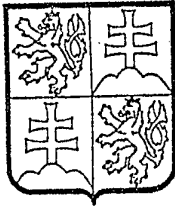


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 275 838

(21) Číslo přihlášky : 6136-87. M
(22) Přihlášeno : 20 08 87
(30) Prioritní data : 20 08 86-US-86/898273
01 05 87-US-87/045026
29 06 87-US-87/067996
(40) Zveřejněno : 14 08 90
(47) Uděleno : 20 12 91
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18 03 92

(13) Druh dokumentu : B6
(51) Int. Cl.⁵ :
A 61 K 39/42

(73) Majitel patentu : GENETIC SYSTEMS CORPORATION, SEATTLE (US)

(72) Původce vynálezu :
SHRIVER KATHLEEN MARY, BELLEVUE,
THOMAS ELAINE K., SEATTLE,
COSAND WESLEY L., BOTHELL,
GOSTING LARRY H., SNOHOMISH,
DICKINSON EDNA S., SEATTLE,
McCLURE JANELA, CITY of VASHON ISLAND,
TODARO GEORGE J., SEATTLE,
NOWINSKI ROBERT G., SEATTLE, (US)

(54) Název vynálezu : Způsob výroby hybridomů pro produkci monoklonální protilátky proti viru HIV

(57) Anotace :

Řešení se týká způsobu výroby hybridomů pro produkci monoklonální protilátky proti viru HIV, tím, že se extrakt rozrušeného viru váže na nosič, například na lektin z čočky a získaný materiál se užívá k imunizaci myší, jejichž B-lymfocyty ze sleziny se pak podrobí fúzi s NS₁myelomatickými bunkami za vzniku hybridomu, živné prostředí, v němž se bunky hybridomu udržují se zkoumá na přítomnosti protilátek a bunky, které produkují monoklonální protilátky, schopné reakce s determinantním antigenem obalového glykoproteinu gp110 viru HIV, obsaženým v blokující peptidu T nebo v jeho derivátu nebo analogu se dále pěstují.

Vynález se týká způsobu výroby monoklonálních protilátek, které je možno použít při diagnóze, léčbě a prevenci virových infekcí. Zejména je možno monoklonální protilátky a peptidy, získané způsobem podle vynálezu užít při diagnóze a vakcinaci proti lidským virovým infekcím, spojeným s deficiencí imunologického systému (HIV).

Infekčním organismem, který je zodpovědný pro získaný syndrom imunodeficiency (AIDS) a počátečních fází tohoto onemocnění, jakož i za komplexní onemocnění, příbuzné AIDS (ARC) a za lymfadenopatický syndrom (LAS) je nový lymfotropní retrovirus. Tento virus byl až dosud různě nazýván, například LAV, HTLV-III, ARV, a v poslední době HIV.

Protože v současné době dosahuje rozšíření HIV pandemických rozměrů, je soustředěna pozornost na možnost léčby infikovaných jednotlivců a na zábranu přenosu na neinfikované jednotlivce. Byla navržena různá opatření, která byla cílena na různá stadia životního cyklu viru a jsou uvedena v publikaci Mytsuya a Broder, 1987, Nature 325, 773. Jedním z možných přístupů je použití protilátek, které se váží na virus a působí inhibicí replikace viru, buď tak, že brání vstupu viru do hostitelských buněk nebo jiným mechanismem. Jakmile je nalezena složka viru, přístupná působení protilátky, je možno doufat, že by bylo možno přivádět množství protilátky, dostatečné k neutralizaci infekční schopnosti viru vakcinací nebo alespoň pasivním podáním imunoglobulinu nebo monoklonální protilátky s požadovanou specifičností.

Obalové glykoproteiny většiny retrovirů patrně reagují s receptorovými molekulami na povrchu buněk možného hostitele, čímž je stanovena infektivita viru pro určitého hostitele. Protilátky, které se na tyto glykoproteiny váží, mohou blokovat vzájemné působení viru a buněčných receptorů a tak neutralizovat infektivitu viru, jak bylo obecně popsáno v publikacích The Molecular Biology of Tumor Viruses, 534, (vydavatel J. Tooze, 1973) a RNA Tumor Viruses, 226, (vydavatel R. Weiss a další, 1982) a v citacích, uvedených v těchto publikacích, jakož i v Gonzales-Sacranó a další, 1982, Virology 120, 42 (La Crosse Virus); Matsuno a Inouye, 1983, Infect. Immun. 39, 155 (Neonatal Claf Diarrhea Virus); a Mathews a další, 1982, J. Immunol., 129, 2763 (Encephalomyelitis Virus).

V obecné struktuře HIV je ribonukleoproteinové jádro obklopeno obalem s obsahem lipidů, který si virus uchovává i v průběhu průniku do hostitelské buňky. V obalu jsou zavazaty kódové virové glykoproteiny. Obalové glykoproteiny HIV jsou obvykle syntetizovány až v infikované buňce jako prekursorová molekula o hmotnosti 150 000 až 160 000 jednotek, která je pak zpracovávána v buňce na N-terminální fragment o 110 000 až 120 000 jednotek za vzniku zevního glykoproteinu a C-terminálního fragmentu o 41 000 až 46 000 jednotek, který představuje transmembránový obalový glykoprotein.

Ze shora uvedených důvodů má N-terminální glykoprotein o hmotnosti 110 000 jednotek (gp 110) HIV vlastnosti, pro které byl již dlouhou dobu sledován jako možný cíl, na němž by mohlo dojít k přerušení životního cyklu viru. Bylo prokázáno, že krevní sérum jednotlivců, infikovaných HIV neutralizují tento virus in vitro a současně bylo prokázáno, že v tomto séru jsou přítomny protilátky, které se váží na čištění gp110. Tyto výsledky byly uvedeny například v publikacích Robert-Guroff a další, 1985, Nature 316, 72; Weiss a další, 1985, Nature 316, 69; a Mathews a další, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 83, 9709. Čištěný a rekombinantní gp110 stimuloval produkci neutralizujících protilátek v krevním séru v případě, že byl užit k imunizaci zvířat, jak bylo popsáno v publikacích Robey a další, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 7023; Lasky a další, 1986, Science 233, 209 a Human, Zagury a další, 1986, Nature 326, 249. Byla rovněž prokázána vazba molekuly gp110 na receptor CD4 (T4) a byly rovněž prokázány monoklonální protilátky, které rozeznávají určité epitopy receptoru CD4 a blokují vazbu HIV, tvorbu syncytií a infektivitu. Tyto skutečnosti byly například uvedeny v publikacích Mc. Dougal a další, 1986, Science 231, 382, Putney a další, 1986, Science 234, 1392, kde se rovněž popisuje neutralizace protilátek v séru zvířat po imunizaci rekombinantní složenou bílkovinou, obsahující C-terminální polovinu molekul gp110 a dále bylo v těchto publikacích prokázáno, že glykosylace obalové bílkoviny není nutná k neutralizaci protilátky.

Je tedy zřejmé, že by bylo možno vytvořit alespoň částečnou vakcinu proti AIDS při použití molekuly gp110 viru HIV nebo částí této molekuly. Tyto vakcíny jsou další možností vedle vakcín, připravených z inaktivovaného nebo attenuovaného viru. Inaktivované vakcíny jsou často spojeny s obtížemi, jejichž příčinou je možnost, že všechny částice viru nejsou usmrceny, v případě attenuovaného viru zůstává možnost mutace se znovunabitím schopnosti vyvolat onemocnění. U částečních vakcín se užívá k imunizaci možného hostitele pouze těch částí viru, které obsahují antigeny nebo epitopů, které jsou schopné vyvolat imunologickou odpověď, tj. tvorbu neutralizačních protilátek, ADCC a cytotoxickou odpověď T-buněk. Hlavní výhodou těchto vakcín je skutečnost, že jsou vyloučeny části virového materiálu, které jsou pro tvorbu protilátek bezvýznamné.

Virové podjednotky pro použití ve vakcíně je možno získat různým způsobem. Například obalové glykoproteiny je možno získat expresí v bakteriálním hostiteli s následným čištěním, přestože v této molekule bude chybět většina modifikací, k nimž dochází až po translaci, například glykosylace. Tyto modifikace je možno získat při použití eukaryotického systému exprese, například v kvasinkách nebo v buněčných kulturách ssavčích buněk. Geny viru byly zavedeny do ssavčích buněk při použití viru planých neštovic jako vektoru, jak bylo popsáno v publikaci Mackett M. a další, 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 79, 7415; Panicali D. a Paoletti E., 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 79, 4927. Rekombinantní virus planých neštovic je možno zkonstruovat způsobem podle publikace Hu a další, Nature 320, 537 (1986) nebo Chakrabarti a další, Nature 320, 535 (1986). V těchto systémech je glykoprotein viru, produkováný buňkami, infikovanými rekombinantním virem planých neštovic příslušně glykosylován a může být přenesen z buněčného povrchu do živného prostředí a pak izolován.

Důležitým stupněm při produkci částečné vakcíny je dostatečné čištění požadovaného glykoproteinu z komplexní směsi, získané ze systému, v němž dochází k expresi. K čištění je možno užít několika způsobů. Může jít například o preparativní elektroforézu na polyakrylamidovém gelu, o chromatografii na gelu a různé další typy chromatografického čištění, například při použití iontoměniče, reversní fáze, imunoafinity, hydrofobní interakce a podobně. Většina těchto postupů se užívá v různých kombinacích k získání v podstatě čisté látky, jak bylo popsáno v publikacích Kleid D. G. a další, 1981, Science 214, 1125; Cabradilla C. D. a další, 1986, Biotechnology 4, 128, Dowbenko D. J., 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82, 7748.

Je zřejmé, že by bylo zapotřebí mít k dispozici postupy, které by dovolily získat tyto vakcíny při snížení počtu nutných čistících stupňů ze směsi, v níž došlo k expresi určitého virového antigenu. Účinné oddělení antigenu od dalších surovin by bylo možno provést imunoafinitní chromatografií. Tento postup, který je rovněž znám jako imunoadsorpce spočívá v zásadě v selektivní adsorpci antigenu na pevnou podložku, na níž je kovalentně vázána specifická protilátka. Selektivně adsorbovaný antigen je pak možno vymýt z adsorpčního činidla například změnou pH a/nebo iontové síly použitého pufru.

Polyklonální protilátky, získané ze zvířat, imunizovaných určitým antigenem nebo z přirozeně infikovaných jednotlivců, popsané například ve shora uvedené publikaci Laskyho a dalších, byly často užívány k imunoadsorpci, tyto látky však mají často podstatné nevýhody, například v tom, že

- i) ne všechny protilátky, vázané na nerozpustnou podložku jsou specifické pro uvažovanou molekulu, což vyžaduje další čištění,
- ii) výtěžky antigenu bývají nízké a
- iii) afinita protilátek se často mění od preparátu k preparátu, což vyžaduje modifikace v elučních postupech.

Použití monoklonálních protilátek, specifických pro požadovaný virový antigen by odstranilo všechny shora uvedené nevýhody.

Byly již popsány myší monoklonální protilátky, schopné vázat antigeny HIV. Byla popsána řada monoklonálních protilátek, specifických pro bílkovinu jádra p-25, například v publikaci di Marzo Veronese a další, 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82, 5199 a Chassagne J.

a další, 1986, J. Immunol. 136, 1442. Monoklonální protilátky, specifické pro membránový glykoprotein gp41 již byly také popsány, například v publikaci di Marzo Veronese a další, 1985, Science 229, 1402.

Je zřejmé, že by bylo zapotřebí získat monoklonální protilátku, specifické pro epitopy dobře definované oblasti hlavního obalového glykoproteinu gp110. Monoklonální protilátky, které by se na tyto oblasti vázaly a způsobily by redukci replikace a možnosti přenosu HIV nebo by těmto jevům zcela zabránily, by měly velké použití v léčbě a v profylaxi. Dále by bylo možno užít monoklonální protilátky také k čištění požadované oblasti gp110 od zlomků viru nebo rekombinantního systému pro expresi k použití například ve vakcínách. Mimo to by bylo možno chemicky syntetizovat oblast s obsahem epitopům rozeznávaných monoklonálními protilátkami a tak vyloučit obtíže, související s čištěním a podáváním větších fragmentů molekuly gp110.

Vynález si klade za úkol navrhnout řešení k odstranění shora uvedených nedostatků známých postupů.

Předmětem vynálezu je způsob výroby hybridomů pro produkci monoklonální protilátky proti viru HIV, vyznačující se tím, že se extrakt rozrušeného viru váže na nosič, například na lektin z čočky a získaný materiál se užije k imunizaci myší, jejichž B-lymfocyty ze sleziny se pak podrobí fúzi s NS-1 myelomatickými buňkami za vzniku hybridomu, živné prostředí, v němž se buňky hybridomu udržují se zkoumá na přítomnost protilátek a buňky, které produkují monoklonální protilátky, schopné reakce s determinantním antigenem obalového glykoproteinu gp110 viru HIV, obsaženým v blokujícím peptidu T nebo v jeho derivátu nebo analogu se dále pěstují.

Vynález se tedy týká způsobu výroby nových látek, které neutralizují virus HIV a brání nebo v podstatě brání průniku tohoto viru do buněk hostitele. Peptidy, které napodobují neutralizační oblasti HIV a monoklonální protilátky, které s nimi reagují, je možno užít k diagnóze, léčbě a vakcinaci proti infekcím HIV. Pod pojmem "neutralizační oblast" se rozumí ty části HIV, zejména bílkoviny, které obsahují úseky řetězce aminokyselin, definující jeden nebo větší počet epitopů, schopných reagovat s protilátkami, které buď jednotlivě nebo v kombinaci s dalšími protilátkami, získanými způsobem podle vynálezu, mohou neutralizovat infekce HIV. Vhodné zkoušky na neutralizaci jsou známe, může jít například o redukci infekce HIV v liniích T-buněk, redukce jednotek pro tvorbu plaků v pseudotypech VSV(HIV), nesoucích obalové glykoproteiny HIV, testy na syncytiální inhibici a na vazbu viru a receptoru. V případě potřeby je možno neutralizační účinnost srovnat s reaktivitou protilátky v imunochemických testech jako jsou imunofluorescence, imunoblot a radioimmunologické srážení.

Nové peptidy obvykle obsahují méně než 50 aminokyselin a vždy pět nebo více souvisejících aminokyselin, které tvoří epitopy, v podstatě podobné epitopům v neutralizačních oblastech HIV gp110 nebo p25, pro něž jsou kódem oblastí env a gag genomu HIV. Zvláštní význam mají oblasti od zbytku aminokyseliny 301 do zbytku 336 v gp110 a od zbytku 278 do zbytku 319 a od zbytku 315 do zbytku 363 v p25, všechny zbytky se týkají kmene HIV, označeného LAV_{BRU}. Označení zbytku aminokyselin se užívá podle návrhu Los Alamos Data Bank (AIDS virus sequence database, Los Alamos National Laboratory, Theoretical Division, Los Alamos, NM 87545).

Odborníkům bude zřejmé, že je možno identifikovat analogické "homologní" oblasti z jiných izolátů HIV v závislosti na jejich umístění. Tyto homology mohou být identifikovány s odvoláním na údaje o LAV_{BRU} následujícím způsobem:

a) Sled aminokyselin izolátu HIV a kmene LAV_{BRU} je možno srovnat a získat maximální homology mezi oběma sledy,

b) je možno identifikovat peptidy, které obsahují izoláty aminokyselin, odpovídající umístění peptidů v LAV_{BRU}, které i imunologicky napodobují bílkoviny uvedeného kmene. Peptidy, které obsahují aminokyseliny takto identifikovaného izolátu HIV imunologicky napodobují vlastnosti bílkovin izolátu HIV.

Tento postup je možno použít u kmenů HIV, které ještě nebyly objeveny. Například při zjištění nových kmenů HIV je možno srovnat jejich obalové sledy aminokyselin a sledy jádra se sledem LAV_{BRU} k získání maximální homologie. Tyto postupy jsou v oboru známy. Zvláště nutné je udržet co největší homologii mezi cysteinovými zbytky. Sled aminokyselin nového kmene HIV nebo skupin kmenů je možno syntetizovat a užít v souladu se způsobem podle vynálezu.

Další způsob pro stanovení sledu homologické oblasti v jiných kmenech HIV je způsob podle publikace Scharf a další, Science (1986), 233, 1076. Při tomto způsobu se užívá dvou oligonukleotidových primerů, které se váží na zachované sledy vně oblasti, která je středem zájmu, přičemž v každém primeru se nachází odlišné místo působení restriktivního enzymu. DNA kmene HIV se pak amplifikuje in vitro, výsledné oligonukleotidy je možno podrobit klonování v příslušných vektorech k získání analýzy sledu a pak je včlenit do vakcíny ve formě kazety, která představuje určitý epitop kmene HIV.

Není nutné, aby epitopy, obsažené v těchto sledech vykazovaly zkříženou reaktivitu s protilátkami proti všem kmenům nebo typům HIV. Peptidy, obsahující imunologické epitopy, které odlišují jeden typ nebo serologickou skupinu od jiných, jsou užitečné pro identifikaci určitých typů nebo serologických skupin a mohou být užity k identifikaci jednotlivců, infikovaných jedním nebo větším počtem typů nebo serologických skupin HIV. Je také možno je kombinovat s dalšími peptidy, a to buď z homologní oblasti nebo z jiné neutralizační oblasti pro léčebné účely.

Tyto peptidy jsou s výhodou odvozeny z oblasti gp110 viru. Zvláštní význam této oblasti jsou peptidy, které jsou zakódovány v oblasti env od párů bazí 6667 do párů bazí 6774 izolátu LAV_{BRU}. Různé homologní oblasti jiných izolátů HIV tedy zahrnují homologní sledy, které je možno získat z Los Alamos Data Bank (s výjimkou LAV2), jak je uvedeno v následující tabulce 1.

Tabulka 1

HXB2	TGTACAAGACCCAAACAACAATACAAGAAAAAGA	ATCCGTATC	
	CysThrArgProAsnAsnAsnThrArgLysArg	IleArgIle	309
BH102	----- Ser -----		309
BH8	----- Lys -----		309
HXB3	----- Lys -----		309
H9M	----- Ser -----		309
BRU	----- Ser -----		314
MAL	----- Gly ----- ArgGly ----- HisPhe		314
ELI	-- Ala ---- TyrGln ----- Gln ----- ThrPro --		310
ARV2	----- Ser ----- Tyr --		312
WMJ2	----- Tyr ---- Val - ArgSer ----- LeuSer --		306
RFENV	----- Ser ----- ThrLys		322
Z6	----- TyrLys ----- GlnSer ----- ThrPro --		311
Z3	----- GlySerAspLysLysIle ----- GlnSer --		306
NY5	----- Lys - Gly ----- Ala --		304
CDC42	----- His ----- ValThrLeu		320
LAV	----- Gly - Lys - Val - Gln ----- MetLeu		302
HXB2	CAGAGA	GGACCAGGGAGAGCATTGTTACAATAGGAAAAATAGGAAATATG	
	GlnArg	GlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIleGlyAsnMet	326
GH102	-----		326
BH8	-----		326
HXB3	-----		326
H9M	-----		326
BRU	-----		331
MAL ----- Gln - LeuTyr - Thr - IleVal - AspIle		329
ELI	GlyLeu ----- ...GlnSerLeuTyrThr - Arg - IleValSerArgSer		323

Tabulka 1 - pokračování

ARV2	-----	His - Thr - Arg - IleGlyAsp	327
WMJ2	-----	Arg - ArgGlu... - IleGlyIle	320
RFENV	-----	ValIleTyrAlaThr - Gln - IleGlyAsp	337
Z6	GlyLeu	-----	GlnAlaLeuTyrThr - Arg - ArgThrLysIleIle	327
Z3	ArgIle	-----	LysVal - TyrAlaLys - Gly	319
NY5	GlyPro	-----	ThrLeuTyrAlaArgGlu ----- AspIle	320
CDC42	-----	ValTrpTyr - Thr - Glu - LeuGlyAsp	335
LAV2	MetSer	-----	HisVal - HisSerHisTyrGlnProIle - Lys	323
XHB2	... AGA ... CAAGCACATTGT			
	... Arg ... GlnAlaHisCys			331
BH102	-----			331
BH8	-----			331
HXB3	-----			331
H9M	-----			331
BRU	-----			336
MAL	----- Arg - Tyr --			334
ELI	IleIleGly	-----		330
ARV2	Ile - Lys ...	-----		333
WMJ2	Ile	-----		326
RFENV	Ile - Lys ...	-----		343
Z6	Gly ...	-----		334
Z3	IleThrGly	-----		326
NY5	-----			325
CDC42	Ile	-----		341
LAV2	ArgProArg	----- Met --		330

Další peptidy, které jsou vhodné pro použití nebo vyhledávání monoklonálních protilátek jsou ty peptidy, pro něž je kódem oblast env od páru bází 7246 do 7317 LAV_{BRU}. Tyto protilátky a reaktivní peptidy jsou zvláště dobře použitelné při imunologických zkouškách.

V oblasti gag izolátu LAV_{BRU} jsou sledy aminokyselin p25 od 278 do 319 a od 315 do 363 dalšími neutralizačními oblastmi HIV. Odborníkům bude zřejmé, že lze identifikovat další neutralizační oblasti na podkladě shora uvedených skutečností, zejména může jít o kombinace monoklonálních protilátek s různými epitopy HIV, které mohou mít neutralizační účinnost.

Peptid I, který je také označován peptid 29 je zakódován v oblasti env přibližně od zbytku aminokyseliny 308 do zbytku 328 a má následující sled aminokyselin, přičemž polypeptidy, zahrnuté do tohoto sledu budou tvořit lineární epitopy v oblasti uvedeného sledu:

I (29)

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

Y a Y', v případě, že jsou přítomny, znamenají sledy o až dvaceti aminokyselinách.

V případě, že Y a Y' jsou přítomny, mohou sestávat například z jedné nebo většího počtu aminokyselin, ze sledů, které ohraničují aminokyseliny 308 až 328 ve sledu HIV nebo může jít o jakoukoliv část těchto ohraničujících sledů. Y může například znamenat část nebo celý sled obalových aminokyselin LAV_{BRU} od zbytku 301 do zbytku 307 a Y' může obsahovat část nebo celý okrajový sled LAV_{BRU} od zbytku 329 do zbytku 336 následujícím způsobem:

II (29a)

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

Je také možno připravit části sledu peptidů, získaných způsobem podle vynálezu. Zvláště cenný může být z tohoto hlediska následující sled odvozený od peptidu 29:

III (29b)

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

kde

Y a Y', v případě, že jsou přítomny, znamenají sledy až o přibližně 20 aminokyselinách, a

IV (29c)

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

kde

Y a Y', v případě, že jsou přítomny, znamenají sledy až o přibližně 20 aminokyselinách.

V dalším možném provedení budou mít homologní oblasti izolátu ARV-2, které mají zvláštní význam a pro něž je kódem oblast env od zbytku aminokyseliny 306 až do zbytku 323 typicky následující sled aminokyselin, přičemž oligopeptidy, zahrnuté do tohoto sledu zahrnují i lineární epitopy v tomto sledu:

V (177)

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

kde

Y a Y', v případě, že jsou přítomny, znamenají sled o až dvaceti nebo více aminokyselinách.

V případě, že Y a Y' jsou přítomny, mohou obsahovat jeden nebo větší počet aminokyselinových zbytků, které ohraničují sled aminokyselin v rozmezí zbytků 306 až 323 obalové části ARV-2 nebo jakoukoliv část těchto sledů. Zejména může Y obsahovat celý sled nebo část sledu HIV obalového sledu aminokyselin od aminokyseliny 299 do 306 a Y' může obsahovat celý sled nebo část obalového sledu aminokyselin HIV v rozmezí zbytků aminokyselin 324 až 333.

Je také možno připravit sled, které obsahují části sledu V. V tomto smyslu jsou velmi užitečné následující sledy:

VI (177a)

Y-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Tyr-Ile-Gly-Pro-Gly-Y' a

VII

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

kde

Y a Y', v případě, že jsou přítomny, znamenají sledy o až dvaceti nebo více aminokyselinách.

Dalším příkladem může být některá z homologních oblastí izolátu LAV-2, tak jak jsou zakódovány v oblasti env od zbytku aminokyseliny 311 do zbytku 330 s následujícím typickým sledem:

VIII (110-2-2)

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

kde

Y a/nebo Y', v případě, že jsou přítomny, znamenají sledy o až dvaceti nebo více aminokyselinách.

Tyto sledy byly popsány v publikaci Nature, 326: 662 (1987).

Při provádění způsobu podle vynálezu je možno získat nové buněčné linie, schopné produkce monoklonálních protilátek, schopných rozeznávat ve vysokém titru (od 10^2 do 10^4 až 10^7 nebo více) neutralizační oblasti, obsažené v předem stanoveném sledu obalového glykoproteinu gp110 nebo g25, jejich bílkovinných prekursů, rekombinantních bílkovin, získaných expresí a syntetických peptidů, které obsahují jeden nebo větší počet epitopů v předem stanovené oblasti gp110 nebo p25. Tyto hybridní buňky obsahují identifikovatelný chromosom, v němž byla původní DNA přebudována tak, že obsahuje kód pro protilátku s vazným místem pro

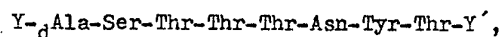
epitop v gp110 nebo p25, společný i některým jiným nebo všem klinickým izolátům HIV. Tyto monoklonální protilátky je možno užít nejrozumnějším způsobem včetně diagnostických a léčebných postupů, stejně jako k identifikaci dalších protilátek, schopných zkřížené reakce a blokujiících protilátek. Peptidy nebo polypeptidy s obsahem epitopů, s nimiž tyto látky reagují mohou nalézt zvláštní použití jako imunogeny pro výrobu vakcín nebo jako léčebné prostředky.

Blokujiící peptidy

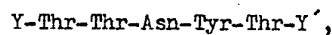
Primárně pro použití ve spojení se shora uvedenými peptidy nebo neutralizujícími monoklonálními protilátkami jsou určeny další peptidy nebo protilátky, které interferují s vazbou HIV na receptory nebo jinak zmírňují infektivitu HIV. S výhodou je možno užít tak zvané "blokujiící peptidy", schopné působit inhibiči proliferace viru, stejně jako monoklonální protilátky, specifické pro epitopy, obsažené v těchto blokujiících peptidech ke zvýšení účinnosti léčby proti infekci HIV. HIV-blokujiící peptidy typicky odpovídají sledu aminokyselin HIV, které jsou pravděpodobně podstatné pro spojení viru s hostitelskou buňkou, například aminokyselinovým zbytkům v rozmezí 190-197 LAV_{BRU} a 185 až 192 ARV2 a HTLV-III (BH-10), pro něž je kódem oblast env. Tyto peptidy zahrnují oktapeptid T, tj. Ala-Ser-Thr-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y', tak jak byly popsány v publikaci Pert a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9254-9258 (1983), peptidy jsou uloženy v oblasti obalového glykoproteinu gp110 nebo 120.

Zvláště zajímavými látkami jsou blokujiící peptidy, které mají následující sledy, s výhodou s NH₂-terminální acetylací a amidací na zkončení COOH:

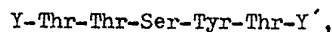
IX (173D)



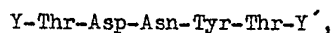
X (186)



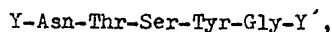
XI (187)



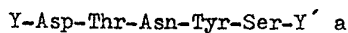
XII (188)



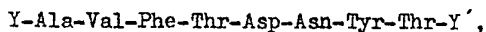
XIII (189)



XIV (190)



XV (191)



kde

Y a Y', v případě, že jsou přítomny, znamenají sled aminokyselin o až 20 aminokyselinách.

Epitopy nebo antigenní determinanty v rámci těchto peptidů jsou typicky definovány sledem alespoň pěti aminokyselin a je možno je použít například při napodobení přírodně se vyskytujícími antigenními úseky HIV pro získání protilátek, reagujících s HIV a vakcín.

Získávání monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky je možno získat tak, že se imortalizuje exprese sledů nukleových kyselin, které jsou kódem pro protilátky, specifické proti HIV tak, že se tyto sledy, typicky cDNA, která je kódem pro uvedené protilátky včlení do hostitele, kterého je možno pěstovat ve tkáňové kultuře. Imortalizovaná buňková linie může být linie savčích buněk, transformovaná onkogenezí, transfekcí, mutací a podobně. Může jít například o buňky myelomu,

lymfonu, nebo o jiné buněčné linie, schopné exprese a sekrece protilátky in vitro. Protilátkou může být přírodně se vyskytující imunoglobulin savce, získaný transformací lymfocytu, zejména splenocytu působením viru nebo fúzí lymfocytu s neoplastickou buňkou, například myelomacickou buňkou za vzniku hybridní buněčné linie. Typicky je možno získat sůlnocytu od zvířat, imunizovaných proti viru HIV nebo proti jeho fragmentu, který obsahuje epitop.

Imunizační postupy se mohou od sebe dosti lišit a přesto zůstávají účinné. Tyto postupy byly souhrnně popsány v publikaci Goding, *Monoclonal Antibodies: Principle and Practice*, Academic Press, druhé vydání (1986). Rozrušený virus, syntetické peptidy a bakteriální složené bílkoviny s obsahem antigenních fragmentů gp110 nebo p25 je možno užít jako látek, vyvolávajících imunitu. S výhodou je možno imunogen z rozrušeného viru, peptidu nebo rekombinantní bílkoviny obohatit o tyto bílkoviny nebo fragmenty s obsahem epitopů, pro něž je žádoucí vypěstovat B-buňky nebo splenocyty, produkující protilátky. Zvláště je možno roztoky s obsahem rozrušeného viru, lyzáty nebo extrakty nebo supernatanty s obsahem rekombinantních bílkovin po expresi nebo rozrušené vektory pro expresi obohatit o glykoproteiny použitím různých čistících postupů, například elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Afinitní čištění při použití lektinu je výhodným a pohodlným postupem pro čištění glykoproteinů gp110 a dalších, užívá se například lektinu z čočky. Rozsah, čištění glykoproteinů z roztoků pro použití jako imunogenů se může pohybovat v širokém rozmezí, například od méně než 50 %, obvykle však alespoň 75 až 95 %, žádoucí je čistota 95 až 99 % a nejvýhodnější je absolutní homogenita těchto látek.

Po vyčištění bílkovin do požadovaného stupně je možno tyto bílkoviny uvést do suspenze nebo je ředit příslušným fyziologickým nosičem pro imunizaci nebo je možno je navázat na pomocný prostředek. Výhodným postupem je například adsorpce bílkovin a jejich fragmentů na lektin z čočky nebo na agarozu s obsahem lektinu z čočky nebo na jiný makromolekulární nosič pro injekční podání. K imunizaci se obvykle užívá antigenních prostředků s obohacenými bílkovinami HIV včetně glykoproteinu gp110 a p25 nebo částí těchto látek v množství 1 µg až 20 mg/kg hostitele. Materiál se podává injekčně, například nitrosvalečně, intraperitoneálně, podkožně, nitrožilně apod. Látku je možno podat jednou nebo opakovaně, obvykle v intervalu jednoho až čtyř týdnů. Imunizovaná zvířata se sledují na produkci protilátek na požadovaný antigen, pak se odstraní sleziny a izolují se B-lymfocyty, načež se dosáhne jejich fúze s buněčnou linií buněk myelomu nebo se tyto buňky transformují. Transformaci nebo fúzi je možno provádět běžným způsobem, postupy při fúzi byly popsány v celé řadě patentových spisů, například 4 172124, 4 350 683, 4 363 799, 4 381292 a 4 423 147. Způsob byl rovněž popsán v publikaci Kennett a další, *Monoclonal Antibodies* (1980) a ve shora uvedené publikaci Godingové.

Immortalizovanou buněčnou linií je možno klonovat a podrobit selekci běžným způsobem, protilátky, které se budou nacházet v supernatantu se váží na virové bílkoviny gp110 a p25 HIV, na rekombinantní složené bílkoviny nebo na syntetické peptidy, které obsahují požadovanou oblast příslušného epitopu. Příslušné immortalizované buněčné linie je pak možno pěstovat in vitro nebo je možno je vstříknout do peritoneální dutiny příslušného hostitele za vzniku ascitu. Vzhledem k tomu, že již jsou k dispozici určitá množství protilátek, o nichž je známo, že jsou specifické pro určité epitopy například v oblasti, pro niž jsou kódem oblasti genomu LAV_{BRU} od páru bází (bp) 6688 do bp6750 včetně peptidu 29 nebo od bp7246 do bp7317 včetně peptidu 36, je možno supernatanty sledovat v kompetici s příslušnou monoklonální protilátkou v kompetitivní zkoušce. Páry bází jsou označovány podle publikace Wain-Hobson a další, *Cell* 44: 9 (1985). Je tedy možno snadno získat další immortalizované buněčné linie hybridomu s požadovanými vaznými vlastnostmi na základě protilátek, získaných způsobem podle vynálezu, specifických pro určitý antigen. Tyto buněčné linie je pak možno podrobit fúzi s jinými neoplastickými B-buňkami, přičemž tyto B-buňky mohou sloužit jako recipient pro DNA genomu, která je kódem pro protilátku.

Výhodnými buňkami jsou buňky hlodavců, zvláště myši, je však možno užít i jiných savčích buněk, například buněk skotu, koní, ovcí, vepře, ptáků a podobně. Imunizací těchto

zvířat je možno snadno provést a jejich lymfocyty, zvláště pak splenocyty je možno podrobit fúzi.

Monoklonální protilátka, kterou vylučují transformované nebo hybridní buněčné linie může být z jakékoliv skupiny nebo podskupiny imunoglobulinů, například IgM, IgD, IgA, IgG₁₋₄ nebo IgE. Ze skupiny IgG je nejvýhodnější běžný isotyp, který se užívá při diagnostických postupech. Monoklonální protilátky je možno užít jako takové nebo ve formě jejich fragmentů, například Fv, Fab, F(ab)₂, avšak obvykle se užívají jako takové.

Aby bylo možno překonat možnou antigenicitu protilátek jiného než lidského původu pro člověka, je možno zkonstruovat chimérní protilátky, v nichž vazný fragment imunoglobulinové molekuly pro antigen (variabilní oblast) je spojena peptidovou vazbou k alespoň části další bílkoviny, která není lidským organismem vnímána jako cizorodá, například na úsek molekuly lidského imunoglobulinu. Tohoto cíle je možno dosáhnout spojením variabilního exonu jiného živočicha se stálými exony lidské oblasti kappa nebo gamma. Tyto postupy jsou v oboru známy a byly popsány například v PCT 86/01533, EP 171496 a EP 173494.

Farmaceutické prostředky a jejich použití

Monoklonální protilátky, získané způsobem podle vynálezu, které mají neutralizační účinek, jako například ty, které reagují s epitopy v gp110 nebo p25 nebo které reagují s blokujícím peptidem je také možno včlenit jako složky farmaceutických prostředků ke zmírnění infekcí HIV. Prostředek tohoto typu by měl obsahovat léčebné nebo profylaktické množství alespoň jedné monoklonální protilátky, získané způsobem podle vynálezu na farmaceutickém nosiči. Farmaceutickým nosičem může být v tomto případě jakákoliv netoxická látka, s níž je možno podávat monoklonální protilátku nemocnému. Může jít o sterilní vodu, alkoholy, tuky, vosky a inertní pevné látky. Současně je možno použít i běžných pomocných látek, například pufrů, dispergačních činidel a podobně. Prostředek může obsahovat jedinou monoklonální protilátku, například v případě, že má být specifický pro kmeny HIV s obalovými glykoproteiny, které obsahují epitopy v oblasti pb 6688 až 6750. Prostředek však může také obsahovat jednu nebo větší počet dalších monoklonálních protilátek za vzniku "koktejlu". Je například možno smísit do "koktejlu" monoklonální protilátky proti různým kmenům HIV a tak získat univerzální prostředek s obsahem monoklonálních protilátek s léčebným a preventivním účinkem proti převážně většině klinických izolátů HIV. Směs může obsahovat monoklonální protilátky, které se váží na bílkoviny nebo glykoproteiny HIV, odlišné než gp110 nebo p25, například na glykoprotein gp41 nebo na p34 nukleázu. Molární poměry různých monoklonálních protilátek se obvykle nebudou lišit faktorem více než 10, obvykle ne více než faktorem 5, s výhodou bude molární poměr v rozmezí 1 : 1 až 2.

Monoklonální protilátky, získané způsobem podle vynálezu je možno užít i ve spojení s jinými prostředky proti retrovirům včetně blokujících peptidů. Běžné současné znalosti, týkající se prostředků proti retrovirům a proti HIV jsou shrnuty v publikaci Mitsuya a další, Nature 325: 773-778, 1987.

Monoklonální protilátky, peptidy a farmaceutické prostředky, které je obsahují je možno užít zejména pro perorální a parenterální podání. S výhodou jde o podání parenterální, tj. podkožní, nitrosvalové, nebo nitrožilní. V případě parenterálního podání prostředek obsahuje roztok monoklonální protilátky, peptidu nebo směsi těchto látek ve vhodném, s výhodou vodném prostředí. Je možno užít různá vodná prostředí, například vodu, vodu s obsahem pufru, 0,4% roztok chloridu sodného ve vodě, 0,3% glycin ve vodě a podobně. Tyto roztoky jsou sterilní a obvykle neobsahují pevný podíl. Je možno je sterilizovat běžným způsobem. Tyto prostředky mohou obsahovat další pomocné látky, běžné ve farmaceutickém průmyslu, tak jak jsou požadovány ke splnění fyziologických požadavků, například k úpravě pH, k odstranění toxicity a podobně, těmito pomocnými látkami mohou být například octan sodný, chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý, mléčnan sodný apod. Koncentrace protilátek v těchto prostředcích se může pohybovat v širokém rozmezí, například od méně než 0,5 %, obvykle od 1 % až do 15 až 20 % hmotnostních, přičemž koncentrace se volí v závislosti na objemu kapaliny, viskozitě apod. a podle zvolené cesty podání.

Typický farmaceutický prostředek pro nitrosvalové podání tedy může například obsahovat 50 mg monoklonální protilátky a sterilní vodu s pufrem do 1 ml. Typický prostředek, určený pro nitrožilní infusi bude obsahovat například 150 mg monoklonální protilátky a do 250 ml Ringerův roztok. Běžné postupy pro výrobu parenterálních prostředků jsou známy a jsou podrobněji popsány například v publikaci Remington's Pharmaceutical Science, 15. vydání, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, (1980).

Monoklonální protilátky a peptidy, získané způsobem podle vynálezu je možno pro delší skladování lyofilizovat a rekonstituovat ve vhodném prostředí před použitím. Tato technika je účinná u běžných imunoglobulinů a je možno užít běžných způsobů lyofilizace a rekonstituce. Je zřejmé, že při provádění těchto postupů může dojít v různém stupni ke ztrátám účinnosti, například v případě běžných imunoglobulinů jsou v případě IgM obvykle větší ztráty účinnosti než v případě protilátek typu IgG, avšak tyto ztráty je možno předem kompenzovat.

Prostředek, který obsahuje monoklonální protilátky, získané způsobem podle vynálezu, peptidy nebo směsi je možno podávat k profylaktickým nebo léčebným účelům proti infekcím HIV. Při léčebném použití jsou tyto prostředky podávány nemocným, kteří již byli infikováni virem HIV v množství, dostatečném k vyléčení nebo alespoň k zastavení infekce a jejích komplikací. Množství, jehož je zapotřebí k dosažení uvedeného cíle se nazývá "terapeuticky účinná dávka". Tato dávka bude záviset na závažnosti infekce a na obecném stavu vlastního obranného systému nemocného, obvykle se však pohybuje v rozmezí 1 až 200 mg protilátky na 1 kg hmotnosti nemocného, běžně se užívají dávky 5 až 25 mg/kg. Je třeba uvážit, že materiály, získané způsobem podle vynálezu se obvykle budou podávat ve vážných stavech, které ohrožují nebo potenciálně ohrožují život. V takových případech je možno podle uvážení ošetřujícího lékaře i vysoko překročit shora uvedené dávky.

Při profylaktickém podání je možno aplikovat prostředky, které obsahují peptidy, protilátky nebo jejich směsi nemocným, kteří ještě nejsou infikováni HIV, avšak jsou v současné době vystaveni nebo pravděpodobně již byli vystaveni působení viru k podpoře odolnosti nemocného proti potenciální infekci nebo je možno jej podrobit vakcinaci proti viru. Dávka, užitá v tomto případě je "profylakticky účinná dávka". Při tomto použití záleží dávka na stavu ošetřovaného, podle celkového zdravotního stavu a obranyschopnosti se podává obvykle 0 až 25 mg/kg, zvláště pak 0,5 mg až 2,5 mg/kg.

Jednorázové nebo opakované podání prostředků a použité dávky volí ošetřující lékař. V každém případě by prostředky s obsahem těchto látek měly obsahovat jejich dostatečné množství pro léčbu nemocného.

Mimoto je možno použít monoklonální protilátky, získané způsobem podle vynálezu jako nosné molekuly, které jsou specifickým cílem. Jakoukoliv protilátku je možno navázat na toxin za vzniku imunotoxinu nebo na radioaktivní materiál nebo lék. Způsoby výroby imunotoxinů a radiofarmaceutických látek jsou známy a jsou uvedeny například v publikaci Cancer Treatment Reports 68: 317 (1984).

Je také možné, že heteroagregáty monoklonálních protilátek, získaných způsobem podle vynálezu s aktivátory lidských T-buněk, například s monoklonálními protilátkami proti C3-antigenu nebo proti F_c -gamma receptoru na T-buňkách mohou umožnit lidským T-buňkám nebo buňkám nesoucím F_c -gamma (jako jsou K-buňky nebo neutrofilie) likvidovat buňky, infikované HIV buněčně zprostředkovanou cytolyzou, závislou na protilátce. (ADCC). Takové heteroagregáty je možno připravit například tak, že se kovalentně zkříženě naváže protilátka proti HIV a protilátka proti CD3, přičemž jako bifunkční reakční činidlo se užije N-sukcinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)propionát, jak bylo popsáno v publikaci Karpowski a další, J. Exp. Med. 160: 1686 (1984).

Prostředky s obsahem peptidů mohou také být použity k léčebným účelům, protože jejich podání vede ke snížení množství HIV v infikovaném hostiteli nebo k jeho odstranění. Tyto prostředky, například peptid 29, blokující peptidy a peptid 126 (popsaný v US patentové přihlášce č. 930 785) je možno podávat v příslušném fyziologickém nosiči nitrožilně, pod-

kožně, nitrosvalově, intraperitoneálně apod. Různými nosnými prostředními mohou být roztok chloridu sodného s fosfátovým pufrům, roztok chloridu sodného, voda, chlorid draselný, mléčnan sodný apod. Koncentrace peptidů se bude měnit v širokém rozmezí v závislosti na jeho použití, na jeho účinnosti a na způsobu podání. S výhodou se užije peptidů s amidovou skupinou na koncové skupině COOH, které jsou na zakončení s aminoskupinou formylovány nebo je možno použít jejich jiné deriváty, přijatelné z farmaceutického hlediska. Přidáním blokujících peptidů k napodobení a neutralizaci oblastí HIV a/nebo specifických reaktivních protilátek silně zvýší léčebný účinek. Je také možno včlenit do těchto prostředků ještě další látky proti HIV, například protilátky jiné než monoklonální, jako 3'-azido-3'-deoxythymidin, 2',3'-dideoxycytidin, 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrocytidin a podobně.

Použití monoklonálních protilátek při imunoafinitním čištění

Monoklonální protilátky, specifické pro polypeptidy s obsahem gp110 nebo jiných antigenních determinantů, zejména těch, které byly získány biologickou expresí rekombinantních složených bílkovin nebo lyzátů nebo extraktů HIV, pěstovaného v kultuře jsou zvláště vhodné pro použití k čistícím postupům. Tyto protilátky budou obvykle mít afinitní konstantu řádu 10^8 až 10^{12} M. Tyto protilátky je možno užít k čištění rekombinantních složených bílkovin z živného prostředí rekombinantního systému pro expresi v případě, že bílkovina, vzniklá tímto způsobem je vylučována nebo ze složek rozrušeného biologického systému pro expresi v případě, že se materiál, vzniklý expresí z buňky nevyklučuje. Obvykle se monoklonální protilátky, schopné reakce s gp110 nebo jiným antigenním determinantem váží na nosič nebo podložku, na nichž se imobilizují. Roztok, který obsahuje antigenní determinanty HIV se pak uvede do styku s imobilizovanou protilátkou za podmínek, vhodných pro tvorbu imunologického komplexu mezi protilátkou a polypeptidy, které obsahují antigenní determinanty gp110. Nenačávaný materiál se oddělí od vázaného imunologického komplexu a komplex nebo antigenní fragmenty gp110 se pak od nosiče oddělí.

Monoklonální protilátky se obvykle alespoň částečně čistí při svém získání z ascitu nebo ze supernatantu buněčné kultury před navázáním na nosič. Tyto postupy jsou v oboru dobře známy a mohou zahrnovat frakcionaci neutrálními solemi ve vysoké koncentraci. Je možno užít i jiných postupů, například chromatografie na DEAE-celulóze, filtraci na gelu, preparativní elektroforézu na gelu nebo afinitní chromatografii při použití bílkoviny A a tímto způsobem dosáhnout alespoň částečného čištění monoklonální protilátky před jejím navázáním na imunoabsorpční materiál.

Nosič, na nějž je navázána a imobilizována monoklonální protilátka by měl mít následující obecné vlastnosti:

- a) slabou interakci s bílkovinami k minimalizaci nespecifických vazeb,
- b) dobrý průtok, aby mohly protékat i vysokomolekulární látky,
- c) obsah chemických skupin, které mohou být aktivovány nebo modifikovány tak, aby umožňovaly chemickou vazbu monoklonálních protilátek,
- d) mají být fyzikálně a chemicky stálé za podmínek, jichž se užívá k vazbě monoklonálních protilátek a
- e) mají být stálé vzhledem k podmínkám a ke složkám pufrů, jichž je zapotřebí pro absorpci a eluci antigenu.

Některé nosiče, které se běžně užívají jsou agaróza, deriváty polystyrenu, polysacharidy, polyakrylamidy, aktivovaná celulóza, sklo a podobně. Existují různé chemické způsoby pro vazbu protilátky na substrát, tak jak byly popsány například v publikaci Guatrecasas P., *Advances in Enzymology* 36: 29 (1972). Protilátky, získané způsobem podle vynálezu je možno vázat přímo na použitý nosič nebo přes vazný řetězec apod. Obecné podmínky, které jsou nutné pro imobilizaci monoklonálních protilátek na chromatografické materiály jsou v oboru dobře známy. Byly popsány například v publikaci Tijssen P., 1985, *Practice and Theory of Enzyme immunoassay*. Konkrétní vazné postupy budou poněkud záviset od typu protilátky, kterou je zapotřebí vázat. Monoklonální protilátky mají tu vlastnost, že se obvykle nemění od vsázky ke vsázce, takže je možno optimalizovat podmínky jejich vazby. Vazba ob-

vykle spočívá v kovalentním navázání na nosič.

Suspenze extraktu nebo lyzátu viru HIV nebo supernatant pro pěstování biologického systému pro expresi nebo suspenze rozrušených buněk se pak přidá k dělicí matici. Směs se inkubuje za podmínek a po dobu, dostatečnou ke vzniku imunologického komplexu, obvykle alespoň 30 minut, zpravidla v rozmezí 2 až 24 hodin. Imunologické komplexy s obsahem polypeptidů s antigenními částmi gp¹¹⁰ se pak ze směsi oddělí. Pak se směs odstraní, například elucí a navázaný imunologický komplex se důkladně promyje adsorpčním pufrům. Pak je možno komplexy vymývat z dělicí matrice při použití rozpouštědla, které je kompatibilní s nosičem, výběr může provést každý odborník. Je také možno selektivně odstranit polypeptidy s obsahem gp¹¹⁰ nebo jiných antigenních částí. Například peptidy, které obsahují epitopy, rozeznávané protilátkami je možno užít pro kompetici na vazné místo v protilátce, což představuje možnou eluční techniku, kterou je možno provést za šetrných elučních podmínek, selektivně adsorbovaný polypeptid s obsahem antigenu gp¹¹⁰ je možno vymývat s afinitního adsorpčního materiálu tak, že se změní pH a/nebo iontová síla pufru. K odstranění navázaného antigenu je také možno použít chaotropní činidla. Výběr chaotropního činidla, jeho koncentraci a jiné podmínky eluce jsou závislé na interakci mezi antigenem a protilátkou, avšak jakmile jsou stanoveny, není obvykle zapotřebí je měnit, jak tomu obvykle je v systémech pro dělení polyklonálních materiálů.

Takto získaný materiál je obvykle nutno upravit na fyziologické pH v případě, že bylo užito pufrů s velkou iontovou silou nebo příliš nízkého nebo vysokého pH, aby bylo možno oddělit navázaný antigen gp¹¹⁰ od matrice. Někdy je také zapotřebí užít dialyzy nebo filtrace na gelu k odstranění přebytku solí v elučním materiálu, aby bylo možno rekonstituovat gp¹¹⁰ nebo polypeptidy s obsahem fragmentů gp¹¹⁰ s antigenními vlastnostmi.

Způsobem podle vynálezu je tedy možno získat v podstatě čištěný gp¹¹⁰ nebo polypeptidy, které obsahují jeho fragmenty s antigenním účinkem, a to buď z přírodního zdroje z infikovaných buněčných kultur nebo po expresi v bakteriích, kvasinkách nebo pěstovaných buňkách hmyzu nebo savců. Polypeptid gp¹¹⁰ nebo jeho fragmenty nebo jiné čištěné bílkoviny jsou obvykle čisté na více než 50 %, častěji však na více než 75 % a zpravidla na více než 95 až 99 %. Tyto molekuly je pak možno použít k nejrůznějším účelům.

Bílkoviny gp¹¹⁰ HIV, polypeptidy, které obsahují fragmenty těchto materiálů s antigenními vlastnostmi nebo jiné, v podstatě čištěné bílkoviny je možno použít k různým účelům včetně výroby vakcíny proti AIDS. Vakcína obsahuje účinnou dávku určujících antigenů, například gp¹¹⁰ nebo jejich neutralizační oblast. Jako další složku je možno užít antigenně účinné části bílkovin HIV nebo glykoproteinů, které stimulují produkci protilátek, (s výhodou neutralizující protilátky) v imunizovaném hostiteli, tyto protilátky jsou pak schopny chránit proti budoucí infekci virem HIV.

Diagnostické použití monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky, získané způsobem podle vynálezu je možno použít také k diagnostickým účelům. K tomuto cíli je možno je označit. Diagnostický postup typicky spočívá v detekci tvorby komplexu vazbou monoklonální protilátky na antigen HIV. V případě, že nebylo provedeno značení, je možno protilátky užít například pro aglutinaci. Mimoto je možno užít neznačené protilátky například v kombinaci s jinými značenými protilátkami (druhá protilátka), které reagují s monoklonální protilátkou, jako jsou například protilátky, specifické pro imunoglobulin. Mimoto je možno monoklonální protilátky přímo značit. Je možno užít široké škály značících prostředků, například radionuklidů, fluorescenčních látek, enzymů, enzymatických substrátů, kofaktorů enzymů, inhibitorů enzymů, vazných řetězců (zejména haptenu) apod. Jsou k dispozici různé imunologické postupy, jako příklad je možno uvést alespoň ty, které byly uvedeny v US patentových spisech č. 3 817 827, 3 850 752, 3 901 654, 3 935 074, 3 984 533, 3 996 345, 4 034 074 a 4 098 876. Obvykle je možno užít monoklonální protilátky a peptidy, získané způsobem podle vynálezu při enzymatických imunologických zkouškách, při nichž, například, se protilátka nebo jiné protilátky z různých druhů váží na enzym. V případě, že se biologický vzorek s obsahem antigenů HIV, například

lidské krevní sérum, sliny, sperma, vaginální sekret nebo suspenze buněk, infikovaných virem uvede do styku s protilátkami, dochází k vazbě mezi antigenem a těmi molekulami, které obsahují příslušný epitop. Tyto bílkoviny nebo částice viru je pak možno oddělit od nenavázaných složek a přidat druhou protilátku, značenou enzymem. Pak se stanoví přítomnost konjugátu protilátky a enzymu, specificky vázaného na antigen. Je možno využít i jiných běžných postupů, které jsou v oboru známy.

Je také možno uspořádat sestavy pro použití uvedených protilátek při detekci infekcí HIV nebo přítomnosti antigenu HIV. Tyto materiály obsahují monoklonální protilátku, získanou způsobem podle vynálezu obvykle v lyofilizované formě, a to buď jednotlivě nebo ve spojení s dalšími protilátkami, specifickými pro jiné epitopy HIV. Protilátky, které mohou být spojeny se značící skupinou se užívají spolu s pufrů, například tris-pufrů, fosfátovým pufrů, uhličitanovým apod. spolu se stabilizátory, biocidními látkami, inertními bílkovinami, například sérovým albuminem skotu apod. Tyto materiály jsou obvykle přítomny v množství nejvýš 5 % hmotnostních, vztaženo na množství účinné protilátky, jsou však přítomny v množství alespoň 0,001 %, vztaženo na protilátku. Často může být žádoucí včlenit inertní materiál ke zředění účinné složky v množství 1 až 99 % hmotnostních celkového množství prostředku. V případě, že se užije druhé protilátky, schopné vázat monoklonální protilátku, bude obvykle přítomna v oddělené ampuli. Druhá protilátka je v typických případech vázána na značící materiál a zpracována na pomocný prostředek běžným způsobem.

Detekce antigenů gp110 a g25 může nalézt své použití v diagnóze infekce virem HIV nebo celého viru v různých biologických vzorcích. Těmito biologickými vzorky mohou být například krevní sérum, sliny, sperma, bioptické vzorky tkání (mozek, kůže, lymfatické uzliny, slezina apod.), supernatanty buněčných kultur, rozrušené eukaryotické a bakteriální systémy pro expresi a podobně. Přítomnost viru se zjišťuje inkubací monoklonálních protilátek s biologickým vzorkem za podmínek, při nichž může dojít ke tvorbě imunologického komplexu s následnou detekcí této tvorby. Při jednom z možných provedení se tvorba komplexu zjišťuje použitím druhé protilátky, která je schopna vázat monoklonální protilátku, tato druhá protilátka je v typických případech vázána na značící materiál. V jiném možném provedení je monoklonální protilátka vázána na pevný nosič, který se pak uvede do styku s biologickým vzorkem.

Příprava a použití syntetických peptidů

Způsobem podle vynálezu je možno získat nové peptidy, které mimo jiné imunologicky napodobují bílkovinné epitopy, pro něž je kódem retrovirus HIV, zejména epitopy, zakódované v oblasti env nebo gag genomu viru, které jsou kódem pro gp110 nebo p25. Aby bylo možné zachytit mezikmenové variace mezi různými izoláty, je možno provést různé úpravy, vyrovnávající konservativní substituce a selekci mezi alternativami, v nichž dochází k nekonservativním substitucím. Tyto peptidy je možno použít jako imunogenní látky k inhibici nebo eliminaci produkce antigenu HIV in vivo nebo in vitro při detekci viru nebo protilátek proti viru ve fyziologickém vzorku. V závislosti na zvoleném postupu je možno vázat uvedené peptidy na nosič nebo na jiné sloučeniny, značené nebo neznačené, na pevný nosič a podobně.

V jednom z možných provedení je možno požadované peptidy odvodit od oblasti gp110 viru. Zvláštní význam má úsek v oblasti env od bp6688 do bp6750 a od bp7246 do bp7317.

Uvedené peptidy, včetně blokujících peptidů obsahují alespoň pět, někdy 6, 8, 12, 21, obvykle méně než 50, ještě častěji méně než 25 aminokyselin ve sledu, pro něž je kódem retrovirus HIV. Je žádoucí, aby peptid byl co nejmenší a současně si uchoval v podstatě veškerou imunologickou reaktivitu nebo protivirovou účinnost velkého peptidu. V některých případech může být žádoucí spojit dva nebo větší počet oligopeptidů, které se nepřekrývají za vzniku jediného peptidu nebo je užít jako jednotlivé peptidy současně, takže je možno získat současně nebo odděleně stejnou citlivost.

Peptid je možno modifikovat zavedením konservativních nebo nekonservativních substitucí do struktury peptidu, obvykle méně než 20 % častěji méně než 10 % aminokyselin může

být změněno. V těch situacích, v nichž jsou oblasti polymorfni může být žádoucí zaměnit jednu nebo větší počet určitých aminokyselin tak, aby bylo možno účinněji napodobit lišící se epitopy různých kmenů retroviru. V mnoha případech je možno ke zvýšení chemické stálosti nahradit methionin norleucinem (Nor).

Je zřejmé, že peptid, užitý v průběhu způsobu podle vynálezu nemusí být totožný s žádným ze specifických sledů HIV, pokud použitá sloučenina je v kompetici s bílkoviny alespoň jednoho kmene retroviru HIV. Je tedy možno peptidy různým způsobem pozměnit, například vřazením, vypuštěním a substitucí některých aminokyselin, konservativní nebo nekonservativní, přičemž tyto změny mohou s sebou nést určité výhody při použití. Při konservativní substituci jde o substituci uvnitř skupin gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; phe, tyr; a nor, met; sled se obvykle nebude lišit o více než 20 % od sledu alespoň jednoho kmene HIV retroviru s výjimkou, že dojde k přidávání aminokyselin na koncích pro získání spojovacího řetězce ("ramene"), který je možno užit k imobilizaci peptidu. Tyto spojovací řetězce jsou tvořeny alespoň jednou aminokyselinou, avšak mohou obsahovat i 50 a více aminokyselin, obvykle však jde o 1 až 10 aminokyselin.

Peptid, v němž je řetězec aminokyselin modifikován substitucí, adicí nebo delecí zbytků aminokyselin si má zachovat v podstatě veškerou imunologickou reaktivitu nebo protivirovou účinnost nemodifikovaného peptidu, což je možno měřit nejrozličnějším způsobem. Je možno použít d-isomer jedné nebo většího počtu aminokyselin v případě potřeby k modifikaci biologických vlastností, například účinnosti, rychlosti rozpadu a podobně.

Mimoto je možno na každý konec peptidu přidat jednu, dvě nebo větší počet aminokyselin k usnadnění vzájemné vazby peptidů, k vazbě na nosič, sestávající z většího peptidu, k modifikaci fyzikálních, chemických nebo jiných vlastností peptidu nebo oligopeptidu apod.

Ke zlepšení příští vazby je možno na zakončení peptidu navázat například aminokyselinou tyrosin, cystein, lysin, kyselinu glutamovou nebo asparagovou apod., a to na N-zakončení nebo na C-zakončení. Cystein je zvláště vhodnou aminokyselinou pro usnadnění kovalentní vazby nebo pro tvorbu polymerů oxidací.

Mimoto se sledy peptidů nebo oligopeptidů mohou lišit od přírodních sledů tak, že terminální skupina $-NH_2$ je acylována, například acetylována nebo je amidována kyselinou thio glykolovou nebo je převedena na amid například působením amoniaku nebo methylaminu za získání zvýšené stálosti, zvýšené hydrofobnosti pro vazbu nebo spojení s další molekulou nebo s nosičem nebo pro polymeraci.

Například v případě, že v peptidech I až VIII a IX až XV jsou přítomny substituenty Y a Y', existuje výhodné provedení, v němž Y nebo Y' znamenají jeden nebo větší počet cysteinových zbytků nebo kombinaci cysteinových zbytků s dalšími aminokyselinami, které odhalují cysteinový zbytek od zakončení a prodlužují řetězec. Výhodnou aminokyselinou v tomto smyslu je zejména glycin. Výhodným peptidem pro použití při oxidativní polymeraci je takový peptid, který v symbolech Y a Y' obsahuje alespoň dva cysteinové zbytky. V případě, že jsou dva cysteinové zbytky přítomny na tomtéž zakončení peptidu, je výhodné oddělit tyto zbytky od sebe jedním až třemi zbytky aminokyselin, s výhodou běží o glycinové zbytky. Přítomnost cysteinových zbytků může umožnit tvorbu dimerů peptidu a/nebo zvýšit hydrofobnost výsledného peptidu, což usnadňuje imobilizaci peptidu na pevné fázi nebo na imobilizačním systému.

Zvláštní význam má použití merkaptanové skupiny cysteinu nebo thio glykolových kyselin, užitých k acylaci terminálních aminoskupin a podobně pro vazbu dvou peptidů nebo oligopeptidů nebo pro jejich spojení disulfidovou skupinou nebo delším řetězcem za vzniku polymeru, který obsahuje řadu epitopů. Tyto polymery mají výhodu zvýšené imunologické reaktivity. V případě, že se užití k tvorbě polymeru různé peptidy, vzniká další možnost vyvolat tvorbu protilátek, které reagují imunologicky s několika antigenními determinanty nebo s různými izoláty HIV.

Aby bylo možno dosáhnout tvorby antigenně účinných polymerů (syntetických multimerů), je možno užit sloučeniny, které obsahují bis-halogenacetylové skupiny, nitroarylhalogenidy

a podobně, přičemž reakční činidlo má být specifické pro thioskupiny. Spojením mezi dvěma merkaptoskupinami tedy může být v případě použití různých peptidů nebo oligopeptidů jednoduchá vazba nebo řetězec, který obsahuje alespoň 2, obvykle alespoň 4, nejvýš však 16 a obvykle ne více než 14 atomů uhlíku.

Uvedené peptidy je možno užít navázané na makromolekulárním nosiči (tj. na nosiči s molekulovou hmotností alespoň 5 kjednotek). Tímto nosičem může být například polyamino-skupina (polyaminokyselina), buď přírodně se vyskytující nebo syntetická. Příkladem takového nosiče může být například poly-L-lysin, hemocyanin, thyreoglobulin, albuminy, například sérový albumin skotu, toxid tetanu a podobně. Výběr nosiče je závislý především na cíli, k němuž má být antigen použit a na jeho dostupnosti.

V případě těchto konjugátů tedy připadá alespoň jedna molekula alespoň jednoho peptidu na makromolekulu a ne více než 1 až 0,5 kjednotek, obvykle ne více než 1 až 2 kjednotky makromolekuly. Na tutéž makromolekulu je možno navázat jeden nebo větší počet různých peptidů.

Užívá se běžného způsobu vazby, reakčních činidel jako kyseliny p-maleimidobenzoové, p-methyldithiobenzoové, anhydridu kyseliny maleinové, anhydridu kyseliny jantarové, glutaraldehydu a podobně. K vazbě může dojít na N-zakončení, C-zakončení nebo na místě, které se nachází ve střední části molekuly. Získaný peptid je možno derivatizovat vazbou na nosič a podobně.

K detekci přítomnosti protilátek k bílkovinám retroviru nebo přítomnosti vlastních bílkovin retroviru je možno použít různých způsobů, které jsou v oboru známy. Zvláštní význam má použití značených reakčních činidel, kde označení způsobí zjistitelný signál nebo vazba peptidu přímo nebo nepřímo na povrch, na němž může dojít k vazbě bílkovin na protilátky. Přítomnost lidské protilátky, vázané na peptid je pak možno prokázat použitím exogenní protilátky, specifické pro lidský imunoglobulin, obvykle pro IgM a IgG nebo použitím značené bílkoviny, specifické pro imunologický komplex, například Rh faktor bílkoviny A S. aureus.

Typickým provedením těchto zkoušek je způsob, při němž se užívá například mikrotitračních ploten s určitým počtem vyhloubení, v nichž jsou polypeptidy nebo konjugáty adsorbovány na dno a/nebo stěny vyhloubení, a to kovalentní nebo jinou vazbou. Vzorek, obvykle lidská krev nebo sérum v příslušném zředění v pufru se přidá do vyhloubení v plotně a tam se ponechá dostatečně dlouhou dobu pro tvorbu komplexu mezi polypeptidem a jakoukoliv protilátkou ve vzorku. Pak se supernatant odstraní a vyhloubení se promyje k odstranění nespecificky vázaných bílkovin. K detekci se užije značená specifická bílkovina, která se specificky váže na komplex, například antiserum proti lidskému imunoglobulinu.

Peptid je možno připravit celou řadou způsobů. Protože jde o látku s poměrně krátkým řetězcem, je možno jej syntetizovat v roztoku nebo na pevné podložce běžným způsobem. Dnes jsou k dispozici i různá automatická zařízení k syntéze těchto látek, která je rovněž možno použít. Tato zařízení a způsob jejich použití byly popsány například v publikaci Stewart a Young. Solid Phase Peptide Synthesis, 2. vydání, Pierce Chemical Co., 1984 a Tam a další, J. Am. Chem. Soc. 105: 6442 (1984).

Je také možno užít technologie s užitím hybridní DNA a připravit syntetický gen použitím jednoduchých řetězců, které jsou kódem pro uvedené polypeptidy nebo řetězce, které jsou v podstatě komplementární, přičemž jednoduché řetězce se překrývají a je možno je spojit a užít hybridizace. Hybridizované řetězce je pak možno navázat za vzniku úplného genu a při volbě vhodných zakončení je možno takto získaný gen včlenit do vhodného vektoru, tak jak jsou v současné době k dispozici. Tyto postupy jsou popsány například v publikaci Maniatis a další, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, CSH, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. Je také možno oblast virového genomu, která je kódem pro peptid klonovat běžným způsobem při použití rekombinantní DNA a pak dosáhnout exprese, jak je rovněž popsáno ve shora uvedené publikaci Maniatis a dalších.

Kódové sledy DNA z LAV_{BRU} a ARV, dvou izolátů retroviru HIV, kterých je možno užít k expresi peptidů je možno znázornit takto:

LAV_{BRU} TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT ATC CGT ATC CAG AGG GGA CCA GGG AGA GCA
TTT GTT ACA ATA GGA AAA ATA GGA AAT ATG AGA CAA GCA CAT TGT

ARV-2 TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT ATC TAT ATA GGA CCA GGG AGA GCA TTT
CAT ACA ACA GGA AGA ATA ATA GGA GAT ATA AGA AAA GCA CAT TGT.

Fragmenty sledu je možno užít k expresi fragmentů peptidu, je možno provést konservativní sledy bází, v nichž modifikované kodony jsou kódem pro tutéž aminokyselinu nebo nekonservativní změny v kódovém sledu, přičemž výsledná aminokyselina může způsobit konservativní nebo nekonservativní změnu ve sledu aminokyselin, jak již bylo uvedeno shora.

Kódový sled je možno prodloužit na 3'-zakončení, 5'-zakončení nebo na obou zakončeních při zachování jeho epitopu. Prodloužení je možno uskutečnit vazným řetězcem například pro značící reakční činidlo, jako je enzym, pro spojení dvou nebo většího počtu peptidů, pro získání větší antigenní účinnosti, pro zavedení míst pro působení restrikčních enzymů pro klonování a podobně.

Sled DNA sám o sobě, jeho fragmenty nebo delší úseky, obvykle s obsahem alespoň 15 bází, s výhodou s obsahem alespoň 18 bází je možno užít jako nukleotidovou sondu pro detekci RNA retroviru nebo DNA proviru nebo k identifikaci homologních oblastí nebo pro zjišťování sledu. K tomuto účelu je možno užít celou řadu postupů, například Grunstei-Hognessův postup, Southernovu techniku, dot-blot a různá zlepšení těchto postupů, tak jak byly popsány například v US patentovém spisu č. 4 358 535.

Uvedené peptidy včetně blokujících peptidů a jejich analogy je možno užít jako takové nebo v kombinacích ve vakcínách. Ve vakcínách je možno užít i anti-idiotypové protilátky, tj. protilátky, reaktivní s idiotypy protilátek, získaných způsobem podle vynálezu a obsahujícími epitopy, napodobující neutralizační oblasti HIV. Peptidy nebo anti-idiotypové protilátky je možno zpracovávat obvyklým způsobem, užívají se obvykle v koncentraci 1 µg až 20 mg/kg. Jako nosiče se užívají prostředí, přijatelná z fyziologického hlediska, například sterilní voda, fyziologický roztok chloridu sodného, tentýž roztok s obsahem fosfátového pufru a podobně. Vakcína rovněž může obsahovat pomocná činidla, například gel hydroxidu hlinitého, smáčedla, například isolecithin, polyoly, polyanionty, peptidy, bílkoviny, například toxiny záškrtu nebo cholery a olejové emulze. Peptidy je rovněž možno zapouzdřit do liposomů nebo konjugovat s polysacharidy, polypeptidy nebo polymery za vzniku vakcíny. Vakcína se podává injekčně, například nitrosvalově, peritoneálně, podkožně, nitrožilně apod. Dávka, vyvolávající imunitu se podává jednorázově nebo opakovaně, obvykle v intervalu jednoho až čtyř týdnů. "Dávka, vyvolávající imunitu" je to množství vakcíny, které je schopno vyvolat v hostiteli imunologickou odpověď.

Další podrobnosti, týkající se způsobu podle vynálezu budou osvětleny v následujících příkladech.

Příklad 1

Tvorba a charakterizace monoklonálních protilátek

V příkladu se popisuje tvorba hybridních buněčných linií, které produkují monoklonální protilátky, specifické pro obalové glykoproteiny HIV. Tento postup zahrnuje použití čištěných lektinových extraktů LAV_{BRU}, vázaných na lektin z čočky na agaroze jako imunogenu. Monoklonální protilátky, které jsou postupně vytvořeny hybridními buněčnými liniemi jsou charakterizovány svou schopností imunoblotu a radioimunologické precipitace gp110 z čištěného LAV a jako rekombinantní složená bílkovina, jejíž exprese bylo dosaženo. Monoklonální protilátky, které se váží na epitopy gp110 jsou také reaktivní při použití systému ELISA s rozrušeným úplným virem, se složenými bílkovinami a syntetickými peptidy a reagují s úplným virem při nepřímé fluorescenci.

Hybridní buněčné linie, schopné produkce monoklonálních protilátek byly získány násled-

dujícím způsobem:

Virus LAV, čištěný z infikovaných buněk CEM (ATCC č. CRL8904) byl rozrušen v 50 mM Tris o pH 7,4, 0,15 M chloridu sodného, 1,0 % Aprotininu, 2,0 % Nonidet P-40^R (NP-40) (oktylfenoxypolyethoxyethanol). Extrakty byly dvakrát vyčeřeny odstředěním a byly upraveny na 0,5 % NP-40 přidáním pufru pro rozrušení viru (3 objemy) bez NP-40. Sepharoza s lektinem z čočky (Pharmacia, Pis cataway, N. J.) byla předem promyta puftrem pro rozrušení viru (50 mM Tris, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 1,0 % Apritininu, 0,5 % NP.4P). Vyčeřené extrakty viru byly adsorbovány na lektin z čočky 42 hodin při 4 °C. Neadsorbovaný materiál byl odstraněn promytím přebytkem pufru. Pak byl adsorbovaný materiál vymýván 0,2 M alfa-methylmannosidem v adsorpčním pufru. Eluent byl dialyzován proti PBS k odstranění cukru a materiál pak byl znovu adsorbován na Sepharozu s lektinem z čočky.

Komplex glykoproteinu se Sepharozou s lektinem z čočky byl užít k imunizaci myši Balb/c trojnásobným podáním intraperitoneálně bez pomocného prostředku v intervalu 2 až 3 týdnů. Pak byly vyjmuty sleziny a byla prokázána přítomnost protilátek v oběhu pomocí imunoblotové analýzy. Šlo o protilátky proti glykoproteinu HIV. Stejný výsledek poskytla i ELISA a RIP.

Při získávání buněčných linií bylo užito postupů podle publikací Kohler a Milstein, Nature, 256:495 (1985) s modifikací podle publikace Goldstein L. C. a další, Infect. Immun. 38: 273 (1982). B-lymfocyty ze sleziny byly podrobeny fúzi s NS-1 myelomatickými buňkami při použití 40 % polyethylenglykolu. Po fúzi byla směs buněk znovu uvedena do suspenze v prostředí HAT (RPMI-1640, doplnění 15 % fetálního telecího séra, 1×10^{-4} M hypoxanthinu, 4×10^{-7} M aminopterinu a $1,6 \times 10^{-5}$ M thymidinu) k selekci na růst hybridních buněk, načež byly buňky rozděleny do mikrotitračních ploten s 96 vyhloubeními v koncentraci 1 až 3×10^6 buněk ml a pak byly inkubovány při teplotě 37 °C ve vlhkém ovzduší s obsahem 6 % oxidu uhličitého. Kultury byly živěny náhradou jedné poloviny supernatantu novým prostředím HAT. Pak byla vyhloubení sledována s použitím inverzního mikroskopu na známky buněčné proliferace a jakmile bylo dosaženo dostatečné hustoty buněk, byly supernatanty zkoumány na přítomnost protilátek proti izolátu LAV.

Vyhlobení, která obsahovala hybridní buňky, produkující protilátky proti LAV byla identifikována zkouškou ELISA měřením vazby na čištěný úplný rozrušený virus nebo na složene bílkoviny po biologické expresi. Zkoušky při použití systému ELISA s rozrušeného viru byly prováděny s LAV EIA plotnami (Genetic Systems, Seattle, Washington). Plotny byly inkubovány se supernatantem z buněčných kultur při teplotě 37 °C po dobu 45 minut a pak byly třikrát promyty 0,05 % Tween 20 v roztoku chloridu sodného s obsahem fosfátového pufru (PBS-Tween).

Pak byla přidána kozí protilátka proti myšimu IgG, vázaná na peroxidátu (ředění 1 : 2 000 v PBS-Tween (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, California) v množství 100 μ l na vyhloubení a plotny byly inkubovány 45 minut při teplotě 37 °C a pak byly promyty stejně jako shora. Pak byl přidán substrát (0,025 M kyselina citronová, 0,05 M hydrogenfosforečnan sodný o pH 5,0 s obsahem 14 mg o-fenylendiaminu a 10 μ l 30% peroxidu vodíku na 50 ml) a plotny byly inkubovány 30 minut při teplotě místnosti ve tmě. Reakce byla zastavena přidáním 3 N kyseliny sírové a kolorimetrické reakce byly měřeny kvantitativně automatickým odečítacím zařízením. Vyhlobení, u nichž byla prokázána pozitivní reakce byla pak dále klonována ředěním, znovu zkoušena na specifičnost a pěstována.

Monoklonální protilátky, které byly produkovány a vylučovány výslednými hybridními buněčnými liniemi byly dále charakterizovány na svou specifičnost a reaktivitu imunoblotovou reakcí, imunoprecipitací a systémem ELISA při použití rozrušeného viru LAV, rekombinantních složených bílkovin LAV a syntetických peptidů LAV. Všechny protilátky byly izotypu IgG. Buněčné linie HIV-gp110-1, HIV-gp110-2 a HIV-gp110-3 byly uloženy v American Type Culture Collection a označeny ATCC č. HB 9175, HB 9176 a HB 9177.

Rekombinantní složené bílkoviny, testované na reaktivitu byly označeny ENV2, ENV3, ENV4 a ENV5: Bílkovina ENV2 byla získána expresí při použití plasmidu pENV2 (ATCC 53071),

jde o oblast LAV v rozsahu bp6598 až do bp7178 (číslování podle publikace Wain-Hobson a další, Cell 44: 9 (1985), ENV3 byl získán expresí při použití plasmidu pENV3 (ATCC 53072), který obsahuje oblast LAV od bp7178 do bp7698, ENV4 byl získán expresí při použití plasmidu pENV4 (ATCC 53073) a obsahuje bp7698 až bp8572 a ENV5 byl získán expresí při použití plasmidu pENV5 (ATCC 53074) a obsahuje oblast LAV od bp5889 do bp 7698. Produkce rekombinantních složených bílkovin byla popsána v US patentovém spisu č. 721237.

Syntetické peptidy

Peptidy I (29) a VIII (100-2-2) byly sestaveny na benzhydrylamínové pryskyřici (Applied Biosystems Inc., Foster City, California). Benzhydrylamín je na polystyren/divinylbenzenovém nosiči. Peptid V (177) byl sestaven na terc. butoxykarbonyl (Boc)-ethylbenzylcystein-fenylacetamidomethyl (PAM)-polystyrendivinylkenzenové pryskyřici. Symetrické vazby anhydridu byly prováděny v Applied Biosystems 430 A zařízení. Cystein byl přidán v případě obou peptidů jako první zbytek.

Dicyklohexylkarbodiimidové vazby za přítomnosti hydroxybenzyltriazolu bylo užito pro asparagin a glutamin. Bylo užito ochrany postranního řetězce benzylovými skupinami a při použití Boc-alfaaminu. Další ochrana postranního řetězce, běžně užitá byla s použitím Boc(formyl)tryptofan, Bocmethioninsulfoxid, Boc(tosyl)arginin, Boc(methylbenzyl)cystein, Boc(tosyl)histidin, Boc(chlorbenzyloxykarbonyl)lysin a Boc(brombenzyloxykarbonyl)tyrocin.

V případě, že peptidy byly radioaktivně označeny, bylo toto značení provedeno acetylační zakončení, na němž se nachází aminoskupiny působením ^3H -octové kyseliny a přebytku dicyklohexylkarbodiimidu.

Odstranění ochranných skupin a odštěpení peptidu z pryskyřice bylo provedeno podle shora uvedené publikace Tama a dalších. Extrakce z pryskyřice byla prováděna 5% kyselinou octovou a extrakt byl podroben filtraci na gelu v 5% kyselině octové.

Syntetickými peptidy, které byly testovány na reaktivitu proti monoklonálním protilátkám byly peptidy 29, 36 a 39. Pro peptid 20 je kódem genomová oblast LAV_{BRU} od bp6688 do bp6750, pro peptid 36 je kódem oblast od bp7246 do bp7317 a pro peptid 39 je kódem oblast od bp7516 do bp7593. Peptidy 36 a 39 jsou podrobně popsány v US patentovém spisu č. 4629783.

Blokující peptidy IX až XV byly sestaveny v podstatě také shora uvedeným způsobem na methylbenzhydrylamín-polystyren-divinylbenzenové pryskyřici (Applied Biosystems Inc., Foster City, California). Symetrické vazby anhydridu byly provedeny na zařízení Applied Biosystems 430A syntetizer. Pro asparagin bylo užito dicyklohexylkarbodiimidové vazby za přítomnosti hydroxybenzotriazolu. V případě nutnosti ochranných skupin byly užity skupiny, jejichž základem je benzylová skupina a Boc-alfa-aminoskupina, kdežto v případě postranních řetězců s obsahem tyrosinu byl užit Boc(brombenzyloxykarbonyl). Acetylace byla v případě potřeby prováděna při použití anhydridu kyseliny octové nebo ledové kyseliny octové a dicyklohexylkarbodiimidu. Odstranění ochranných skupin z peptidu a peptidu z pryskyřice bylo prováděno podle shora uvedené publikace Stewarta a dalších. Extrakce z pryskyřice byla prováděna 50% kyselinou octovou a extrakt byl pak podroben filtraci na gelu ve 20% kyselině octové. Podle potřeby byla prováděna vysokotlaká kapalinová chromatografie na sloupci Vydac C18 (Rainin Instrument Co., Emeryville, California) při použití 0,1% kyseliny trifluorocetové a gradientu acetonitrilu.

Immunoblotové reakce

Tyto zkoušky byly prováděny při použití supernatantu klonů nebo ascitického výpotku a čištěného viru LAV a rekombinantních složených bílkovin jako antigenu. Antigeny byly nejprve odděleny elektroforézou na gelu s akrylamidovým gradientem (7,0 až 15,0 %) a pak byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu (NCM) elektroforézou, trvající 4 hodiny při 25 V ve 25 mM fosforečnanu sodném o pH 7,0. Po přenosu byla NCM blokována k zábraně nespecifických reakcí inkubací ve PBS-Tween nebo Blotto (5% netučné sušené mléko v PBS) hodinu při teplotě místnosti. Pak byla NCM inkubována se supernatantem buněčné kultury nebo

s ascitickou kapalinou, zředěnou v PBS-Tween hodinu při teplotě místnosti a pak byla třikrát promyta vždy čerstvým PBS-Tween. Ve druhém stupni byla NCM inkubována s kozí protilátkou proti myšimu IgG, vázanou na peroxidázu z křenu, ředěnou v PBS-Tween hodinu při teplotě místnosti. Po této inkubaci následovalo promytí PBS-Tween a pak ponoření do vyvíjecího roztoku pro peroxidázu (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California) 20 minut. Reakce pak byla zastavena ponořením do deionizované vody. Reaktivita monoklonální protilátky byla srovnávána s pozitivním kontrolním sérem, které bylo reaktivní vůči čištěnému rozrušenému viru nebo proti složené bílkovině, získané expresí. Výsledky ukazují, že veškeré protilátky se vážaly na gp110 a na jeho prekursor, gp150 při použití rozrušeného viru. Protilátky 110-1 a 110-2 rovněž rozeznávaly složenou bílkovinu ENV3, kdežto protilátky 110-3, 110-4, 110-5 a 110-6 vytvářely komplex s bílkovinou ENV2.

Imunoprecipitace

Virové extrakty pro radioimunologickou precipitaci byly připraveny z buněk CEM, infikovaných LAV_{BRU} izolátem HIV, adaptovaným kontinuálním pasážováním na lytický růst. Jakmile byly zjevné první známky cytopathického účinku, byly buňky přeneseny do značícího prostředí s obsahem ³⁵S-methioninu (0,05 mCi/ml) nebo ³H-glukosaminu (0,025 mCi/ml) a pak byly inkubovány 24 hodin. Do této doby se většina buněk rozpustila a virus byl uvolněn do supernatantu kultury. Pak byl virus peletován odstředěním 1 hodinu při 100000 g z bezbuněčného supernatantu a byly připraveny extrakty v pufru P-RIPA (roztok chloridu sodného s fosfátovým pufrům s obsahem 1,0 % Tritonu X-100, 1,0 % deoxycholátu, 0,1 % SDS a 1 % Aprotininu). Podobné extrakty byly připraveny i ze supernatantu neinfikovaných buněk CEM.

Imunoprecipitační zkoušky byly prováděny se 100 μ l extraktu viru, inkubovaného se 100 μ l supernatantu hybridních buněčných linií hodinu v ledu. Pak bylo ke každému vzorku přidáno 4 μ l králíčího séra proti myšimu IgG (Zymed Laboratories, San Francisco, California) a směs byla inkubována ještě 30 minut. Pak byl ke každému vzorku přidán imunoprecipitin (100 μ l, Bethesda Research Laboratory, Bethesda, Maryland) v suspenzi v P-RIPA-pufru a obsahem 1,0 % vaječného albuminu a směs byla inkubována dalších 30 minut. Pak byl vázaný komplex promyt a oddělen elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu (15,0 % akrylamidu, gel DATD). Po elektroforéze byly gely fixovány, máčeny v Enhance (New England Nuclear, Boston, MA), usušeny a vystaveny filmu Kodak XR-5. Referenční pozitivní sérum, které se imunologicky sráželo se všemi bílkovinami viru HIV bylo uvedeno do reakce s buňkami CEM, infikovanými virem a jiným virem jako pozitivní a negativní kontroly.

Výsledky prokázaly, že všech šest monoklonálních protilátek bylo specifických pro gp110 a gp150 a srážely oba tyto materiály.

Imunoadsorpcní zkoušky s vázaným enzymem

Aby bylo možno zjistit epitopy gp110, rozeznávané monoklonálními protilátkami, získanými způsobem podle vynálezu z hybridních buněk nebo z ascitické tekutiny, byly tyto látky dále charakterizovány svou reaktivitou při použití systému ELISA a složených bílkovin, získaných biologickou expresí a při použití syntetických peptidů. Bylo užito stejných postupů jako shora s tím rozdílem, že složené bílkoviny nebo syntetické peptidy byly užity místo čištěného viru jako antigeny, adsorbované na mikrotitrační plotny.

V případě, že byly užity jako antigeny peptidy, byl lyofilizovaný peptid rozpuštěn v 6M roztoku guanidinu v kyselině chlorovodíkové. Před nanesením na mikrotitrační plotny byl roztok guanidinu zředěn na konečnou koncentraci peptidu 100 μ g/ml 0,05 M uhličitavým a hydrogenuhličitavým pufrům o pH 9,6. Pak bylo 50 μ l roztoku peptidu uloženo vždy do jednoho vyhloubení mikrotitrační plotny a plotny pak byly inkubovány přes noc při teplotě 4 °C. Přebytečný roztok peptidu byl odstraněn, plotny byly blokovány prostředkem Blotto a dále byl ukončen celý postup tak, jak je to obvyklé při použití systému ELISA. Obdobně byla rekombinantní bílkovina zředěna na konečnou koncentraci 2 μ g/ml v 0,05 pufru s uhličitavem a hydrogenuhličitavem o pH 9,6 před provedením vlastního postupu.

Výsledky jsou uvedeny v Tabulce II. Monoklonální protilátky, produkované buňkami

liniemi HIV gp110-1 a HIV gp110-2 byly uvedeny do reakce s ENV3, ENV5, peptidem 36 a rozrušeným virem. Protilátky z buněčných linií HIV-gp110-3, HIV-gp110-4, HIV-gp-110-5 a HIV-gp110-6 byly uvedeny do reakce s ENV2 a s peptidem 29 a také s rozrušeným virem.

Tabulka II

Použití systému ELISA ke stanovení reaktivity monoklonálních protilátek s rekombinantními bílkovinami a syntetickými peptidy

	Rekombinantní složená bílkovina				Syntetický peptid			LAV	CEM
	ENV2	ENV3	ENV4	ENV5	29	36	39	kontrola	kontrola
110-1	0,077	3,000	0,113	3,000	ND	2,421	0,054	0,908	0,125
110-2	0,003	3,000	0,000	3,000	ND	2,305	-0,005	1,214	0,009
110-3	3,000	0,011	ND	ND	3,000	ND	0,017	0,363	0,046
110-4	3,000	0,020	ND	ND	3,000	ND	0,016	0,383	0,067
110-5	3,000	0,014	ND	ND	3,000	ND	0,016	0,368	0,025
110-6	3,000	0,033	ND	ND	1,937	ND	0,017	0,468	0,032

Výsledky z tabulky II ukazují, že monoklonální protilátky 110-2 a 110-1 rozeznávají anigenní determinantu, pro niž je kódem sled DNA v oblasti pENV3, zejména oblasti genomu viru HIV, která je definována sledem aminokyselin, který odpovídá peptidu 36. To znamená, že se monoklonální protilátky gp110-1 a gp110-2 váží na oblast peptidu gp110, pro niž je kódem oblast v rozmezí bp7246 až bp7317, jak je možno prokázat tvorbou imunologického komplexu s peptidem 36 a s ENV3. Tato oblast genomu viru HIV byla dříve považována za poměrně konservativní, tj. bylo předpokládáno jen malé množství změn ve sledu DNA, která je kódem pro peptid 36 v různých izolátech viru z různých zeměpisných oblastí, jak bylo popsáno v publikaci Starcich a další, Cell 46: 637 (1986). Na rozdíl od této skutečnosti se váží monoklonální protilátka gp110-3, -4, -5 a -6 na peptidy viru HIV, identifikované oblastmi, které jsou kódem pro peptid 29, tj. od bp6688 do bp6750. Oblast gp110, definovaná peptidem 29 zřejmě obsahuje několik nukleotidových substitucí v různých izolátech viru. Monoklonální protilátky, které se specificky váží na gp-polypeptidy, které obsahují konservované epitopy například protilátky 110-1 a 110-2 mohou mít zvýšenou použitelnost v různých okolnostech, například při afinitní chromatografii a podobně. Také při stanoveních pomocí systému ELISA reagoval peptid 110-2-2 se sérem jednotlivce, z něhož byl izolován izolát viru LAV-2.

Zkouška nepřímou imunofluorescencí

Nepřímá imunofluorescence při použití monoklonálních protilátek proti antigenu gp110 viru HIV byla prováděna na acetonem fixovaných a na živých buňkách. Acetonem fixované buňky na podložním sklíčku, připravené z buněk CEM, infikovaných izolátem LAV byly inkubovány se zředěným supernatantem kultury nebo s ascitickou tekutinou hodinu při teplotě 37 °C, kdežto živé buňky byly inkubovány se supernatantem kultury nebo s ascitickou tekutinou hodinu při teplotě 4 °C před uložením buněk na podložní sklíčko a před jejich fixací acetonem. Oba postupy spočívaly v použití fluoresceinisothiokyanátem značené protilátky proti myším IgG pro detekci buněk, nesoucích reaktivní antigen gp110. Monoklonální protilátka HIV-gp110-1 poskytuje pozitivní výsledky při použití buněk, infikovaných izolátem LAV, a to jak živých, tak fixovaných acetonem.

Příklad 2

Neutralizace infekivity viru HIV monoklonálními protilátkami anti-gp110

V tomto příkladu se popisuje a charakterizuje neutralizace infekivity HIV použitím monoklonálních protilátek, které se váží na gp110 a na peptidy v oblasti gp110. Výsledky ukazují, že monoklonální protilátky gp-110-3, -4, -5 a -6 mají neutralizační účinek a že zvláště protilátka gp-110-3 a gp-110-4 mají vysokou úroveň tohoto účinku.

Neutralizační zkoušky

Byla vyvinuta citlivá neutralizační zkouška s možností kvantitativně stanovit účinek

monoklonálních protilátek na infektivní viru HIV. Jako cílové buňky byly zvoleny buňky CEM, na nich pak bylo prováděno srovnání. Ascitická tekutina byla připravena způsobem, uvedeným v příkladu 1, nebo bylo užito frakce IgG, čištěné srážením síranem amonným, následovala inaktivace 30 minut při teplotě 56 °C a pak ředění podle potřeby prostředím RPMI s obsahem 10% fetálního telecího séra. Suspenze kmene HIV, izolátu LAV_{BRU} byla získána ze čtyři dny staré kultury CEM v růstové log-fázi po filtraci filtrem s průměrem otvorů 0,2 až 0,45 μm , po rozdělení na podíly a zmrazení na teplotu -70 °C. Jeden podíl byl zahřát za roztátí a titrován ke stanovení TCID₅₀, následující zkoušky byly provedeny s čerstvě roztátným materiálem, zředěným na 1 : 500 živným prostředím za dosažení koncentrace, přibližně rovné desateronásobku množství, jehož je zapotřebí k infekci 50 % buněk CEM v kultuře (10 x TCID₅₀). Suspenze viru byla smíšena se stejným objemem (250 μl) roztoku monoklonální protilátky při pětinasobném postupném ředění 1 : 5, 1 : 9, 1 : 765, 1 : 625. Směs viru a protilátky byla inkubována 45 minut při teplotě 37 °C a pak bylo ředění opět zvětšeno a směs byla znovu inkubována 45 minut při teplotě 37 °C, načež byly vzorky, znovu zředěné na polovinu užity k naočkování vyhloubení mikrotitračních ploten, obsahujících přibližně 2×10^5 buněk CEM na vyhloubení v objemu 1,0 ml. Pak byly kultury inkubovány při teplotě 37 °C ve vlhkém ovzduší s obsahem 50 oxidu uhličitého celkem 14 dní, načež byly odděleny, peletovány a rozrušeny působením 1% Tritonu-X-100 v PBS za dobu 10 minut. Množství viru nebo virového antigenu, přítomného v rozrušených buňkách bylo kvantitativně stanoveno při použití citlivého antigenu HIV, vázaného na enzym. Titr neutralizační účinnosti byl v případě, že bylo možno jej prokázat, stanoven jako převrácená hodnota ředění monoklonální protilátky, která vede k inhibici produkce antigenu na více než 50 % v kulturách inkubovaných bez protilátky nebo s monoklonální protilátkou téhož isotypu, která před tímto opatřením neměla neutralizační účinek.

Shora uvedené zkoušky s antigenem HIV byly provedeny s dvěma monoklonálními protilátkami, které byly specifické pro p25. Příslušné buněčné linie hybridomu byly získány shora uvedeným způsobem s malými modifikacemi včetně čištění složené bílkoviny gag jako imunogenu a s charakterizací výsledné monoklonální protilátky s ohledem na její specifitnost a reaktivitu použitím rekombinantní složené bílkoviny, předem označené GAG-1, GAG-2 a GAG-3 a syntetického peptidu 141. Bílkovina GAG-1 se získá expresí plasmidu pGAG-1 (ATCC 53379), bílkovina GAG-2 se získá expresí plasmidu pGAG-2 (ATCC 53111) a GAG-3 se získá expresí z pGAG-3 (ATCC 53112). Produkce rekombinantní složené bílkoviny je popsána v US patentovém spisu č. 764 460 a 828 828. Kódem pro syntetický peptid 141 je genomová oblast LAV_{BRU}, která odpovídá zbytkům aminokyselin 198-242. Monoklonální protilátky, produkované buněčnou linií hybridomu p25-2 a p25-3 jsou reaktivní vzhledem k rekombinantním složeným bílkovinám GAG-1, GAG-2 a GAG-3 a monoklonální protilátky p25-3 jsou reaktivní rovněž vzhledem k syntetickému peptidu 141.

Aby bylo možno provést zkoušku na vazbu antigenu, byly jednotlivé reakční složky nejprve navázány na pevnou podložku. Ascitická kapalina, získaná použitím buněk hybridomu, linií p25-2 a p25-3 byla zředěna v poměru 1 : 5000 ve 25 mM Tris pufru a pH 8,5 a 200 μl takto získaného materiálu bylo uloženo do jednotlivých vyhloubení mikrotitračních ploten. Pak byla vyhloubení uzavřena a inkubována 16 hodin při teplotě 4 °C. Roztok pak byl z vyhloubení odstraněn a byl přidán blokující roztok Blotto (0,3 %) v PBS. Blokování trvalo 15 minut při teplotě místnosti. Blokující roztok pak byl odstraněn odsátím a byl přidán vzorek. Do každého vyhloubení bylo přidáno 200 μl rozrušené buněčné suspenze a 5,0 μl konjugátu, připraveného shora uvedeným způsobem. Plotny byly inkubovány při teplotě 37 °C dvě hodiny a pak byla suspenze odsáta a vyhloubení byla 4x promyta pufr (0,05% Tween 20 v PBS). Konjugát byl připraven následujícím způsobem: Monoklonální protilátky p25-6 a p25-7 byly konjugovány s peroxidázou z křenu (HRP) v molárním poměru 3 : 1 (Ab : HRP) celkem tři hodiny při použití oxidace jodistanem způsobem podle publikace Nakane a další, J. Histochem. Cytochem. 22: 1084 (1974). Konjugáty byly zředěny v poměru 1 : 1500 odtučněným sušeným mlékem o koncentraci 2,5 %, 0,01% thimerosalem a 0,005% prostředkem Antifoam A ve 20 mM citronanu sodného. Zbytek postupu s použitím systému ELISA byl proveden stejně

jako v příkladu 1.

Výsledky pokusů s neutralizací pomocí protilátek gp-110-3, -4, -5 a -6 jsou následující. Nejvyšší titry se zachováním neutralizační účinnosti byly tyto: gp-110-3 = 15,625, gp-110-4 = 9,765,652, gp-110-5 = 125 a gp-110-6 = 625.

Vzhledem k předpokládané genetické variabilitě oblasti, definované peptidem 29 byla zkoumána schopnost monoklonální protilátky gp-110-4 rozeznávat jiné izoláty viru HIV. Byly provedeny imunofluorescenční zkoušky shora uvedeným způsobem. Protilátka gp-110-4 byla schopna rozeznat antigen v kulturách alespoň tří ze 16 izolátů viru HIV, které byly podrobeny zkouškám.

Protilátka gp-110-4 byla schopna neutralizovat viry, izolované v průběhu 15 týdnů ze šimpanzů, naočkovaných izolátem LAV_{BRU} jako kontrolních zvířat při pokusu s vakcínou proti AIDS. Monoklonální protilátka byla schopna neutralizovat izoláty přesto, že zvíře mělo sérové protilátky, které neutralizovaly HIV in vitro a přesto, že zvíře vyvinulo měřitelnou buněčně zprostředkovanou imunologickou odpověď proti infekci HIV. Tato skutečnost prokazuje nepřítomnost posunu antigenu in vivo pro epitop, rozeznávaný protilátkou gp-110-4.

Příklad 3

Neutralizace infektivitu HIV směsí monoklonálních protilátek proti gp-110 a p-25

V tomto příkladu se popisuje neutralizace infektivitu HIV při použití monoklonálních protilátek, které se váží na gp110 a na peptidy v oblasti gp110 v kombinaci s monoklonálními protilátkami, které se váží na p25 a na peptidy v této oblasti, které jako takové mají malou nebo žádnou neutralizační účinnost. Výsledky ukazují, že monoklonální protilátky gp-110-2 v kombinaci s p25-6 nebo p25-7 mají zvláště vysokou hladinu neutralizační účinnosti.

Buněčné linie hybridomu p25-6 a p25-7 byly získány shora uvedeným způsobem s modifikacemi, které zahrnují použití inaktivovaného rozrušeného viru nebo čištěné Gag rekombinantní složené bílkoviny, získané expresí v E. coli jako imunogenu s následnou charakterizací výsledných monoklonálních protilátek na specifičnost a reaktivitu při použití rekombinantních složených bílkovin, označených GAG-1, GAG-2 a GAG-3 a syntetických peptidů 15, 88, 150, 147 a 148. Syntetické peptidy jsou zakódovány v oblasti genomu LAV_{BRU}, odpovídající následujícím zbytkům aminokyselin:

peptid 15 - zbytky aminokyselin 329 až 350,
 peptid 88 - zbytky aminokyselin 315 až 350,
 peptid 150 - zbytky aminokyselin 318 až 363,
 peptid 147 - zbytky aminokyselin 278 až 319 a
 peptid 148 - zbytky aminokyselin 290 až 319.

Monoklonální protilátky, produkované buňkami buněčné linie hybridomu p25-6 a p25-7 jsou reaktivní vzhledem k bílkovině GAG-3, protilátky buněčné linie p25-6 reagují k syntetickým peptidům 147 a 148 a p25-7 je reaktivní k syntetickým peptidům 15, 88 a 150.

Neutralizační pokusy byly prováděny shora uvedeným způsobem až na to, že v případě, že bylo užito směsí, byly jednotlivé monoklonální protilátky nejprve zředěny v poměru 1 : 5 živným prostředím a pak smíseny ve stejných poměrech do konečného ředění 1 : 10. Zbytek zkoušky byl prováděn shora uvedeným způsobem.

Monoklonální protilátky gp110-2, p25-6 a p25-7 neutralizují antigen na méně než 50 % v případě, že jsou užity jako takové. V případě, že se užije směs monoklonální protilátky gp110-2 s p25-6 nebo s p25-7 v ředění 1 : 10, dojde k úplné neutralizaci. V případě, že se užije směs, obsahující monoklonální protilátky p25-6 a p25-7, je neutralizační účinek 60 až 90 %.

Příklad 4

Imunologická účinnost peptidu 29 a jeho homologů

Schopnost peptidu 29 a homologních peptidů včetně peptidů 177 stimulovat imunologickou odpověď proti HIV byla zkoumána na dvou kmenech myši. Postup výroby imunogenních peptidů, imunizace a hodnocení imunologické odpovědi bude dále uvedeno.

Peptid 29 byl připraven pro imunizaci konjugací s čištěným thyreoglobulinem. Thyreoglobulin může být pro konjugaci užit ve formě derivátu s N-sukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylátem způsobem, popsáným v US patentovém spisu č. 4 629 783, sloupec 10, ř. 28 až 51. Jako druhý imunogen byl thyreoglobulin užit jako derivát s glutaraldehydem následujícím způsobem. 27 mg thyreoglobulinu vepře bylo rozpuštěno v 1 ml, 0,1M hydrogenuhličitanu sodného, k němuž bylo po kapkách přidáno 8,3 μ l, 25% roztoku glutaraldehydu a směs byla míchána přes noc při teplotě místnosti. Pak byl přidán 1 ml pufu s uhličitanem a hydrogenuhličitanem sodným o pH 9,3 a roztok byl 8 hodin dialyzován proti dvěma litrům téhož pufu při teplotě 4 °C s úplnou výměnou dialyzátu po 4 hodinách. Pak byl k derivátu thyreoglobulinu přidán peptid 29 v přebytku přibližně 100M a směs byla míchána přes noc při teplotě místnosti. Nezareagovaný glutaraldehyd byl blokován 200 μ l roztoku lysinu s koncentrací 0,2M mícháním směsi několik hodin nebo přes noc při teplotě místnosti. Konjugát peptidu a thyreoglobulinu byl pak důkladně dialyzován proti PBS při teplotě 4 °C.

Dva kmeny myši, C57 (černé) a BALB/c byly očkovány peptidem, připraveným konjugací. Na počátku očkování byla užitá zvířata ve stáří 2 až 4 týdny. Zvířata byla očkována intranasálně, intraperitoneálně, do odstraněné pokožky ocasu, podkožně nebo do tlapy. Očkovací materiál sestává z 25 μ g konjugovaného peptidu v suspenzi v 0,5 ml úplného Freundova pomocného činidla, další očkování bylo provedeno za 2, 3 a 5 týdnů při použití téhož materiálu až na to, že bylo užití neúplného Freundova pomocného prostředku. Vzorky séra od jednotlivých myši byly odebrány před imunizací, 4 dny po imunizaci po 3 týdnech a 4 dny po konečné imunizaci po 5 týdnech. Vzorky séra byly analyzovány na protilátky proti homologním peptidům nebo proti celému viru systémem ELISA. Séra, která obsahovala účinné protilátky proti LAV byla dále sledována na neutralizační účinnost a imunoblotovou reakcí s antigenem rozrušeného LAV a radioimunoprecipitací s radioaktivně značeným gp110.

Výsledky imunizace ukazují, že myši, imunizované peptidem 29 produkovaly protilátky, které reagovaly s peptidem 29 a s rozrušeným virem LAV-1 při použití systému ELISA. Konjugací peptidu 29 s glutaraldehydem bylo možno dosáhnout vyššího titru protilátek proti peptidu 29 u myši Balb/c, přestože u některých těchto myši bylo možno vyvolat tvorbu těchto protilátek i konjugací s imidem kyseliny maleinové. Myši, imunizované peptidem 177 produkovaly protilátky proti tomuto peptidu, konjugace peptidu 177 s glutaraldehydem však vyvolává dokonalejší imunologickou odpověď. Myši C57 byly citlivější na imunologický popud po vstříknutí peptidu 177 než myši Balb/c. Myši, imunizované peptidem 110-2-2 izolátu LAV-2 produkovaly protilátky proti peptidu 110-2-2 a viru LAV-2, jak bylo možno prokázat zkouškou ELISA. Peptid 110-2-2, konjugovaný s glutaraldehydem byl imunogenní u myši C57 a Balb/c, přestože titry protilátek proti peptidu 110-2-2 byly obvykle vyšší u myši Balb/c než u myši C57, kdežto titry pro virus LAV-2 byly obvykle vyšší u myši C57 než u myši Balb/c.

Vzorky séra z imunizovaných myši, které

- i) obsahují protilátky proti celému viru,
 - ii) jsou schopné neutralizovat virus HIV, například při zkouškách, uvedených v příkladu 2 a
 - iii) reagují s peptidem 29 při zkoušce ELISA,
- prokazují účinnost použití peptidu 29 ve formě vakcíny.

Příklad 5

Imunoafinitní dělení gp110 při použití monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky proti antigenu gp110 HIV je možno užit při imunoafinitním dělení za získání v podstatě čistých rekombinantních složených bílkovin, vzniklých bakteriální expresí. V případě, že bílkovina jako produkt exprese je bakterií vylučována, je mož-

no ji izolovat ze supernatantu kultury. V případě, že vylučována není, může být zapotřebí rozrušit bakteriální buňky.

Konstrukce plasmidu pENV-5 (ATCC č. 53074) je popsána v US patentové přihlášce č. 721 237. Tento plasmid obsahuje kód pro větší část karboxylového zakončení gp110 a pro část zakončení gp41, s obsahem aminoskupiny izolátu LAV, tyto kódy jsou včleněny do vektoru trp pro expresi. E. coli C600 je tímto vektorem transformována, takže dochází k expresi, avšak nikoliv k vylučování složené bílkoviny gp110.

E. coli C600 s obsahem plasmidu pENV-5 se pěstuje v prostředí, které obsahuje 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tryptofanu a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilinu přes noc při teplotě 37 °C za provzdušňování. Získaná kultura se pak očkuje v poměru 1 : 100 do čerstvého minimálního živného prostředí, které obsahuje 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilinu, avšak nikoliv tryptofan. Tyto kultury se pak pěstují za provzdušňování 2 až 3 hodiny, tj. až do časně log fáze při teplotě 37 °C. Pak se přidá induktor, tj. kyselina 3-B-indolakrylová (Signa Chemical Co., St. Louis, MO) do konečné koncentrace 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ z čerstvě připravovaného zásobního roztoku této látky s obsahem 20 mg/ml v 95% ethanolu. Kultury po indukci se pak pěstují při teplotě 37 °C za provzdušňování 4 až 5 hodin, načež se peletují odstředěním a popřípadě zmrazí. Výtěžek bílkoviny z pENV-5 je obvykle nižší než 1 mg/l.

Peletované bakteriální buňky se rozruší při použití pufru p-RIPA (PBS s obsahem 1 % Triton X-100, 1 % deoxycholátu, 0,1 % dodecylsírany sodného a 1 % Aprotininu), po jehož přidání dojde k rozrušení buněk E. coli. Suspenzi je možno zpracovat ještě působením ultrazvuku k odstěpení DNA a RNA s následným odstředěním k oddělení pevného podílu. Pak ještě může být zapotřebí materiál zředit nebo zahustit k získání standardní koncentrace bílkoviny.

Monoklonální protilátka HIV-gp110-1 se na počátku vysráží z ascitické kapaliny nebo ze supernatantu buněčné kultury při teplotě místnosti nebo ve chladu použitím síranu amonného nebo síranu sodného, roztoky jsou upraveny pufrům na pH 7,3 a užívají se do konečného nasycení 33 % v případě síranu amonného a 18 % v případě síranu sodného. Vysrážená bílkovina se oddělí odstředěním, znovu se rozpustí v PBS a znovu sráží přidáním 33 % síranu amonného nebo 12 až 15 % síranu sodného. Tento postup je možno v případě potřeby opakovat. Pak se bílkovina znovu rozpustí v PBS a přebytek solí se odstraní filtrací na gelu nebo dialýzou proti PBS.

Čištěnou monoklonální protilátku 110-1 je pak možno navázat na Sepharosu, aktivovanou bromkyanem. Potřebné množství gelu se nechá nabobtnat v 10^{-3} M kyselině chlorovodíkové na skleněném filtru (1 g lyofilizovaného materiálu poskytuje přibližně 3,5 ml výsledného objemu gelu), 15 minut se promývá týmž roztokem a pak se ihned přidá protilátka. K vazbě obvykle lépe dochází při pH v rozmezí 8 až 10, je však možno užít nižšího pH v případě, že je to nutné pro stálost protilátky. Protilátka může být rozpuštěna v PBS nebo v uhličitánovém a hydrogenuhličitánovém nebo boritanovém pufru se 150 mM chloridem sodným s vysokou iontovou silou. Aktivovaná sepharosa a protilátka v suspenzi se opatrně míchá 2 až 4 hodiny při teplotě místnosti nebo přes noc při teplotě 4 °C a pak se promyje na skleněné fritě pufrům. Jakékoliv zbývající aktivní skupiny se blokují působením 1,0 M ethanolaminu při pH 8 celkem 2 hodiny. Výsledná sepharosa s navázanou protilátkou se pak střídavě promývá roztokem pufru s vysokým a nízkým pH (boritanový pufr 0,1 M o pH 8,5, 1 M NaCl a acetátový pufr, 0,1 M o pH 4,0 a 1 M NaCl) čtyřikrát nebo pětkrát. Tímto promýváním se odstraní stopy nekovalently vázaného materiálu. Pak se hotová matrice pro imunoafinitní dělení skladuje při teplotě vyšší než 8 °C za přítomnosti vhodné bakteriostatické látky, například 0,01% azidu.

Přidáním bílkoviny, získané expresí ve formě suspenze ke shora uvedené matici má za následek selektivní odstranění antigenu gp110. Směs se ponechá 2 až 24 hodin, s výhodou 12 až 18 hodin ve styku s maticí za pomalého míchání nebo třepání. Je také možno užít sloupce, do něhož se matrice uloží a pak se suspenze bílkoviny nechá pomalu sloupcem protékat. Jakmile dojde k úplnému přidání kapaliny do sloupce, je zapotřebí průtok kapaliny sloupcem zastavit, aby bylo možno dosáhnout co nejvyšší tvorby imunologického komplexu.

Nenavázaný materiál se vymyje důkladným promytím sloupce adsorpčním pufrům. Může být

užito i odsávání. Pak se navázaný materiál vymývá při použití pufru s nízkým nebo vysokým pH, například octanovým pufrem o pH 4,0 nebo boritanovým pufrem o pH 8,56 nebo chaotropním činidlem.

Příklad 6

Imunoafinitní čištění rekombinantního gp110 ze ssavčího systému pro expresi

Monoklonální protilátky, získané způsobem podle vynálezu je možno užít při čištění rekombinantní složené bílkoviny gp110, k jejíž expresi došlo v buňkách savců. Buňky savců se infikují rekombinantním virem planých neštovic podle publikace Mackett a další, J. Virol. 49: 857 (1984), který obsahuje sledy, které jsou kódem pro alespoň část bílkoviny gp110, která je antigenně účinná a vyvolává tvorbu neutralizačních protilátek.

Rekombinantní virus planých neštovic se získá způsobem podle US patentové přihlášky č. 842 984. Postupuje se tak, že se sled, který je kódem pro obalový glykoprotein viru HIV včlení do vektoru, kterým je plasmid pGS20 směrem dolů od řídicího úseku pro stranskripci viru planých neštovic. Tento chimérický gel má na svých okrajích sledy, které jsou kódem pro virovou thymidinkinázu (TK) kinásu.

Chimérické vektory s obsahem promotoru viru planých neštovic navázané na gen pro obalové části LAV byly užity k transformaci E. coli kmen MC1000. Včlenění chimérického sledu LAV-env do genomu viru planých neštovic bylo dosaženo rekombinací in vivo a bylo umožněno skutečností, že chimérické geny v plasmidech pv-env5 jsou ohraničeny sledem viru planých neštovic, který je kódem pro TK. Tento plasmid se pak včlení do buněk, předem infikovaných divokým typem viru planých neštovic a k rekombinaci dochází mezi sledem TK plasmidu a homologním sledem v genomu viru planých neštovic, čímž dojde k včlenění chimérického genu. Jako hostitelských buněk pro dosažení exprese bylo užito ledvinných buněk afrických opic (kmen BSC-40) buněčná linie, odvozená od imortalizovaných buněk BSC-1, uložených ve sbírce ATCC pod číslem CCL26.

Souvislá vrstva buněk BSC-40 se infikuje deseti rekombinantními viry planých neštovic. Infekce trvá 12 hodin, pak se buňky izolují, promyjí se PBS a oddělí odstředěním. Takto získané pelety buněk se znovu uvedou do suspenze v pufre pro rozrušení buněk, (1,0 % NP 40, 2,5 % deoxycholátu sodného, 0,1 M chloridu sodného, 0,01 M tris-HCl o pH 7,4, 1 mM EDTA) a materiál s rozrušenými buňkami se pak vyčeří odstředěním. Imunoafinitní dělení rekombinantní složené bílkoviny po expresi se provádí shora uvedeným způsobem při použití monoklonální protilátky gp-110-1. Bílkoviny, produkované tímto systémem pro expresi jsou bližší přírodně produkovanému HIV gp110, protože k produkci a glykosilaci došlo v buňkách savců.

Příklad 7

Inhibice infekce HIV blokujícími peptidy

Účinnost blokujících peptidů při inhibici infekce buněk v tkáňových kulturách kmene LAV_{BRU} viru HIV byla studována při použití modifikace postupu, uvedeného pro vyhodnocení peptidu T podle shora uvedené publikace Pert a dalších. Výhodná inhibice HIV spočívá v tom, že se smísí stejné objemy blokujícího peptidu a buněk CEM v množství $2,5 \times 10^5$ v prostředí RPMI s obsahem 10 % FCS a 2 mg/ml polybrenu a směs se inkubuje 45 minut při teplotě 37 °C. Pak se přidá virus v různých dávkách, a to 10, 50, nebo 500 TCID₅₀, směs se inkubuje 14 dnů při teplotě 37 °C a pak se supernatant zkoumá na produkci virového antigenu například p25.

Předběžná inkubace buněk CEM s peptidy před přidáním viru do kultury napomáhá inhibičnímu účinku. Inhibice je závislá na dávce viru, je dostatečně silná při nízkých a středních dávkách, zřejmě však nedostačuje při nejvyšších dávkách viru.

Přibližně 60% až 90% inhibice produkce virového antigenu bylo možno dosáhnout při nízkých dávkách viru při použití peptidu T. Další pokusy s peptidy X - XV s amidovaným karboxylovým zakončením a acetylovanou koncovou aminoskupinou poskytovaly podobné výsledky,

příčemž peptid XI byl zvláště účinný v širokém rozmezí dávek. Neutralizační protilátky je možno přidat buď v průběhu předběžné inkubace nebo v době, kdy je přidáván virus za vzniku aditivní nebo synergické inhibice produkce virového antigenu.

Z toho, co bylo uvedeno, je zřejmé, že monoklonální protilátky a peptidy včetně blokujících peptidů mohou zajistit zlepšené postupy pro neutralizaci a/nebo inhibici infekcí virem HIV. To umožňuje snadné získání profilaktyckých a léčebných farmaceutických prostředků, účinných proti většině nebo proti všem kmenům HIV. Mimoto je možno nové materiály užít k diagnostickým a jiným známým postupům.

Přestože vynález byl popsán v souvislosti s výhodnými provedeními pro jasnost a srozumitelnost, je zřejmé, že je možno provést ještě různé změny a modifikace, spadající do oboru vynálezu.

V následující tabulce budou uvedeny údaje o mikroorganismech, které byly užity a jsou uvedeny v průběhu přihlášky.

Údaje o uložení mikroorganismu

Následující mikroorganismy byly uloženy ve sbírce ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA.

popis	laboratorní označení	číslo ATCC	datum uložení

myší hybridom			
(balb/c/NS-1)	HIV-gp 110-1	HB 9175	15. 8. 1986
"	HIV-gp 110-2	HB 9176	15. 8. 1986
"	HIV-gp 110-3	HB 9177	15. 8. 1986
"	HIV-gp 110-6	HB 9404	30. 4. 1987
"	HIV-gp 110-4	HB 9405	30. 4. 1987
"	HIV-gp 110-5	HB 9406	30. 4. 1987
"	HIV-p 25-2	HB 9407	30. 4. 1987
"	HIV-p 25-3	HB 9408	30. 4. 1987
"	HIV-p 25-6	HB 9409	30. 4. 1987
"	HIV-p 25-7	HB 9410	30. 4. 1987

Hybridomy HB 9175, HB 9176 a HB 9177 byly zkoušeny a byly životné 26. 8. 1986. Zbývající hybridomy byly zkoušeny a byly životné 4. 5. 1987.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Způsob výroby hybridomů pro produkci monoklonální protilátky proti viru HIV, vyznačující se tím, že se extrakt rozrušeného viru váže na nosič, například na lektin z čočky a získaný materiál se užije k imunizaci myší, jejichž B-lymfocyty ze sleziny se pak podrobí fúzi s NS-1 myelomatickými buňkami za vzniku hybridomu, živné prostředí, v němž se buňky hybridomu udržují se zkoumá na přítomnost protilátek a buňky, které produkují monoklonální protilátky, schopné reakce s determinantním antigenem obalového glykoproteinu gp110 viru HIV, obsaženým v blokujícím peptidu T nebo v jeho derivátu nebo analogu se dále pěstují.