



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

-
- (21) Patentansøgning nr.: 0078/91 (51) Int.Cl.⁵ C 07 K 15/06
(22) Indleveringsdag: 16 jan 1991
(24) Løbedag: 05 nov 1984
(41) Alm. tilgængelig: 16 jan 1991
(44) Fremlagt: 18 nov 1991
(86) International ansøgning nr.: PCT/EP84/00334
(86) International indleveringsdag: 05 nov 1984
(62) Stamansøgning nr.: 3102/85
(30) Prioritet: 07 nov 1983 US 549505 07 nov 1983 US 549506
(71) Ansøger: The *Wistar Institute; Thirty-Sixth Street; Spruce; Philadelphia PA. 19104, US
(72) Opfinder: Elaine *DeFreitas; US, Dorothee *Herlyn; US, Hilary *Koprowski; US, Kevin *Reagan; US, Tadeusz *Wiktor; US

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau A/S

(54) **Anti-virus, anti-idiotype-antistof til induktion af immunologisk respons**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

78-91

Anti-virus, anti-idiotype-antistof til induktion af et immunologisk respons mod en virus, hvilket antistof identificerer en epitop, som er parotopen af et anti-virus-antistof, og et præparat, som omfatter anti-idiotype-antistoffet.

Den foreliggende opfindelse angår et anti-idiotype-antistof, der kan anvendes til induktion af et immunologisk respons mod antigener, især vira, samt et præparat, der indeholder et sådant antistof.

Sekvensen af aminosyrer i de variable regioner af både tunge (V_H) og
5 lette (V_L) kæder af immunoglobulin (Ig) danner en konformation i an-
tigen-bindingsstedet (dvs. parotopen), hvilket tillader vekselvirk-
ning mellem dette antistof og et specifikt antigen. Injektion af Ig i
et heterologt værtsdyr vil give anledning til anti-xenotypiske (spe-
cifik for arter), anti-isotypiske (specifik for Ig-klassen) og anti-
10 idiotypiske (specifik for det variable antistofområde) antistoffer.
Der kan forekomme to funktionelle klasser af anti-idiotypiske anti-
stoffer, hvoraf den ene reagerer med parotopen, og den anden reagerer
med V_H - og/eller V_L -strukturen (strukturdeterminanter). Jfr. generelt
Geha, *N. Engl. J. Med.* 305, 1981, s. 25-28; Jerne, *Ann. Immunol.*
15 (*Paris*) 125C, 1974, s. 373-389.

I ét aspekt angår den foreliggende opfindelse et anti-idiotype-anti-
stof, som identificerer en epitop, der er parotopen af et anti-virus-
antistof.

Ved administration af dette anti-idiotype-antistof stimuleres pro-
20 duktionen af anti-(anti-idiotype)-antistof hos en patient, hvilket
antistof identificerer en epitop på en viruspartikel.

Ifølge den foreliggende opfindelse kan anti-idiotype-antistoffet være
polyklonalt, idet en epitop, som identificeres af dette anti-idioty-
pe-antistof, er parotopen af et anti-virus-antistof, hvilket anti-
25 idiotype-antistof i det væsentlige er fri for anti-isotypiske anti-
stoffer.

Ifølge den foreliggende opfindelse kan anti-idiotype-antistoffet også
være monoklonalt. Det monoklonale anti-idiotype-antistof kan fx fås
fra en udødelig B-lymfocyt, som producerer et anti-idiotype-antistof,
30 idet en epitop, som identificeres af dette anti-idiotype-antistof, er
parotopen af et anti-virus-antistof. Det monoklonale antistof er i
det væsentlige fri for andre antistoffer.

Hensigtsmæssige vira omfatter influenza-, herpes simplex-, hepatitis- og især rabiesvirus. Ved administration af anti-idiotype-antistoffet ifølge den foreliggende opfindelse stimuleres patienten, især et pattedyr, mere specielt et menneske, til at producere anti-(anti-idio-
5 type)-antistof, som identificerer en epitop på en viruspartikel.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en unik indgangsvinkel til viral immunisering. Traditionelt har antiviral terapi medført immunisering med konventionelle vacciner. Det har nu imidlertid vist sig, at der kan induceres et immunologisk respons mod vira ved hjælp af et
10 antistof, som er anti-idiotypisk mod et antistof, som genkender et virusantigen. Induktionen af dette immunologiske respons er nyttigt som en terapeutisk og forebyggende behandling.

Uden at være begrænset til nogen speciel teori med hensyn til udøvelsen antages det, at det iagttagne immunologiske respons, som opnås
15 ved administration af anti-idiotype-antistoffet ifølge den foreliggende opfindelse, skyldes en vekselvirkning mellem anti-idiotype-antistofmolekylerne og den humane patients immunsystem. Det idiotypiske (dvs. variable) område af anti-idiotype-antistofmolekylet indeholder antigen-determinanter (dvs. epitoper), der af patienten be-
20 trages som et antigen. Dette inducerer produktion af anti-(anti-idiotype)-antistoffer af patienten. Inden for dette sæt af anti-(anti-idiotype)-antistoffer findes sådanne, som er direkte komplementære til paratopen af anti-idiotype-antistoffet. Det antages endvidere, at paratopen af anti-idiotype-antistoffet danner et "indre"
25 billede af den ved hjælp af idiotype-antistoffet identificerede (dvs. selektivt bundne) virusepitop, og derfor vil anti-(anti-idiotype)-antistofferne også binde virusantigenet. Det her omhandlede anti-idiotype-antistof inducerer faktisk et immunologisk respons mod viruset ved at tilvejebringe et antigen (paratopen af anti-idiotype-anti-
30 stof), som i det væsentlige ikke kan skelnes fra virusantigenet, mod en del af patientens resulterende antistoffer.

Den ovenfor beskrevne administration af anti-idiotype-antistoffet ifølge opfindelsen udgør overraskende en effektiv metode til induktion af et immunologisk respons mod et virus. Endvidere frembyder den
35 adskillige fordele i forhold til de mere traditionelle fremgangsmå-

der. For det første behøver man kun at administrere en meget mindre mængde fremmed antistof til en patient. For det andet er patientens anti-idiotyp-respons gunstigt og ikke skadeligt for den påtænkte virkning. For det tredje er patientens egne antistoffer anti-virus-antistofferne. Andre fordele er åbenlyse for fagfolk.

Idiotypen af et antistof defineres af individuelt forskellige antigendeterminanter i det variable eller idiotypiske område af antistofmolekylet. En del af disse idiotypiske determinanter vil være på eller tæt forbundet med antistoffets parotop, medens andre vil være i strukturen af det variable område. Selv om hvert antistof har sin egen idiotyp, henvises der til specielle antistoffer nedenfor ved hjælp af følgende udtryk. "Idiotyp-antistof" eller "Id Ab" refererer til et anti-virus-antistof (dvs. den epitop, som identificeres af idiotyp-antistoffet, er på en viruspartikel). "Anti-idiotyp-antistof" eller "anti-Id Ab" refererer til et antistof, som identificerer en epitop i det variable område af et idiotyp-antistof. En del af sådanne antistoffer identificerer en epitop, som er parotopen af idiotyp-antistoffet, hvorved der tilvejebringes et "indre" billede af den epitop, som identificeres af idiotyp-antistoffet. "Anti-(anti-idiotyp)-antistof" eller "anti-(anti-Id) Ab" er et antistof, som identificerer en epitop i det variable område af anti-idiotyp-antistoffet. En del af anti-(anti-idiotyp)-antistofferne identificerer en epitop, som svarer til 1) parotopen af anti-idiotyp-antistoffet, og 2) epitopen.

Den foreliggende opfindelse angår i et andet aspekt et præparat til induktion af et immunologisk respons mod et virus, hvilket præparat omfatter et anti-idiotyp-antistof som defineret ovenfor sammen med en hvilken som helst fysiologisk egnet bærer (fx sterilt, pyrogenfrit fysiologisk saltvand). Formuleringen af præparatet er kendt inden for teknikken. Valget af bærer er ikke kritisk, og antistoffet kan formuleres på en hvilken som helst måde, som medfører, at antistoffet indføres i kredsløbssystemet (fx ved intravenøs, intramuskulær eller subcutan injektion).

Værten kan være et hvilket som helst pattedyr, mest almindeligt et menneske, en kat eller en hund. Den mængde antistof, som administreres til en vært, kan variere i vidt omfang og er fx afhængig af det specifikke antistof, som anvendes, og den inokulerede patient. Det er blot nødvendigt, at der administreres tilstrækkeligt anti-idiotype-antistof til at stimulere produktionen af anti-(anti-idiotype)-antistoffer af patientens immunsystem. Den mængde antistof, der anvendes, behøver imidlertid ikke være særlig stor, fordi kun meget små mængder er nødvendige for at inducere et immunologisk respons. I mange tilfælde er en antistofdosis inden for området fra nogle få mikrogram til nogle få milligram tilstrækkelig (fx fra ca. 50-200 μ g til ca. 1-5 mg). Bestemmelsen af en passende dosis ligger inden for den kendte teknik.

Et præparat indeholdende et anti-idiotype-antistof kan administreres til en vært, idet parotypen af anti-idiotype-antistoffet frembyder et indre billede af et virusantigen. Et sådant antistof genkender en epitop, som er parotopen af det tilsvarende idiotype-antistof. Anti-idiotype-antistoffer, som frembyder indre billeder af virusantigenet, kan skelnes fra anti-idiotype-antistoffer, som genkender strukturdeterminanter i det variable område af idiotype-antistoffet, ved en hvilken som helst af flere forskellige fremgangsmåder. Én fremgangsmåde til identificering af de ønskede anti-idiotype-antistoffer er et kompetitivt bindingsassay mellem virusantigenet (eller haptenen, hvis den er tilgængelig), idiotype-antistoffet og anti-idiotype-antistoffet. Hvis antigenet blokerer bindingen af anti-idiotype-antistoffet til idiotype-antistoffet, er den epitop, som identificeres af anti-idiotype-antistoffet, tæt forbundet med idiotype-antistoffets parotop. En anden test er at bestemme, om antiserer mod anti-idiotype-antistoffet også er anti-virus. Disse og andre fremgangsmåder til identificering af det hensigtsmæssige anti-idiotype-antistof ligger inden for fagområdet. I det præparat, som administreres til en vært, er inkorporering af anti-idiotype-antistoffer, som er rettet mod strukturdeterminanter, sammen med den underklasse, som er rettet mod idiotype-antistoffets parotop, acceptabel. Det er blot nødvendigt, at præparatet indeholder den underklasse, som er rettet mod idiotype-antistoffets parotop.

Det anvendte anti-idiotype-antistof kan være homologt eller heterologt over for værtten. Det foretrukne antistof for et menneske er imidlertid et humant antistof for at minimere det immunologiske respons mellem det konstante område og antistofmolekylet. Eftersom der ved den foreliggende opfindelse kræves relativt små doser af anti-idiotype-antistof, kan der imidlertid anvendes heterologt antistof (fx mus, rotte, ged, kanin, etc.). I fraværelse af nogen alvorlig reaktion mod heterologt anti-idiotype-antistof, kan et sådant antistof imidlertid være foretrukket, da det er lettere og billigere at fremstille. Der kan endvidere anvendes polyklonale anti-idiotype-antistoffer samt monoklonale anti-idiotype-antistoffer.

Polyklonalt anti-idiotype-antistof kan fremstilles ved sædvanlige fremgangsmåder inden for teknikken fx ved administration til en heterolog vært af et anti-virus-antistof, hvorefter det ønskede anti-idiotype-antistof isoleres og oprenses fra serumet fra denne vært. Således kan polyklonalt anti-Id Ab fremstilles ved at immunisere et dyr med et monoklonalt anti-virus-antistof (dvs. Id Ab). Det immuniserede dyr vil producere anti-Id Ab. En underklasse af dette anti-idiotype-antistof i antisera vil identificere en epitop, som er parotopen af anti-virusantistoffet. Antisera, som er udvundet fra dyret, kan oprenses, fx ved sekventiel absorption med 1) et immobiliseret antistof af den samme isotype som det monoklonale Id Ab, men forskellig idiotype, for at fjerne anti-isotypiske antistoffer fra antisera, og 2) det immobiliserede monoklonale Id Ab for at fjerne anti-Id Ab, hvoraf en underklasse vil frembyde indre billeder af virusantigenet. Anti-Id Ab kan derefter elueres fra det bundne monoklonale anti-virusantistof til tilvejebringelse af en opløsning, som i det væsentlige er fri for anti-isotype-antistoffer. Denne opløsning kan derefter testes for tilstedeværelsen af anti-Id Ab, som identificerer parotopen af Id Ab.

Monoklonale anti-idiotype-antistoffer, som i det væsentlige er fri for andre antistoffer, kan isoleres fra supernatanten af i det væsentlige rene kulturer af udødelige B-lymfocytter. Udtrykket "udødelig B-lymfocyt" omfatter en hvilken som helst relativt stabil, kontinuerligt antistofproducerende celle, som kan opretholdes i en kultur i adskillige måneder (fortrinsvis på ubestemt tid), såsom hybridomer

(somatiske cellehybrider af normale og ondartede lymfocytter) og normale lymfocytter, som er transformeret af virus (fx Epstein-Barr-virus) eller onkogent DNA. Produktionen af udødelige B-lymfocytter ud fra normale B-lymfocytter, som producerer anti-idiotyp-antistof, er kendt inden for teknikken, jfr. fx *Monoclonal Antibodies* (R.H. Kennett, T.J. McKearn & K.B. Bechtol 1980); M. Schreier et al., *Hybridoma Techniques* (Cold Spring Harbor Laboratory (1980)); *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (G.J. Hammerling, U. Hammerling & J.F. Kearney 1981); Kozbor et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 1982, s. 6651-6655; Jonak et al., *Hybridoma* 2, 1983, s. 124; *Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines* (R.H. Kennett, K.B. Bechtol & T.J. McKearn 1983); Kozbor et al., *Immunology Today* 4, 1983, s. 72-79.

Normale B-lymfocytter, som producerer anti-Id Ab, og som er egnede til produktion af en udødelig B-lymfocyt, kan tilvejebringes ved forskellige fremgangsmåder, som er kendte inden for teknikken. Fx kan et dyr såsom en rotte eller mus immuniseres med et monoklonalt anti-virus-antistof, og B-lymfocytter, som producerer anti-Id Ab, udvindes fra dyrets milt. Humane B-lymfocytter, der producerer anti-Id Ab, kan fås ved at immunisere en patient med monoklonalt anti-virus-antistof, udvinde perifere blodlymfocytter fra patienten og derefter *in vitro* inducere vækst af B-lymfocytter, som producerer anti-Id Ab, ved at stimulere kulturen med det monoklonale anti-virus-antistof, jfr. fx DeFreites et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 1982, s. 6646-6650. De animalske eller humane B-lymfocytter, som producerer anti-Id Ab, kan således udvindes og gøres udødelige af fagfolk. Det er naturligvis klart, at de lymfocytter, som producerer anti-Id Ab, som frembyder indre billeder af virusantigenet, bør skelnes fra de B-lymfocytter, som producerer anti-Id Ab, som er rettet mod struktur-determinanter i det idiotypiske område.

Det immunrespons, som produceres i værtspattedyret mod en virus, kan om ønsket forstærkes yderligere ved immunisering med en sædvanlig virusvaccine ud over administration af anti-Id Ab som beskrevet ovenfor. Efter at produktionen af anti-(anti-Id)-Ab er blevet stimuleret i værtsdyret ved administration af anti-Id Ab (fx ca. 2 uger efter administration), gives værten derefter én inokulering af en virusvac-

cine under anvendelse af sædvanlige teknikker, som er kendte inden for området (fx dræbte virusvacciner såsom HDC-rabiesvaccine), jfr. Plotkin et al., *Am. J. Epidemiology* 103, 1976, s. 75-80; Wiktor et al., *Rabies Vaccine for Human Use: Volume 40*, 1978, s. 3-9. Vaccine-

5 typerne og protokoller til deres administration er kendte inden for teknikken.

EKSEMPEL

Fremstilling af anti-idiotype-antistof

- 10 Evnen hos anti-idiotype-antistoffet (anti-Id Ab), som er fremstillet mod forskellige monoklonale antistoffer (mAb), til at rekonstruere epitoperne af rabiesvirus-glycoprotein (G) blev undersøgt. Dette G er ansvarligt for mange af de vigtige biologiske egenskaber hos rabies-
- 15 (VNA). Præcis hvilken del af G, som er ansvarlig for denne funktion, er for tiden ikke kendt. En funktionel epitopmätte til provokationsvirusstandard (CVS)-stamme af rabiesvirus G, som antyder eksistensen af i det mindste tre hovedantigensteder for typespecifik VNA, er blevet beskrevet af Lafon et al., *J. Gen. Virol.* 64, 1983, s. 843-851.
- 20 Fem anti-G mAb blev udvalgt fra en stor gruppe hybridomer på basis af deres isotype (hvilket muliggjorde oprensning ved protein A-Sepharose®-chromatografi) og bindingsstedet på rabiesvirus G, defineret af den funktionelle epitopmätte. Anti-rabiesvirus G mAb's 509-6, 101-1, 507-1 og 719-3 er tidligere blevet beskrevet, jfr. Lafon et al.,
- 25 *supra*; Wiktor et al., *J. Exp. Med.* 152, 1980, s. 99-112. Disse mAb, som i stærk grad neutraliserer rabiesvirusinfektiviteten, har følgende karakteristika: 509-6 (epitopkortstedet I; IgG2a), 101-1 (epitopkortstedet IIb; IgG2a), 507-1 (epitopkortstedet IIIb; IgG1) og 719-3 (epitopkortstedet IIc; IgG2a). Anti-G mAb 1104-2 (IgG1) blev udvundet
- 30 fra en yderligere fusion af splenocytter for rabiesvirus-immuniserede BALB/c-mus med 653-varianten af P3x63Ag8-musemyelomaceller, jfr. Kearney et al., *J. Immunol.* 123, 1979, s. 1548-1550, som beskrevet i Wiktor et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1978, s. 3938-3942.

De anti-G-udsondrende hybridomaceller blev udvalgt og klonet ved begrænsende fortynding, og ascitesvæsker blev fremstillet som også beskrevet af Wiktor et al., 1978, *supra*. 1104-2 mAb blev udvalgt, fordi det havde udmærket binding til ERA-virus, men dårlig neutralisering.

5 Anti-rabiesvirus-nucleocapsid mAb 515-3 (IgG2a) og 389-1 (IgG1) blev isoleret ved lignende teknikker ud fra Kelev-virusimmuniserede BALB/c-mus.

De anvendte kulturer af ERA- eller CVS-stammer af rabiesvirus blev opdyrket i BHK-21-celler ved standardmetoder, jfr. Wiktor et al., i

10 *Laboratory Techniques in Rabies*, s. 101-123 (M. Kaplan & H. Koprowski, 3. udgave 1973). Rabiesantigenvarianter, ERA RV194-2 og RV509-6, er tidligere blevet beskrevet og udgør vira, som er resistente over for neutralisering med anti-G henholdsvis mAb 194-2 og 509-6, jfr. Dietzschold et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 1983, s. 70-74.

15 Rabiesopløseligt glycoprotein (G_s) blev oprenset fra virion-udtømte kulturvæsker ved immunoabsorbent chromatografi som beskrevet af Dietzschold et al., *Virology* 124, 1983, s. 330-377.

Alle anti-G mAb blev oprenset fra ascitesvæsker. Antistoffer af IgG2a-isotypen blev fortyndet ca. 1:30 med Britton-Robinson-puffer

20 (BRB) ved pH 8,0, jfr. Gerhard et al., i *Monoclonal Antibodies*, s. 317-333 (R. Kennett, T. McKearn & K. Bechtol 1980). mAb i BRB blev ført gennem et Nalgene 0,45 μ filter og derefter over en protein A-Sepharose® 4B-absorptionsøjle (Pharmacia, Piscataway, New Jersey). Søjlen blev vasket med 30 ml BRB, pH 8,0, før antistoffet blev elu-

25 eret med BRB ved pH 3,0. Anti-G mAb af IgG1-isotypen blev først udfældet med natriumsulfat ved en slutkoncentration på 18% (w/v). Ig-Fraktion blev opløst og dialyseret i BRB, pH 8,0, og derefter ført over protein A-Sepharose®-søjlen som før. Ig elueret fra søjlen blev detekteret ved radioimmunoassay (RIA) under anvendelse af ERA-virus

30 som antigen, jfr. Dietzschold et al., *J. Virol.* 44, 1982, s. 595-602. Antistoffer blev koncentreret ved vakuumdialyse mod fosfatpuffret saltopløsning, pH 7,4 (PBS). Proteinkoncentrationen blev bestemt under anvendelse af bovint serumalbumin som standard, jfr. Bramhall et al., *Anal Biochem.* 31, 1969, s. 146-148.

Anti-Id Ab blev fremstillet som beskrevet af Staudt et al., *J. Exp. Med.* 157, 1983, s. 687-704. Kort fortalt blev hvide New Zealand-hundkaniner injiceret subcutant på flere steder langs mælkekirtelrækken med 300 μg protein A-Sepharose®-oprenset mAb, som var emulgeret i
5 Freunds komplette adjuvans (FCA). To intramuskulære boosterinjektioner på 100 μg antistof i PBS blev givet på dag 7 og 30, og sera blev udvundet 10 dage senere. Hvert anti-idiotypiske antiserum blev fremstillet specifikt for idiotypeområder ved passage over en Sepharose®
10 4B-søjle, hvortil der enten var koblet mAb 515-3 (IgG2a) eller 389-1 (IgG1) for at fjerne anti-isotype-Ab. Udløbet fra sådanne søjler indeholdt de antistoffer, som var reaktive med de idiotypiske determinanter. Antistoffer mod konstante områder blev elueret fra mAb 515-3 og 389-1 immunoabsorbente søjler med 0,1M diethylamin, pH 11,5. IgG
15 fra hvert anti-Id Ab blev isoleret ved protein A-Sepharose®-chromatografi som før. Reaktiviteten af søjleeffluenten med ikke-idiotypiske determinanter var ubetydelig.

Karakterisering af anti-idiotyp-antistoffer

20 Specificiteten af det ovenfor fremstillede anti-Id Ab og eksistensen af krydsreaktive idiotyper blandt de forskellige anti-G mAb blev bestemt for hvert anti-Id Ab-præparat ved et RIA.

Et fastfase-RIA blev anvendt for at måle bindingerne af anti-Id Ab til fikseret mAb. Individuelle mAb blev fortyndet afhængig af ascitesvæskekonzentrationen i carbonat-hydrogencarbonatpuffer, pH 8,9, som
25 følger: 509-6 (1:3.000), 101-1 (1:6.000), 719-3 (1:6.000), 507-1 (1:6.000), 1104-2 (1:16.000). Derefter blev 25 μl af hver sat til brønde af polyvinyl-mikrotiterplader (Dynatech Laboratories). Disse antistoffer fik lov at tørre til fordybningerne ved inkubation natten over ved 37°C. Frie bindingssteder på brøndene blev blokeret i i det
30 mindste 1 time med 10% aq-hesteserum (GIBCO Laboratories) i PBS med 0,08% natriumazid (PBSN). 25 μl fortynding af anti-Id Ab blev tilsat, og efter 1 time ved stuetemperatur blev pladerne grundigt vasket. Bundet anti-Id Ab blev detekteret ved at sætte 25 μl (30.000 cpm)
35 ^{125}I gede-anti-kanin-IgG (Cappel Laboratories) mærket ved iodogenmetoden og inkubation i yderligere 1 time ved stuetemperatur, jfr.

Markwell et al., *Biochemistry* 17, 1978, s. 4807-4817. Alle fortyndinger af anti-Id Ab eller radiomærket probe blev fremstillet i 10% aq-hesteserum i PBSN. Pladerne blev vasket fri for ubundet probe, og den radioaktivitet, der var bundet til de enkelte fordybninger, blev
5 målt i en gamma-tæller.

Resultaterne fra en titrering af hvert anti-Id Ab-præparat mod homologt og heterologt mAb viste, at hvert anti-Id Ab var specifik over for sit homologe Id mAb.

Bestemmelse af anti-idiotype-antistoffer rettet mod parotopen af
10 idiotype-antistoffet

Et kompetitivt RIA blev udformet for at teste evnen hos rabiesvirus G til at forhindre vekselvirkning mellem Id Ab og anti-Id Ab, jfr. Chaflin et al., *J. Immunol.* 112, 1974, s. 1747-1756; Sher et al., *J.*
15 *Immunol.* 109, 1972, s. 176-178.

Rabies G_S blev anvendt som det konkurrerende antigen. Pratitrerede mængder af mAb blev inkuberet med to gange seriefortyndinger G_S i 1 time før tilsætning af en standardiseret anti-Id Ab-fortynding. Mængden af bundne antisera blev bestemt ved bindingen af en ¹²⁵I-mærket gede-anti-kanin-antistofprobe. Bindingen af tre af de fem anti-Id
20 Ab til deres tilsvarende anti-G mAb (509-6, 507-1 og 1104-2) blev inhiberet af G_S. Den maksimale inhibering varierede fra 20-50% med op til 6 µg/ml G_S, men der blev observeret i det mindste en 15%'s reduktion med så lidt som 0,75 µg/ml G_S. Den manglende evne til fuldstændigt at inhibere bindingen af anti-Id Ab var en indikation af, at både struktur- og parotopstedspecificiteterne var til stede i de tre
25 polyklonale anti-Id-sera. Dette blev bekræftet ved en Western-farvningsanalyse af anti-Id Ab-reaktivitet med mAb, som var blevet opspaltet ved natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgelelektroforese (SDS-
30 PAGE) under reducerende og ikke-reducerende betingelser. Eftersom antigen-kombinationsstedet elimineres ved reduktion af mAb, viste reaktiviteten af anti-Id Ab med reduceret mAb specificitet for struktur-determinanter. Fraværet af nogen signifikant bindingsinhibering af G_S

for anti-Id 101-1 Ab eller anti-Id 719-3 Ab antyder en mindre eller fraværende population af paratop-specificiteter i disse sera.

Fremstilling af anti-(anti-idiotyp)-antistof

- 5 Følgende eksempler viser, at anti-Id Ab, som er reaktivt med det antigen-kombinerende sted af anti-G mAb, indeholder en underpopulation, som efterligner den virale epitop, som genkendes af disse anti-G mAb, og kan inducere et immunologisk respons mod G.

ICR-Mus i grupper på 4 blev inokuleret subcutant med 40 µg/mus af
10 protein A-Sepharose®-renset anti-Id IgG emulgeret i FCA. Subcutane boosterinokuleringer blev administreret på dag 7 og 32, hver med 40 µg anti-Id IgG i Freund's ukomplette adjuvans. Fem dage efter den sidste boosterinokulering blev der taget blod fra dyrene via det retroorbitale plexus, og puljeopsamlede sera blev undersøgt for rabies-
15 virusneutraliserende antistof (VNA). Som kontrol fik en anden gruppe mus en immunisering af protein A-Sepharose®-oprenset normalt kanin-IgG.

Niveauerne af VNA i immuniserede mus blev bestemt ved en modifikation af den hurtige fluorescens-fokusinghiberingstest, jfr. Smith et al., i
20 *Laboratory Techniques in Rabies*, s. 354-357 (M. Kaplan & H. Koprowski, 3. udgave 1973). To ganges seriefortyndinger af museserum blev fremstillet i mikrotiter-II-plader (Falcon Plastics) (50 µl/fordybning) og inkuberet i 1 time ved 37°C med et lige så stort volumen virus indeholdende 10^4 PFU/50 µl. Efter inkubation blev 50 µl friskt
25 trypsiniserede BHK-21-celler (2×10^6 celler/ml) sat til hver fordybning og blandet, og 10 µl's alikvoter af serum-virus-celleblandingen blev overført (i to eksemplarer) til fordybninger i Terasaki-plader (Falcon Plastics). Efter 20 timers inkubation blev pladerne først skyllet med PBS og derefter med 80% (v/v) acetone i destilleret vand
30 og fikseret i 30 minutter i 80% acetone ved stuetemperatur. Pladerne blev tørret, og cellerne blev farvet i 30 minutter ved 37°C med 5 µl/fordybning fluorescein-konjugeret anti-rabiesnucleocapsid-antistof af kaninoprindelse, jfr. Wiktor, *Symp. Series Immunobiol. Standard 21*, 1974, s. 102-118. Kontrolfordybningerne (der indeholdt vi-

rus, men intet antistof) udviste ca. 40% af celler indeholdende rabiesvirus-specifikke inklusioner. Slutpunktet af virusneutralisering blev defineret som den reciprokke af den højeste serumfortynding, som var i stand til at reducere antallet af rabiesvirusinficerede celler med 50%.

Resultaterne af den hurtige fluorescens-fokusinghiberingstest er vist i nedenstående tabel. Der blev genereret signifikante VNA-titers mod rabiesvirus af ERA-stammen i mus, som var immuniseret med anti-Id 509-6 Ab og med anti-Id 1104-2 Ab. De tre andre anti-(anti-Id)-Ab kunne ikke neutralisere ERA-virus. Kontrolforsøg viste, at muse-anti-(normal kanin-IgG)-Ab samt det anti-Id Ab, som blev anvendt til immunisering, ikke havde nogen rabiesvirusneutraliserende virkning. Endvidere fjernede præinkubation af anti-(anti-Id 509-6)-sera med anti-Id 509-6 Ab den neutraliserende aktivitet. Præinkubation med normalt kaninserum gjorde det imidlertid ikke.

For at teste specificiteten af det genererede VNA blev andre rabiesvira anvendt i neutraliseringsassayet. CVS-Stammen af rabiesvirus bandt både mAb 509-6 og 1104-2 (data ikke vist), og tabellen viser, at CVS blev neutraliseret af både anti-(anti-Id 509-6)-sera og anti-(anti-Id 1104-2)-sera. På den anden side blev en variant af ERA-virus, RV 509-6, som havde en mutation i 509-6 epitopen, hvilket resulterede i tab af bindings- eller neutraliseringsaktiviteten af mAb 509-6, jfr. Laton et al., *J. Gen. Virol.* 64, 1983, s. 843-851, ikke neutraliseret af anti-(anti-Id 509-6)-sera. En anden neutraliseringsresistent variant, RV 194-2, blev effektivt neutraliseret af anti-(anti-Id 509-6)-sera. Tidligere resultater viste, at de antigensteder, som blev genkendt af anti-G mAb 509-6 og 194-2, er fuldstændig uafhængige, jfr. Laton et al., *supra*. Disse data viser, at anti-(anti-Id 509-6)-sera udelukkende reagerer med den epitop, som genkendes af anti-G mAb 509-6, og denne epitop var således blevet simuleret af anti-Id 509-6 Ab.

Neutralisering af rabiesvirusstammer
af anti-(anti-Id)-serum*

Museantiserum mod:	ERA			CVS	
	Moder	RV 509-8	RV 194-2	Moder	
5	Normalt kanin IgG	4	4	4	4
	Anti-Id 509-6	32	4	64	64
	Anti-Id 101-1	4	ND**	ND	ND
10	Anti-Id 179-3	4	ND	ND	ND
	Anti-Id 507-1	4	ND	ND	ND
	Anti-Id 1104-2	128	4	128	64
	RIG***	16	16	32	32

15 * Den reciprokke af den højeste fortynding af serum, som var i stand til at reducere antallet af inficerede celler med 50%, blev taget som neutraliseringstiteren.

** Ikke udført.

20 *** Humant anti-rabies Ig blev fortyndet til 0,2 internationale enheder pr. ml, og to gange serieforthyndinger blev inkuberet med rabiesvirus.

PATENTKRAV

1. Anti-idiotype-antistof,
k e n d e t e g n e t ved, at det identificerer en epitop, som er
parotopen af et anti-virus-antistof.
- 5 2. Anti-idiotype-antistof ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det er monoklonalt.
3. Anti-idiotype-antistof ifølge krav 2,
k e n d e t e g n e t ved, at det fås fra en udødelig B-lymfocyt,
der producerer et anti-idiotype-antistof, som identificerer en epi-
10 top, som er parotopen af et anti-virus-antistof, og at det i det væ-
sentlige er fri for andre antistoffer.
4. Anti-idiotype-antistof ifølge krav 3,
k e n d e t e g n e t ved, at B-lymfocytten er en hybridoma.
5. Anti-idiotype-antistof ifølge krav 1,
15 k e n d e t e g n e t ved, at det er polyklonalt.
6. Anti-idiotype-antistof ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det fås ved administration til en he-
terolog vært af et anti-virus-antistof, hvorefter det ønskede anti-
idiotype-antistof isoleres og oprenses fra serumet fra denne vært.
- 20 7. Præparat til induktion af et immunologisk respons mod et virus,
k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter et anti-idiotype-antistof
ifølge et hvilket som helst af kravene 1-6.