved (a) evne til at binde protein A, (b) evne til at neutralisere in vitro infektivitet hos HSV-1 og HSV-2, (c) specifik immunologisk reaktivitet med og evne til reversibelt at immunbinde til naturligt forekommende og rekombinant gD-1 og gD-2 i nativ og denatureret konformation, hvad enten der foreligger glycosylering eller ej, og (d) specifik immunologisk reaktivitet med og evne til reversibelt at immunbinde til proteinholdige materialer inklusive alle eller en væsentlig, immunologisk signifikant del af en aminosyresekvens, der kan gengive sekvensen forudsagt at eksistere ved resterne 266 til 287 i gD-1 og gD-2, dvs. PELA(eller V)PEDPEDSALLEDPV(eller A)GTVA(eller S). Blandt de proteinholdige materialer, der her er specifikt anført som værende immunoreaktive med antistof DL-6, er gD-1 fragmenter produceret ved rekombinantmetodikker, såsom det ikke-glycosylerede fragment "8-300[1]" produceret i trans-

formerede E.coli celler, et glycosileret "1-287[1]" fragment produceret i Hep-2 celler, et "-5-369[1]" produkt produceret i E.coli celler og syntetiske peptider "266--279[1]", "266-279[2]" og "268-287[1]" produceret ved polymerisation af aminosyrer. Ikke-immunoreaktive med antistoffet DL-6 er rekombinantproducerede gD-1 fragmenter, såsom det glycosylerede fragment "1-275[1]" produceret i CHO celler, syntetiske peptider, der kan gengive forskellige dele af de initielle 23 rester i aminoterminalen i gD-1 og gD-2 og "hybrider" deraf samt et syntetisk peptid "340-356[1]", som gengiver den forudsagte primære strukturelle konformation for resterne 340 til 356 i gD-1.

Anvendelse af antistof DL-6 ved affinitetsrensning af gD-1 fra naturlige kilder har vist sig at være højeffektivt, idet der opnås udbytter af immunologisk aktivt gD-1, der præliminært er bestemt til at være to til tre gange udbyttet, der er opnået ved at anvende kendt monoklonal anti-gD antistofpræparation. Det således isolerede gD-1 hidrørende fra dyrkning af inficerede celler har umiddelbart vist sig at være mindst lige så aktivt et beskyttelsesimmunogen som tidligere isolerede materialer.

Andre sider og fordele ved opfindelsen vil fremgå af den følgende detaljerede beskrivelse af umiddelbart foretrukne udførelsesformer.

De følgende eksempler viser udøvelsen af opfindelsen i forbindelse med produktionen af hybridomcellelinie A.T.C.C. nr. HB8606. Vist er desuden karakteriseringen, forstærkningen og bestemmelsen af egenskaberne hos de monoklonale antistoffer produceret af disse cellelinier med speciel vægt på de immunologiske egenskaber og anvendelser af det umiddelbart foretrukne antistof "DL-6" produceret af hybridomcellelinien A.T.C.C. nr. HB8606.

Mere specifikt angår eksempel 1 generelle metoder og materialer anvendt på forskellig måde i de følgende eksempler. Eksempel 2 angår stimuleringen af en mus i forbindelse med produktion af polyklonale antistoffer for

gD-1, fusion af miltceller fra mus med myelomaceller fra mus, samt screening, kloning og dyrkning af hybridomceller, der indeholder cellelinien A.T.C.C. nr. HB8606. Eksempel 3 angår præliminær screening af immunoreaktivitet hos monoklonale antistoffer produceret af de ovenfor anførte fire cellelinier. Eksempel 4 angår en mere ekstensiv screening af monoklonalt antistof DL-6, der tjener til en mere fuldstændig bestemmelse af dets immunologiske egenskaber og naturen af den epitop, som det bindes til. Eksempel 5 angår en præliminær udøvelse af fremgangsmåderne i forbindelse med anvendelse af antistof DL-6 ved affinitetsrensning af gD-1 fra naturlige kilder.

Eksempel 1

A. Celler, virus og fremgangsmåder til radioaktiv mærkning

De generelle betingelser, der anvendes til dyrkning og opretholdelse af BHK og KB celler og til formering af virus, er som beskrevet i Cohen, et al., J.Virol., 14, s. 20-25 (1974) og Cohen, et al. J.Virol., 10, s. 1021-2030 (1972). Til infektionen anvendes der en tilført mængde på 20 pfu af HSV-1 (stamme HF) og 10 pfu af HSV-2 (stamme Savage). Fremgangsmåderne til mærkning af HSV inficerede celler med [^{35}S]-methionin (specifik aktivitet: 600 Ci/mmol) og [2,3-^{3}H]-arginin (specifik aktivitet: 15 Ci/mmol) er som beskrevet i Cohen, et al., J.Virol., 27, s. 172-181 (1978), Eisenberg, et al., J.Virol., 31, s. 608-620 (1979), Eisenberg, et al., J.Virol., 41, s. 478-488 (1982) og Eisenberg, et al., J.Virol., 35, s. 428-435 (1980).

B. Monoklonale antistoffer

Monoklonale antistoffer ("MCAb'er") anvendt til sammenligning i de følgende eksempler er som følger: MCAb HD-1 (gruppe I) og MCAb 170 (gruppe VII) er som beskrevet i Periera, et al. Infect. Immun., 35, s. 363-367 (1982) og Eisenberg, et al., J.Virol., 41, s.

478-488 (1982). MCAb'erne 55S, 57S (gruppe V), 11S (gruppe III), 41S (gruppe IV) og 45S (gruppe VI) er som beskrevet i Showalter, et al., Infect. Immun., 34, s. 684-692 (1981).

C. Syntetiske peptider

Syntetiske peptider anvendt til screening af antistofreaktiviteter overfor peptider baseret på rester indenfor positionerne 1-23 i gD-1 og gD-2 fremstilles som beskrevet i Cohen, et al., J.Virol., 49, s. 102-108 (1984). Syntetiske peptider 340-356[1] med cystein adderet til aminoterminalen og 268-287[1] med cystein adderet til carboxyterminalen er fremstillet af Peninsula Labs., Inc. Syntetiske peptider 266-279[1] og 266-279[2] kan fremstilles ifølge sådanne kendte fastfasemetoder som beskrevet af Merrifield, J.Am.Chem.Soc., 85, s. 2149-2154 (1963). Fremgangsmåder til kobling af peptider til "keyhole limpet hemocyanin" (KLH) er generelt som beskrevet i Liu, et al. Biochemistry, 18, s. 690-697 (1979). Til brug ved "immunoblot" analyser opløses peptiderne i 0,1 M Tris, pH 7,8, 0,15 M HCl.

D. Fremstilling af nativt og denatureret gD

Med mindre andet er anført, renses gD-1 og gD-2 fra cytoplasmaekstrakter af inficerede celler ved affinitetschromatografi under anvendelse af MCAb HD-1 som beskrevet i Eisenberg, et al., 41, s. 478-488 (1982). Proteiner elueret fra immunabsorptionssøjlen med KSCN og dialyseret mod 0,01 M Tris, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,1% Nonidet-P40 (NP-40) (TSN puffer) betegnes som værende i "nativ" konformation. Til fremstilling af denaturerede materialer suspenderes renset gD-1 eller gD-2 i opløsende puffer, således at der fås en slutkoncentration på 3% SDS, 100 mM Tris, pH 7,0, 10% 2-mercaptoethanol og 0,5% glycerol. Prøven koges i 5 minutter. Iodacetamid (0,1 M i 0,1 M Tris, pH 8,0) tilsættes, således at der fås en slutkoncentration på 33 mM iodacetamid, og blandingen inkuberes i 1

time ved stuetemperatur. Prøverne dialyseres ekstensivt mod TSN puffer.

E. Rekombinant gD materialer

1. Et første afstumpet glycoprotein ("1-275[1]") indeholdende resterne 1-275 forudsagt for fuldt udviklet gD-1 fremstilles som beskrevet i Lasky, et al., Biotechnology, 2, s. 527-532 (1984) som et sekretionsprodukt af transformerede ovariumceller fra Chinese Hamster og renses ved affinitetschromatografi ifølge Eisenberg, et al., J.Virol., 41, 1099-1104 (1982).

2. Et andet afstumpet glycoprotein ("1-287[1]") omfattende fusionsproduktet af resterne 1-287 forudsagt for gD-1 og 48 carboxyterminale rester af HSV thymidinkinase (TK) fremstilles ifølge fremgangsmåderne beskrevet af Gibson, et al. J.Cell.Biochem., Supp. 8B (1984) Abstracts, 13. årlige U.C.L.A. Symposium, nr. 1337, s. 191 [jfr. også Gibson, et al., J.Virol., 48, s. 396-404 (1983)] som et sekretionsprodukt af viralt inficerede Hep-2 celler. Kort beskrevet omfatter virusvektoren en afstumpet form af gD-1 genet (strækkende sig fra SacI stedet i modsat retning af genet til NarI stedet ved rest nr. 287, som er indføjet i BglII stedet i TK genet. Proteinet affinitetsrenses under anvendelse af MCAb II-436-1 som beskrevet i Noble, et al., J.Virol., 129, 218-224 (1983).

3. Et tredie afstumpet polypeptid ("8-300[1]") omfattende resterne 8 til (ca.) 300 produceres i E.coli ifølge de generelle metoder anført i Watson, et al., Science, 218, s. 381-384 (1982).

4. Et fusionspolypeptid ("-5-369[1]") omfattende resterne, der strækker sig fra position -5 til 369 i gD-1 med 11 aminoterminale rester af β-galactosidase fås ved transformation af E.coli værtsceller med en M13 mp8 virusvektor, hvori der er indføjet et NcoI til NruII gD-1 genfragment ifølge Watson, et al., Science, supra, på et sted inden i β-galactosidasegenet, der er til stede i vektoren.

F. Immunopræcipitation og SDS-PAGE

Glycoprotein D immunopræcipiteres fra HSV-1 eller HSV-2 inficerede celleekstrakter (celler inficeret i 6 timer) under anvendelse af antisera eller MCAb og Staphylococcus aereus protein A (IgG "Sorb", New England Enzyme Center). SDS-PAGE udføres i plader af 10% acrylamid tværbundet med 0,4 % N,N'-diallyltartardiamid (DATD), som beskrevet i Eisenberg, et al., J.Virol., 31, s. 608-620 (1979) og Watson, Gene, 26, s. 307-312 (1983). Til autoradiografi tørres geler på filtrerpapir og anbringes i kontakt med Kodak XAR-5 film. Til fluorografi behandles gelerne med "Amplify" (Amersham), tørres på filtrerpapir og eksponeres på Kodak XAR-5 film ved -70°C.

G. "Immunoblot" og neutraliseringsanalyser

"Immunoblot" analyserne gennemføres som beskrevet i Cohen, et al., J.Virol., 49, s. 102-108 (1984) og Hebrink, et al., J.Immunol.Methods, 48, s. 672-682 (1983). Virusneutraliseringsanalyserne (50% plaque reduktionsmetode) under anvendelse af HSV-1 (HF) eller HSV-2 (Savage) gennemføres som beskrevet i Cohen, et al., J.Virol., 47, s. 172-11 (1978) og Cohen, et al. J.Virol. 10, s. 1021-2040 (1972).

Eksempel 2

Mus-mus-hybridomcellelinier fås ved anvendelse af den følgende fremgangsmåde. BALB/c mus hyperimmuniseres med affinitetsrenset gD-1 ifølge eksempel 1 med en initiel dosis på 6 µg gD-1 indgivet intraperitonealt (jvf. Long, et al., Infect. Immun., 37, s. 761-764 (1984)). Tre dage efter en intravenøs boosterinjektion indeholdende 1 µg immunogen, fjernes miltene, og cellerne smeltes sammen til BALB/c SP2/O celler under anvendelse af et PEG-fusogen ved fremgangsmåden ifølge McKearn, s. 368-36 i Kennett, et al., "Monoclonal Antibodies Hybridomas: A New Dimension In Biological Analysis", Plenum Press, New

York, N.Y. (1980). Supernatanter fra fordybninger indeholdende levedygtige cellekolonier efter HAT behandling screenes for tilstedeværelsen af gD-specifikke antistoffer ved "immunoblot" procedurer. Celler, der er positive for gD-1 og gD-2, subklones, og en repræsentativ cellelinie, der producerer monoklonalt antistof "DL-6", er deponeret hos A.T.C.C. som nr. HB8606. Monoklonale antistoffer kan isoleres fra dyrkningsvæsker af disse fire cellelinier ved AMICON filtreringskoncentrering efterfulgt af præcipitation med ammoniumsulfat. Alternativt kan de koncentrerede dyrkningsvæsker absorberes til protein A "Sepharose" søjler (Pharmacia Corp.). Som et andet alternativ kan monoklonale antistoffer fremstilles i forstærket form ved ascites-metoden som beskrevet generelt på side 403 i Kennett, et al., supra. Kort beskrevet injiceres ca. 3 x 10^6 til 3 x 10^7 hybridomceller i peritonealhuler i BALB/c mus forbehandlet med 0,25 ml "Pristane". Antistoffer kan isoleres fra ascites-væsker ved ammoniumsulfatpræcipitation og DEAE "Sephadex" som beskrevet i Eisenberg, et al. J.Virol., 41, s. 1099-1104 (1982). Til fremstilling af immunabsorptionssøjler kan isolerede IgG type 2 antistoffer bindes til cyanogenbromid-aktiverede "Sepharose" 4B søjler, typisk i mængder fra 5 til 12 mg IgG pr. g "Sepharose". Rensede antistoffer kan ioderes med ^{125}I ved chloramin T-metoden ifølge Greenwood, et al., Biochem. J., 89, s. 114-123 (1963) eller fortrinsvis ved lactoperoxidasemetoden ifølge Liu, et al., supra.

Eksempel 3

Det monoklonale antistof DL-6 screenes præliminært ved "immunoblot" analyser mod renset gD, og det viser sig derpå, at det er immunoreaktivt med nativt og denatureret gD-1 og gD-2 men ikke med rekombinantglycoproteinet 1-275-[1], hvilket viser, at den genkendte typefælles epitop ikke er den sekventielle epitop (gruppe V), som det er forudsagt eksisterer mellem resterne 340-356 i gD-1 og gD-2.

På grund af manglende binding til syntetiske peptider, der gengiver resterne 1-23 i gD-1 og gD-2, udelukkes antistofgenkendelse af den (gruppe VII) sekventielle epitop i dette område. DL-6 monoklonale antistoffer produceret i A.T.C.C. nr. HB8606 dyrkningsvæsker og som forstærket ved ascites-metoden anvendes ved mere ekstensive screeningsprocedurer som anført i det følgende eksempel.

Eksempel 4

Antistof DL-6 afprøves ved en fluorescens antistofanalyse på inficerede celler og afslører typefælles membran immunofluorescens, hvilket viser, at epitopen genkendt i gD-1 og gD-2 er til rådighed for binding på glycoproteinerne, når de er indføjet i cellemembranen.

Neutraliseringsanalyser (in vitro) afslører, at DL-6 antistoffet neutraliserer HSV-1 i en fortynding på 1:50 og HSV-2 i en fortynding på 1:20 under anvendelse af et 50% omslag som beskrevet i Eisenberg, et al., J.Virol., 41, s. 1099-1104 (1982).

Der anvendes "immunoblot" analyser til screening af bindingen til en række forskellige syntetiske peptider anført i den følgende tabel II. I tabellen er sekvensen af aminosyrer i de undersøgte peptider repræsenteret ved de første to tal, og tallet i parentes viser sekvensens typespecificitet. H i parentes viser, at sekvensen er et hybrid af de forudsagte type 1 og type 2 sekvenser.

Tabel II

Peptid	Aminosyresekvens
	1 23
(a) 1-23[1]	K Y A L A D A S L K M A D P N R F R G K D L P
(b) 1-23[2]	K Y A L A D P S L K M A D P N R F R G K N L P
(c) 1-23[H]	K Y A L A D P S L K M A D P N R F R G K D L P
(d) 1-16[1]	K Y A L A D A S L K M A D P N R
(e) 1-16[2]	K Y A L A D P S L K M A D P N R
(f) 3-23[H]	A L A D P S L K M A D P N R F R G K D L P
(g) 8-23[1]	S L K M A D P N R F R G K D L P
(h) 8-23[2]	S L K M A D P N R F R G K N L P
(i) 12-23[1]	M A D P N R F R G K D L P
(j) 13-23[2]	A D P N R F R G K N L P
(k) 17-23[1]	R F R G K D L P
(l) 17-23[2]	R F R G K N L P
	266 279
(m) 266-279[1]	P E L A P E D P E D S A L L
(n) 266-279[2]	P E L V P E D P E D S A L L
	268 287
(o) 268-287[1]	L A P E D P E D S A L L E D P V G T V A
	340 356
(p) 340-356[1]	H R R T R K A P K R I R L P H I R

"Immunoblot" analyseresultaterne under anvendelse af peptiderne ifølge tabel II afslører ingen immunoreaktivitet for DL-6 med peptiderne (a) til (l) eller (p) men signifikant reaktivitet med peptiderne (m), (n) og (o), som repræsenterer resterne 266-279 i gD-1 og gD-2 samt 268-287 i gD-1.

Da DL-6 "immunoblot" anlyserne afslører signifikant reaktivitet med gD-1 og gD-2 til stede i største parten af bundfaldene fra HSV-1 og HSV-2 inficerede celler, der er dyrket i nærværelse af tunica mycin, udelukkes det, at carbonhydrater er involveret i epitopen genkendt af DL-6.

DL-6's immunoreaktivitet med forskellige glycoprotein D-lignende fragmenter og analoge materialer produceret ved rekombinantmetoder bestemmes ved "immunoblot". Som omtalt tidligere er DL-6 praktisk taget ikke reaktiv med rekombinant glycoproteinet 1-275[1] produceret ifølge fremgangsmåden beskrevet af Lasky et al., supra. DL-6 er imidlertid immunoreaktivt med ethvert afprøvet rekombinantprodukt, som omfatter en sekvens af aminosyrerester, der strækker sig fra de forudsagte rester 266-287 i gD-1, dvs. rekombinanten 1-287[1], rekombinanten 8-300[1] og rekombinanten -5-396[1] beskrevet i eksempel 1.

På grundlag af den ved den ovenfor anførte afprøvning frembragte immunoreaktivitets-"profil", kan der foreslås følgende konklusioner vedrørende epitopen genkendt af antistofferne ifølge opfindelsen som repræsenteret ved antistof DL-6. Antistoffet genkendte både gD-1 og gD-2 i nativ, denatureret og ikke-glycosyleret form, hvilket viser, at epitopen omfatter en typefælles eller i alt væsentligt typefælles kontinuert sekvens af aminosyrerester. Antistoffet genkendte alle rekombinant gD-1 kopier og analoge forbindelser inklusive de forudsagte kontinuerte sekvenser af resterne 266-287 i gD-1. Manglende genkendelse af rekombinantglycoproteinet 1-275[1] viser, at i det mindste nogle af resterne ud over den forudsagte rest nr. 275 er

signifikante for genkendelse af epitopen (og, ved korrelation med reaktivitet med peptidet 266-279[1], kan muligvis fire eller flere yderligere rester være involveret). På den anden side viser den gD-1 og gD-2 typefælles genkendelsesevne hos antistoffet ved korrelation med den typespecifikke natur af de reaktive peptider 266-279[1], 266-279[2] og 268-287[1], at den genkendte epitop omfatter eller er inkluderet i den typefælles sekvens, som er fælles for de syntetiske peptider, dvs. sekvensen, der indeholder de forudsagte rester 270-279 PEDPEDSALL.

De ovenfor anførte eksempler tjener til at illustrere den tydelige værdi, som de højspecifikke monoklonale antistoffer ifølge opfindelsen har ved påvisning og kvantificering af gD-1, gD-2 og strukturelt beslægtede forbindelser inklusive peptider og proteinholdige materialer, som indeholder en kontinuert sekvens af aminosyrerester, der kan gengive helt eller delvis de rester, der er forudsagt at eksistere som resterne 266-287 i gD-1 og gD-2.

Det følgende illustrerende eksempel angår undersøgelser af antistoffer ifølge opfindelsen i sammenhæng med en generel konstatering af deres affinitetsgrad for gD-1, gD-2 og strukturelt beslægtede forbindelser over for tidligere udviklede antistoffer.

Eksempel 5

Ascites afledt antistof DL-6 absorberes på en cyanogenbromid-aktiveret "Sepharose" 4B søjle som beskrevet tidligere og anvendes til isolering ved affinitetsrensning af gD-1 fra inficerede celler. Under anvendelse af de samme betingelser er DL-6 antistofsøjlen i stand til at binde fra 2 til 3 gange mere af det ønskede glycoprotein end søjler, hvor MCAb HD-1 (gruppe I) anvendes. Yderligere afslører præliminære vaccinationsundersøgelser på mus, hvor der anvendes DL-6 affinitetsrensede materialer som det aktive immunogen, at materialet er mindst lige så aktivt som HD-1 affinitetsrenset materiale til udløsning af et immunrespons,

der virker beskyttende mod en lethal viruseksposition.

Der gennemføres en "konkurrence" analyse, hvor monoklonale antistoffer DL-6, HD-1, 11S, 45S og 170 (100-200 µl, repræsenterende 150-600 µg IgG) bindes til en "Sepharose" 4B søjle, hvorpå søjlen anvendes til absorption af cytoplasmaekstrakter af HSV-1 inficerede celler (100 µl ekstrakt inkuberet ved 37°C i 2 timer). Immunoabsorptionsmidlerne vaskes 10 gange med puffer, og der tilsættes et ioderet andet antistof (ca. 250.000 cpm). Efter ekstensiv vaskning tælles søjlerne med en gamma--tæller. Teoretisk, fordi der er anvendt et overskud af antistof på søjlen, skulle der ikke hænge noget mærket antistof af den samme type ved søjlen. Blandt alle antistofferne afprøvet mod deres mærkede modparter udviser DL-6 den højeste evne til at binde gD-1 med udelukkelse af dets mærkede modpart.

De ovenfor viste eksempler angår monoklonale antistofproducerende hybridomcellelinier formet ved hjælp af gængse fusioner, der er lettet med kemiske midler, af milt- og tumorceller fra mus. Det er klart, at der alternativt kan anvendes en række forskellige hybridomcelleproduktionsteknikker på celler af forskellige pattedyrsarter til tilvejebringelse af hybridomcellelinier ifølge opfindelsen, som er i stand til at producere antistoffer, der er specifikt immunologisk reaktive med gD-1, gD-2 og strukturelt beslægtede forbindelser inklusive aminosyresekvensen RNHPEDPEDSALLCOR', hvor R og R' er ens eller forskellige aminosyrerester, eller R betyder hydrogen, eller R' betyder hydroxyl. Specifikt omfattet af opfindelsen er derfor hybridomcellelinier dannet ved genetisk fusion af cellematerialer fra mennesker, rotter eller andre pattedyrsarter (eller inbyrdes blandinger deraf), uanset om fusionen er gennemført ved hjælp af kemiske eller elektriske midler og omfatter hele celler eller genetisk signifikante fragmenter deraf. Selv om immunogenet anvendt til udviklingen af hybridomer i de foregående eksempler er affinitetsrenset gD-1 hidrørende fra naturlige kilder, kan tilsvarende

en række forskellige immunogener tjene som egnede erstatninger herfor. Typiske substituter er gD-2 såvel som gD-1 og gD-2 polypeptidkopier i nativ og denatureret form produceret ved rekombinantmetoder i egnede mikrobielle værter, såsom bakterier, gær og pattedyrsceller i kultur og fremstillet i glycosyleret eller ikke-glycosyleret form med eller uden yderligere amino- eller carboxyterminale aminosyrerester. Andre foretrukne substituter er f.eks. syntetiske peptider, der gengiver alle eller en væsentlig, immunologisk signifikant del af sekvensen i aminosyreresterne, der er til stede i positionerne 266-287 i gD-1 eller gD-2, såsom den kontinuerte sekvens RNHPEDPEDSALLCOR', hvor R og R' er ens eller forskellige aminosyrerester, eller R betyder hydrogen, eller R' betyder hydroxyl.

Adskillige modifikationer og variationer af den ovenfor beskrevne opfindelse som beskrevet i de ovenfor viste eksempler forventes at kunne udføres af en fagmand, og opfindelsen er følgelig kun underkastet de begrænsninger, som fremgår af de vedføjede krav.

P a t e n t k r a v .

1. Monoklonalt antistof, k e n d e t e g n e t ved, at det specifikt kan binde med glycoprotein D fra herpes simplex virus af både type 1 og 2 og med et proteinholdigt materiale, som indeholder en aminosyresekvens, der gengiver en del af eller hele følgende sekvens:

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

2. Monoklonalt antistof ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det specifikt kan binde med et proteinholdigt materiale, som indeholder den følgende aminosyresekvens:

PELA(eller V)PEDPEDSALL.

3. Monoklonalt antistof ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det specifikt kan binde med et proteinholdigt materiale, der indeholder den følgende aminosyresekvens:

LA(eller V)PEDPEDSALLEDPV(eller A)GTVA(eller S).

4. Monoklonalt antistof ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det specifikt kan binde med et proteinholdigt materiale, som indeholder den følgende aminosyresekvens:

PEDPEDSALL.

5. Hybridomcellelinie, k e n d e t e g n e t ved, at den kan producere et monoklonalt antistof ifølge krav 1.

6. Hybridomcellelinie ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at den indeholder et genetisk materiale fra mus eller mennesker.

7. Hybridomcellelinie ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at den er A.T.C.C. br. HB8606.

8. Monoklonalt antistof ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det er produceret af hybridomcellelinien A.T.C.C. nr. HB8606.

9. Immunologisk fremgangsmåde til isolering af glycoprotein D fra herpes simplex virus type 1 eller type 2 eller immunologisk aktive fragmenter eller analoge deraf på basis af en selektiv immunologisk reaktion med et antistof, der er specifikt herfor, k e n d e t e g n e t ved, at man anvender et monoklonalt antistof ifølge krav 1 eller 8.

10. Immunologisk fremgangsmåde til kvantitativ påvisning af glycoprotein D fra herpes simplex virus type 1 eller type 2 eller immunologisk aktive fragmenter eller analoge deraf på basis af en selektiv immunologisk reaktion med et antistof, der er specifikt derfor, k e n d e t e g n e t ved, at man anvender et monoklonalt antistof ifølge krav 1 eller 8.

11. Immunoabsorptionsmiddel til brug ved affinitetsrensning af glycoprotein D fra herpes simplex virus type 1 eller 2 eller andre proteinholdige materialer indeholdende en del af eller følgende sekvens af aminosyrer
PELA(eller V)PEDPEDSALLEDPV(eller A)GTVA(eller S),
k e n d e t e g n e t ved, at immunoabsorptionsmidlet udgøres af en fast understøtning og forbundet dermed et monoklonalt antistof ifølge krav 1 eller 8.