



(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

**214 439 B**

(21) A bejelentés ügyszáma: 3707/87

(22) A bejelentés napja: 1987. 08. 19.

(30) Elsőbbségi adatok:

898,273 1986. 08. 20. US

045,026 1987. 05. 01. US

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

**C 12 P 21/08**

C 07 K 16/10

C 07 K 14/16

A 61 K 39/42

A 61 K 39/21

C 12 N 5/20

(40) A közzététel napja: 1988. 03. 28.

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1998. 03. 30.

(72) Feltalálók:

Cosand, Wesley L., Bothell, Washington (US)

Dickinson, Edna S., Seattle, Washington (US)

Gosting, Jarry H., Snohomish, Washington (US)

McClure, Janela, Vashon Island, Washington (US)

Nowinski, Robert C., Seattle, Washington (US)

Shriver, Mary Kathleen, Bellevue, Washington  
(US)

Thomas, Elaine K., Seattle, Washington (US)

Todoro, George J., Seattle, Washington (US)

(73) Szabadalmas:

Genetic Systems Corp., Seattle, Washington (US)

(74) Képviseelő:

ADVOPATENT Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) **Eljárás HIV-fertőzések kezelésére alkalmas monoklonális antitestek  
és peptidek, valamint ezeket tartalmazó  
gyógyászati készítmények és vakcinák előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás új, HIV fertőzés leküzdésére képes, a LAV 301–336 aminosavainak megfelelő HIV gp110 vagy gag p25 területen belüli semlegesítő epitoppal fajlagosan reaktív monoklonális antitestek, valamint az említett monoklonális antitesteket termelő sejtvonalak és a HIV semlegesítő epitopot magában foglaló HIV antigén determinánst meghatározó immunreaktív peptid előállítására. Kiterjed a találmány a HIV fertőzések kezelésére alkalmas gyógyászati készítmények illetőleg vakcinák előállítására is.

**HU 214 439 B**

A találmány tárgya eljárás új, HIV fertőzés leküzdésére képes, a LAV 301–336 aminosavainak megfelelő HIV gp10 vagy gag p25 területen belüli semlegesítő epitoppal fajlagosan reaktív monoklonális antitestek, valamint az említett monoklonális antitesteket termelő sejtvonalak és a HIV semlegesítő epitopot magában foglaló HIV antigén determináns meghatározó immunreaktív peptid előállítására. Kiterjed a találmány a HIV fertőzések kezelésére alkalmas gyógyászati készítmények illetve vakcinák előállítására is.

A szerzett immunhiányos szindrómáért (AIDS), ennek bevezető fázisaiért, az AIDS-sel kapcsolatos komplexért (ARC), valamint a limfadenopátia szindrómáért (LAS) felelős fertőző anyag egy új limfotróf retrovírus. A vírust sokféleképpen elnevezték már, így LAV-nak, HTLV-III-nek, ARV-nek, és legújabban HIV-nek.

Ahogy a HIV elterjedése járványos méreteket ér el, a fertőzött egyének kezelése és az átterjedés megelőzése nem fertőzött, de a fertőzés kockázatának kitett egyénekre kiemelkedő fontosságú. A különböző terápiás stratégiák irányulnak a vírus életciklusainak különböző fázisaira, ezeket Mitsuya és Broder körvonalazzák [Nature 325, 773 (1987)]. Az egyik megközelítés magában foglalja az olyan antitestek alkalmazását, amelyek a vírushoz kötődnek és gátolják a vírus replikációját vagy megzavarva a vírus belépését a gazdaszövetekbe, vagy más mechanizmus révén. Amikor az antitest beavatkozására fogékony vírus komponenset azonosítják, remélhető, hogy a vírus fertőzőképességének semlegesítésére alkalmas antitest titereket létre lehet hozni vakcinálással, vagy egy másik módszer szerint a kívánt fajlagosságú immunoglobulinok vagy monoklonális antitestek passzív beadásával.

A legtöbb retrovírus burok-glikoproteinjeiről úgy gondolják, hogy a fogékony sejtek felületén levő receptor-molekulákkal reagálnak, ezzel határozva meg a vírus fertőzőképességét bizonyos gazdaszervezetekre. Azok az antitestek, amelyek a glikoproteinekhez kötődnek, meggátolják a vírus kölcsönhatását a sejtreceptorokkal, a vírus fertőzőképességét semlegesítve. Ezzel kapcsolatban lásd az alábbi irodalmi helyeket: *The Molecular Biology of Tumor Viruses* (1973), (szerkesztő: Tooze J.), 534. oldal; és *RNA Tumor Viruses* (1982) (szerkesztők: Weiss R. és munkatársai), 226–236. oldal; mindkét irodalmi helyet referenciaként teljes egészében beépítjük ebbe a bejelentésbe. További irodalmi helyek a fenti témával kapcsolatban: Gonzalez–Scarano és munkatársai: *Virology*, 120, 42 (1982) (La Crosse vírus); Matsuno és Inouye: *Infect. Immun.* 39, 155 (1983) (Újszülött borjú hasmenés vírusa); és Mathews és munkatársai: *J. Immunol.* 129, 2763 (1982) (Enkefalomielitisz vírusa).

A HIV általános szerkezete egy ribonukleoprotein mag szerkezet lipid-tartalmú burokkal körülvéve, amelyet a vírus a csírázás során szerez meg a fertőzött gazdaszövet membránjából. A vírus-kódolt glikoproteinek a burokba beágyazva és kifelé kiugorva vannak. A HIV burok-glikoproteinjei kezdetben a fertőzött sejtben szintetizálódnak 150 000–160 000 dalton molekulatömegű prekurzorként (gp150 vagy gp160), amely azután a sejtben feldolgozódik 110 000–120 000 dalton molekulatömegű

N-terminális fragmentummá (gp110 vagy gp120), hogy a külső glikoprotein kialakuljon, és egy 41 000–46 000 daltonos C-terminális fragmentummá (gp41), amely a transzmembrán burok-glikoproteint képviseli.

- 5 A fentebb tárgyalt okokból a HIV gp110 glikoproteinje sok kutatás tárgya, mivel ez lehetséges célpont a vírus életciklusának megszakításához. A HIV-vel fertőzött egyénekből nyert szérumból kimutatták, hogy semlegesíti a HIV-t in vitro, és olyan antitestek vannak jelen a szérumban, amelyek kötődnek a tisztított gp110-hez [Robert–Guroff és munkatársai: *Nature*, 316, 72 (1985); Weiss és munkatársai: *Nature*, 316, 69 (1985); és Mathews és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9709 (1986)]. A tisztított és rekombináns gp110 stimulálta a semlegesítő szérum antitestek képződését, amikor állatok immunizálásához alkalmazták [Robey és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 7023 (1986); Lasky és munkatársai: *Science*, 233, 209 (1986); és egy humán eredmény: Zagury és munkatársai: *Nature*, 326, 249 (1986)]. Kimutatták a gp110 molekula kötődését a CD4(T4) receptorhoz is, és azokról a monoklonális antitestekről, amelyek felismerik a CD4 receptor bizonyos epitópjait, kimutatták, hogy meggátolják a HIV kötődését, a szincitium kialakulását és a fertőzőképességet [McDougal és munkatársai: *Science* 231, 382 (1986)]. Putney és munkatársai [*Science* 234, 1392 (1986)] kialakítottak állatokban semlegesítő szérum antitesteket, miután a gp110 molekula karboxil-terminális felét tartalmazó rekombináns fúziós fehérjével immunizálták ezeket, továbbá azt is bemutatták, hogy a burok-fehérje glikozilezése nem szükséges egy semlegesítő antitest válaszhoz.

- Így kívánatos lenne egy, a HIV gp110 molekulát vagy részeit hasznosító, AIDS elleni alegység-vakcina. Az alegység-vakcinák az inaktivált vagy legyengített vírusokból készített vakcinák alternatívái. Az inaktivált vakcinák aggodalomra adhatnak okot a lehetséges hiba miatt, hogy nem az összes vírus-részecske pusztul el, a legyengített vírusok pedig rendelkezhetnek a mutáció képességével és visszaszerezhetik betegségkeltő képességüket. Az alegység-vakcináknál a vírusnak csak azokat a részeit alkalmazzák a gazdaszervezet immunizálására, amelyek azokat az antigéneket vagy epitópot tartalmazzzák, amelyek képesek immunválasz kiváltására, pl. semlegesítő antitesteket, ADCC-t, és citotoxikus T-sejt válasz kiváltására. Az alegység-vakcinák nagy előnye, hogy oda nem illő vírus-anyag ki van zárva.

- A vakcinákban való alkalmazáshoz vírus alegységeket számos módszerrel ki lehet alakítani. Így pl. a burok-glikoproteint egy bakteriális gazdaszervezetből ki lehet fejteni és tisztítani, bár ebből a molekulából hiányozhat a legtöbb transzláció utáni módosítás (pl. glikozilezés) vagy más feldolgozási lépés. Az ilyen módosításokat úgy kaphatják meg, hogy egy eukarióta kifejező rendszert alkalmaznak, pl. élesztő vagy emlős sejt tenyészetet. Vírus-géneket úgy vezettek be emlős sejtekbe, hogy vektorként Vaccinia vírust alkalmaztak. Lásd pl.: Mackett M. és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7415 (1982); Panicali D. és Paoletti E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4927 (1982). Rekombináns Vaccinia

vírust lehet megalkotni Hu és munkatársai módszere szerint [Nature, 320, 537 (1986)], vagy Chakrabarti és munkatársai módszere szerint [Nature, 320, 535 (1986)], mindkét irodalmi hely referenciaként be van építve ebbe a bejelentésbe. Ezekben a rendszerekben a rekombináns Vacciniával fertőzött sejtek által termelt vírus glikoproteinek megfelelően glikozilezve vannak, és ezeket át lehet vinni a sejt felületére a kiválasztáshoz és végső izoláláshoz.

Egy alegység vakcina előállításánál fontos lépés a kívánt glikoprotein kellő tisztítása a kifejező rendszer komplex keverékéből. Számos módszert lehet alkalmazni a tisztítás kivitelezésére. Ezek közt találjuk (de nemcsak ezekre korlátozódnak) a preparatív poliakrilamid gélelektroforézist, a gélpermeációs kromatográfiát, a kromatográfia különböző módszereit (pl. ioncserélő-, fordított fázisú-, immun-affinitás-, hidrofób kölcsönhatás-kromatográfiát), és másokat. Ezeknek a módszereknek legtöbbjét különböző kombinációkban alkalmazzák, hogy lényegében tiszta készítményeket nyerjenek. Az alábbi irodalmi helyeken, amelyeket a jelen bejelentésbe referenciaként építünk be, található ismertetést a fenti módszerekre: Kleid D.G. és munkatársai: Science, 214, 1125 (1981); Cabradilla C.D. és munkatársai: Biotechnology, 4, 128 (1986); Dowbenko D.J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7748 (1985).

Olyan módszerek szükségesek alegység vakcinák előállításához, amelyekben egy adott vírus antigén egy komplex kifejező keverékéből való maximális tisztításának eléréséhez csökkentett számú lépés szükséges. Az antigének hatékony elkülönítését az idegen komponensektől immunaffinitás-kromatográfiát alkalmazva lehet végrehajtani. Ez a technika, amely immun-adszorpcióként is ismeretes, elvileg egy antigén szelektív adszorpciójából áll egy szilárd hordozóra, amelyre előzőleg kovalensen fajlagos antitestet kötöttek. A szelektíven adszorbeált antigént azután eluálják az ilyen antitest affinitás adszorberől pl. a puffer pH-jának és/vagy ionerősségének változtatásával.

A kívánt antigénnel immunizált állatokból vagy természetesen fertőzött állatokból (lásd pl. Lasky és munkatársai, fentebb idézett munka) kapott poliklonális antitesteket gyakran alkalmazzák immunadszorbensként, de általában ezek a reagensek jelentős hátrányokat váltanak ki, pl. (i) nem az összes, oldhatatlan hordozó fajlagos a szóban forgó molekulára, így szükségessé téve a további tisztítást; (ii) a kívánt antigén hozama gyakran alacsony; és (iii) az antitest affinitások gyakran változnak készítményről-készítményre, módosításokat követelve meg az elució eljárásokban. Az alegység vakcina készítményekben alkalmazandó kívánt vírus antigénre fajlagos monoklonális antitestek alkalmazása, a poliklonális antitestek helyett, megkerüli ezeket a nehézségeket.

Azokat a rágszáló monoklonális antitesteket, amelyek megkötik a HIV antigéneket, már leirták. Számos kutatócsoport beszámolt már a p25 gag fehérjére fajlagos monoklonális antitestekről. Így pl. diMarzo Veronese és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5199 (1985)] monoklonális antitesteket írnak le HIV p25 fe-

hérje ellen, de nem emelik ki a fajlagosságot és a semlegesítő jellemzőket. Chassagne és munkatársai [J. Immunol. 136, 1442 (1986)] szintén p25 fehérje elleni monoklonális antitestekről számolnak be, de nem tesznek említést semlegesítő aktivitásról. Beszámoltak már gp41 membrán glikoproteinekre fajlagos monoklonális antitestekről is. Így pl. diMarzo Veronese és munkatársai [Science 229, 1402 (1985)] gp41 elleni monoklonális antitestekről számolnak be, de semlegesítő aktivitást nem említnek. Az EP 214, 709 lajstromszámú európai szabadalmi leírás szintetikus peptideket ismertet gp41-ben, de nem említi a gp110-et, és nem említi, hogy a peptidek HIV semlegesítő területet határoznának meg. Az EP 219, 106 lajstromszámú európai szabadalmi leírás szintén a gp41-ből való polipeptidekről ír, nem esik viszont szó a gp110 burokfehérjéről és semlegesítő aktivitásról.

További irodalmi helyek is találhatóak, amelyek – ha távolról is – érintik a jelen találmány szerinti eljárást. A Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9254–58 (1986) szakkikk leír néhány bizonyítottan blokkoló peptidet, de a HIV gp110-hez kötődő monoklonális antitestekkel való kombinálásról nem esik szó. A WO 86/06099 számú PCT közrebocsátási irat, amely saját korábbi szabadalmunk, rekombináns gag fehérjéket ír le, de nem írja le olyan monoklonális antitestek lehetőségét, amelyek semlegesítik a HIV-et. Az EP 187, 041 lajstromszámú európai szabadalmi leírás rekombináns HIV polipeptidekről számol be, de semlegesítő területeket nem mutat be.

A fentebb idézett irodalmi helyek tehát a jelen találmány megoldásától jelentősen eltérő eljárásokat ismeretnek.

Megmaradt az igény a szakterületen olyan monoklonális antitestekre, amelyek a fő burok-glikoprotein, a gp110 jól meghatározott területén belül levő epitopokra fajlagosak. Azok a monoklonális antitestek, amelyek ezekhez a területekhez kötődnek és csökkentik vagy megszüntetik a HIV replikációját és átvihetőségét, fontos gyógyászati és megelőző hasznosítással bírhatnak. Ezen kívül a monoklonális antitesteket lehet alkalmazni a gp110 kívánt területének tisztítására szétzúzott vírusból vagy rekombináns kifejező rendszerekből pl. vakcinákban való felhasználáshoz. Ezen kívül a monoklonális antitestek által felismert epitopot tartalmazó területet lehet vegyi úton szintetizálni, ezáltal el lehet kerülni a gp110 molekula nagyobb fragmenseinek tisztításában és beadásában rejlő nehézségeket. A jelen találmány eleget tesz ezeknek és más hasonló igényeknek.

Az alábbiakban a találmány rövid összefoglalását adjuk meg.

A HIV fehérjék epitopjai semlegesítésének immunológiai utánzására képes peptideket, ilyen peptideket kódoló nukleinsav vizsgálo mintákat, ilyen peptidekkel reaktív monoklonális antitesteket, valamint HIV fertőzőképességet zavaró más peptideket szolgáltatunk. Ezek az új anyagok alkalmazást találnak pl. a HIV fertőzések kimutatására szolgáló diagnosztikai eljárásokban, és az ilyen fertőzések elleni kezelésekhöz vagy vakcináláshoz szolgáló gyógyászati eljárásokban.

Az alábbiakban részletesebben ismertetjük a speciális kiviteli módokat.

A jelen találmány új kompozíciókat és módszereket szolgáltat HIV fertőzések semlegesítésére, azaz a fertőző HIV képződésének vagy sejtközötti átvitelének megelőzésére vagy lényeges gátlására egy gazdaszervezetben. Még pontosabban, HIV semlegesítő területét utánzó peptideket és egy ilyen területtel reaktív monoklonális antitesteket alkalmazunk HIV fertőzések diagnózisához, kezeléséhez és a fertőzések elleni vakcináláshoz. Ebben a vonatkozásban a „semlegesítő terület” kifejezés a HIV, pontosabban a HIV fehérjék olyan részeit jelenti, amelyek azokkal az antitestekkel reaktív egy vagy több epitopot meghatározó aminosav szegmenst tartalmaznak, amely antitestek egyedül vagy más, jelen találmány szerinti antitesttel együtt képesek a HIV fertőzések semlegesítésére. A semlegesítéshez alkalmas vizsgálatok jól ismertek, ezek magukban foglalják a HIV fertőzések csökkenését T-sejt vonalakban, HIV burok-glikoproteinjeit viselő VSV(HIV) pszeudotípusok tarfoltképző egységeinek csökkenését, a szinciciális gátlási vizsgálatokat, és a virion-receptor kötő vizsgálatokat. Ha kívánatos, a semlegesítő aktivitást össze lehet vetni az antitest reaktivitással immunkémiai vizsgálatokban, pl. immunfluoreszcenciás, immuno-foltképzéses és radioimmunkicsapásos vizsgálatokban.

Az egyik szempontból vizsgálva, az új peptidek, amelyek tipikusan 50 aminosavnál kevesebb aminosavból állnak, öt vagy több összefüggő aminosavat tartalmaznak, lényegében a HIV gp110 vagy p25 semlegesítő területein elhelyezett epitópokhoz hasonló epitópokat képezve, amelyeket a HIV genom *env* illetve *gag* területei kódolnak. Különösen érdekesek azok a területek, amelyek a gp110 mintegy 301. aminosavától mintegy 336. aminosaváig terjednek, és a p25 mintegy 278. aminosavától a mintegy 319. aminosaváig és mintegy 315. aminosavától mintegy 363. aminosaváig terjednek, mind a LAV<sub>BRU</sub>-nak nevezett HIV törzsből. Az aminosavgyök jelölések mind a Los Alamos Data Bank-tól származnak (AIDS vírus szekvencia adatbank, Los Alamos National Laboratory, Theoretical Division, Los Alamos, NM 87545).

Azok, akik a szakterületen jártasak, méltányolni fogják, hogy más HIV izolátumokból származó további analóg területeket lehet azonosítani a különböző izolátumokból származó rokon fehérjéken belüli elhelyezkedésük alapján. Gyakorlatilag az ilyen homológokat a LAV<sub>BRU</sub> szekvencia adatokra vonatkozó referencia alapján a következőképpen lehet azonosítani.

(a) A HIV izolátumokat és a LAV<sub>BRU</sub> aminosavszekvenciáit sorba lehet állítani, hogy megkapjuk a két szekvencia közti maximális homológiát.

(b) HIV izolátumok aminosavszekvenciáit tartalmazó peptideket lehet azonosítani, amely aminosavszekvenciák megfelelnek az olyan LAV<sub>BRU</sub> peptidek elhelyezkedésének, amelyek immunológiailag utánozzák a LAV<sub>BRU</sub> fehérjéket. Az így azonosított HIV izolátum aminosavszekvenciákat tartalmazó peptidek immunológiailag tipikusan utánozzák a megfelelő HIV izolátum fehérjéket.

Ezt a módszert olyan HIV törzsekhez is lehet alkalmazni, amelyek még felfedezésre várnak. Így pl. amikor

a HIV új törzsét azonosítják, burok és mag aminosav szekvenciáját egy sorba lehet állítani a LAV<sub>BRU</sub> hasonló szekvenciáival, hogy megkapjuk a maximális homológiát. Azok a módszerek, amelyekkel a szekvenciákat sorba lehet állítani, ismertek azok számára, akik a szakterületen jártasak. A szekvenciák egy sorba állításánál kívánatos fenntartani olyan sok homológiát a cisztein gyökök között, amennyi csak lehetséges. Az új HIV törzs vagy faj aminosavszekvenciáját, amely megfelel az itt speciálisan ismertetett peptidek elhelyezkedésének, lehet szintetizálni, és fel lehet használni a jelen találmánnyal összhangban.

Más HIV törzsben levő homológ terület szekvenciáinak meghatározására másik módszert írnak le Scharf és munkatársai [Science, 233, 1076 (1986)]. Ez a módszer két oligonukleotid primert alkalmaz, amelyek a szóban forgó szekvencia helyeken kívül levő megőrzött szekvenciákhoz kötődnek, és különböző restriktációs helyeket tartalmaznak az egyes primerekben. A HIV törzsekből származó DNS-t ezután in vitro szaporíthatjuk, majd az így létrejövő oligonukleotidokat vektorokba klónozzuk, és vakcinákba építhetjük be, mint olyan „kazetta”-t, amely egy adott epitopot képvisel a HIV törzsből.

A jelen találmányhoz nem szükséges, hogy az ilyen szekvenciákon belül elhelyezkedő epitópok kereszt-reaktívak legyenek a HIV összes törzsei vagy fajai elleni antitestekkel. Azok az immunológiai epitópokat tartalmazó peptidek, amely epitópok megkülönböztetik egyik fajt vagy szerocsoportot a másiktól, hasznosítást nyernek adott fajok vagy szerocsoportok azonosításában, és valóban segítik a HIV egy vagy több fajával vagy szerotípusával fertőzött egyének azonosítását. Ezek hasznosak lehetnek más peptidekkel alkotott kombinációban is, vagy homológ területből, vagy más semlegesítő területből, gyógyászati kompozíciókban.

A szóban forgó peptidek legelőnyösebben a vírus gp110 területéről származnak. Ebben a területben különösen érdekesek azok a peptidek, amelyek a LAV<sub>BRU</sub> izolátum mintegy 6667. bázispárjától (bp) a mintegy 6774. bázispárjáig terjedő *env* nyitott leolvasó kereten belül kódolódnak. Így további HIV izolátumok különböző homológ területei magukban foglalják a Los Alamos Data Bank-tól kapott (a LAV2 kivételével) homológ szekvenciákat, ezek az I. táblázatban vannak felsorolva.

A monoklonális antitestek kialakításához vagy átvizsgálásához alkalmas más peptidek magukban foglalják azokat, amelyek a LAV<sub>BRU</sub> mintegy 7246. bp-jétől mintegy 7317. bp-jéig terjedő *env* nyitott leolvasó kereten belül kódolódnak. Az ilyen antitestek és reaktív peptidek különösen hasznosak az immunoassayokban.

A LAV<sub>BRU</sub> izolátum *gag* területében a p25 aminosav szekvenciák a 278.-tól 319.-ig és 315.-től 363.-ig a HIV további semlegesítő területei. Azok, akik a szakterületen jártasak, méltányolni tudják, hogy a HIV további semlegesítő területeit is lehet azonosítani az itt megadott kitanításra alapozva – különösen a különböző HIV epitópokkal reaktív monoklonális antitestek kombinációi mutatnak semlegesítő aktivitást.

## I. táblázat

HXB2	TGTACAAGACCCAACAACAATACAAGAAAAGA.....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
LAV2	-----Gly---Lys---Val---Gln-----MetLeu	302
HXB2	CAGAGA.....GGACCAGGGAGAGCATTGTTACAATAGGAAAAATAGGAAATATG	
BH102	GlnArg.....GlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIleGlyAsnMet	326
BH102	-----	326
BH8	-----	326
HXB3	-----	326
H9M	-----	326
BRU	-----	331
MAL	.....-----Gln---LeuTyr---Thr---IleVal---AspIle	329
ELI	GlyLeu-----GlnSerLeuTyrThr---Arg---IleValSerArgSer	323
ARV2	.....-----His---Thr---Arg---IleGlyAsp	327
WMJ2	.....-----Arg---ArgGlu.....IleGlyIle	320
RFENV	.....-----IleValTyrAlaThr---Gln---IleGlyAsp	337
Z6	GlyLeu-----*•*GlnAlaLeuTyrThr---Arg---ArgThrLysIleIle	327
Z3	ArgIle-----LysVal---TyrAlaLys---Gly.....	319
NY5	GlyPro-----ThrLeuTyrAlaArgGlu-----AspIle	320
CDC42	.....-----ValTrpTyr---Thr---Glu---LeuGlyAsn	335
LAV2	MetSer-----HisVal---HisSerHisTyrGlnProIle---Lys	323
HXB2	...AGA...CAAGCACATTGT	
	...Arg...GlnAlaHisCys	331
BH102	-----	331
BH8	-----	331
HXB3	-----	331

## I. táblázat (folytatás)

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

Az I. peptid, amelyet 29. peptidnek is nevezünk, az *env* nyitott leolvadó keretben kódolódik a 308. – mintegy 328. számú aminosav-gyökök között, ennek aminosav-szekvenciája az alább ismertetett. Az alábbi szekvenciában foglalt oligopeptidek lineáris epitópokat foglalnak magukban.

## 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',

ahol a képletben Y és Y', ha van jelen, mindegyike legfeljebb 20 aminosavból álló szekvenciát jelent. Amikor Y és/vagy Y' van jelen, ezek pl. egy vagy több aminosavból állhatnak azokból a szekvenciákból, amelyek a HIV burok 308.–328. aminosavgyökeiket szegélyezik, vagy ezeknek a szegélyező szekvenciáknak bármelyik részéből. Példa kedvéért, és nem korlátozásként említve, Y állhat a LAV<sub>BRU</sub> burkolati aminosavszekvencia 301.–307. számú aminosavainak egészéből vagy részéből, és Y' állhat a LAV<sub>BRU</sub> burok aminosavszekvencia 329.–336. számú aminosavainak egészéből vagy részéből a következők szerint:

## 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.

Egy másik módszer szerint a jelen találmány szerinti peptid megcsonkított szekvenciáit lehet előállítani. Ebben a tekintetben a 29. peptid következő szekvenciái lehetnek különösen hasznosak:

## III (29b.)

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

ahol Y és/vagy Y', ha van jelen, mindegyike legfeljebb 20 aminosavból álló szekvenciát jelent.

20

## IV (29c.)

Y-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-

Ile-Gly-Lys-Ile-Y',

25

ahol Y és/vagy Y', ha van jelen, mindegyike legfeljebb 20 aminosavból álló szekvenciát jelent.

Egy másik kiviteli módban a különösen jelentős ARV-2 izolátum homológ területei kódolódnak az *env* nyitott leolvadó keretben a mintegy 306. – mintegy 323. számú aminosavgyökök között, ennek tipikusan az aminosav-szekvenciája az alább ismertetett. Az alábbi szekvenciában foglalt oligopeptidek lineáris epitópokat foglalnak magukban.

30

## V (177.)

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

35

40

ahol a képletben Y és Y', ha van jelen, mindegyike legfeljebb 20 aminosavból álló szekvenciát jelent. Amikor Y és/vagy Y' jelen van, ezek egy vagy több aminosavból állhatnak azokból a szekvenciákból, amelyek az ARV-2 burok 306.–323. aminosavgyökeiket szegélyezik, vagy ezeknek a szegélyező szekvenciáknak bármelyik részéből. Az Y főleg a HIV burkolati aminosav szekvencia 299.–306. számú gyökei közti rész egészéből vagy részéből állhat; az Y' a HIV burok-aminosavszekvencia 324.–333. számú gyökei közti rész egészéből vagy részéből állhat.

45

Egy másik kiviteli módban az V. peptid megcsonkított szekvenciáit lehet előállítani. Ebben a tekintetben az alábbi szekvenciák lehetnek különösen hasznosak:

50

## VI (177a.)

Y-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Tyr-Ile-Gly-Pro-Gly-Y'; és

55

## 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',

60

ahol Y és/vagy Y', ha jelen van, mindegyike legfeljebb 20 aminosavból álló szekvenciát jelent.

Egy további példa a LAV-2 izolátum homológ területeit tartalmazza, olyanokat, amelyeket az *env* nyitott leolvasó keret kódol a mintegy 311.–330. számú aminosavgyökök között, és amelyek tipikusan a következő szekvenciával bírnak:

#### 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',

ahol Y és/vagy Y', ha jelen van, mindegyike legfeljebb 20 aminosavból álló szekvenciát jelent [lásd Nature, 326, 662 (1987)], ez az irodalmi hely a jelen bejelentésbe referenciaként van beépítve.

A jelen találmány egy másik szempontjából összhangban monoklonális antitestek előállítására képes új sejtvonalak és ilyen antitesteket tartalmazó kompozíciókat szolgáltatunk, ezek az antitestek képesek szelektíven felismerni rendkívül magas titerknél is ( $10^2$ -től  $10^4$ -ig,  $10^7$ -ig, vagy akár tovább is) azokat a semlegesítő területeket, amelyek a gp110 vagy p25 burkolati glikoproteinek előre meghatározott szekvenciáin belül található; ezek fehérje-prekurzorait, biológiailag kifejezett rekombináns fúziós fehérjéket és olyan szintetikus peptideket, amelyek a gp110 vagy p25 előre meghatározott szekvencia területein belül található egy vagy több epitópot tartalmaznak. A szóban forgó hibridsejtek egy azonosítható kromoszómával rendelkeznek, amelyekben a DNS csírvonal átrendeződött, hogy egy olyan epitóphoz való köthetlyel bíró antitestet kódoljon, amely epitóp a gp110-en vagy p25-ön közös néhány vagy minden HIV klinikai izolátumban. Ezeket a monoklonális antitesteket a legkülönbözőbb módokon lehet felhasználni, beleértve a diagnózist és a gyógyítást, valamint más, kereszt-reaktív antitestek, pl. blokkoló antitestek felismerését. Azok a peptidek vagy polipeptidek, amelyek azokat az epitópot tartalmazták, amelyekkel ezek reagálnak, többféle különböző felhasználást nyerhetnek immunogénként vakcinákhoz, vagy gyógyászati szerként.

#### Blokkoló peptidek

Az előzőekben ismertetett peptidekkel vagy semlegesítő monoklonális antitestekkel együtt történő elsődleges felhasználáson kívül a jelen találmány egy másik kiviteli módja magában foglalja olyan további peptidek vagy antitestek hasznosítását, amelyek zavarják a HIV kötését a receptorokhoz, hogy tovább csökkentsék a HIV fertőzőképességét. Az úgynevezett „blokkoló peptidek”-et, amelyek képesek gátolni a vírus burjánzását, valamint az ilyen blokkoló peptideken belül található epitópokra fajlagos monoklonális antitesteket, fel lehet használni a HIV fertőzések elleni kezelések hatékonyságának a növelésére. A HIV blokkoló peptidek tipikusan megfelelnek a HIV azoknak az aminosavszekvenciáinak, amelyekről úgy véljük, hogy esszenciálisak a vírus gazdaszéljhez való kötődéséhez, ilyenek pl. a LAV<sub>BRU</sub> *env* kódolt aminosav-gyökei a mintegy 190. – mintegy 197. aminosavgyökök között, és az ARV-2 és HTLV-III

(BH–10) mintegy 185. – mintegy 192. aminosavgyökei között. Ezek között található a T oktapeptidet (Ala–Ser–Thr–Thr–Asn–Tyr–Thr) és különböző származékait (pl. az alábbi IX.–1) és analógjait (pl. az alábbi XI.–1), amelyeket Pert és munkatársai írtak le [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9254–9258 (1986)], ez az irodalmi hely a jelen bejelentésbe referenciaként van beépítve], amelyek a burok–glikoproteinen (gp110 vagy 120) helyezkednek el.

Így pl. az alábbi szekvenciákkal rendelkező blokkoló peptidek különös fontosságúak, előnyösen acetilezve az –NH<sub>2</sub>-terminálisnál és amidálva a –COOH terminálisnál:

IX (173D)	Y-D-Ala-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y';
X (186)	Y-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y';
XI (187)	Y-Thr-Thr-Ser-Tyr-Thr-Y';
XII (188)	Y-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y';
XIII (189)	Y-Asn-Thr-Ser-Tyr-Gly-Y';
XIV (190)	Y-Asp-Thr-Asn-Tyr-Ser-Y';
XV (191)	Y-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y';

ahol a képletben Y és Y', ha van jelen, mindegyike legfeljebb 20 aminosavból álló szekvenciát jelent. Az epitópot és antigén determinánsokat tipikusan legalább öt összefüggő aminosav határozza meg, és ezek, pl. természetben előforduló HIV antigénhelyeket utánozva HIV reaktív antitestek és vakcinák előállításánál nyernek alkalmazást.

#### Monoklonális antitestek kialakítása

A LAV 301–336 aminosavainak megfelelő HIV gp110 tartományon belüli semlegesítő epitóppal fajlagosan reaktív monoklonális antitest fogalma – amint azt a jelen leírásban használjuk – azokat a monoklonális antitesteket is magába foglalja, amelyek más (például a fenti I. táblázatban szereplő) HIV törzsek analóg aminosavszekvencia tartományához képesek kötődni. Ugyanez vonatkozik az e tartományba tartozó peptidekre is.

A monoklonális antitestek előállítását úgy lehet végrehajtani, hogy azoknak a nukleinsav szekvenciáknak a kifejeződését, amelyek HIV-re fajlagos antitesteket kódolnak, nem pusztulóvá (örökössé) tesszük olyan módon, hogy az ilyen szekvenciákat, tipikusan az antitestet kódoló cDNS-t, bevezetjük egy olyan gazdaszéljbe, amely sejt kultúrában tenyészthető. A nem pusztulóvá tett sejt vonal lehet valamely emlős sejt vonal, amelyet onkogenezissel, átfertőzéssel, mutációval vagy hasonlóval transzformáltunk. Az ilyen sejt vonalak között találjuk a mielóma sejt vonalakat, limfóma sejt vonalakat vagy más olyan sejt vonalakat, amelyek képesek az antitest kifejeződésének és kiválasztásának a támogatására in vitro. Az antitest lehet egy emlős természetben előforduló immunoglobulinja, amelyet egy vírussal transzformált limfocita, főleg egy splenocita vagy egy neoplazmás sejtrel, például mielómával fuzionált limfocita termel, hogy hibrid sejt vonal alakuljon ki. Tipikusan a splenocitát a HIV vírus vagy egy epitóp helyet tartalmazó fragmentuma ellen immunizált állatból kapjuk.

Az immunizálás munkamenete jól ismert, és jelentősen változtatható is úgy, hogy még hatásos marad. Ezzel kapcsolatban lásd: Goding: Monoclonal Antibodies:

Principles and Practice, 2. kiadás (1986), Academic Press; ez az irodalmi hely a jelen bejelentésbe referenciaként van beépítve. Szétzúzott vírusokat, szintetikus peptideket és bakteriális fúziós fehérjéket, amelyek a gp110 vagy p25 molekula antigén fragmentumait tartalmazták, alkalmazhatunk immunogénként. A szétzúzott vírusok, peptidek vagy rekombináns fehérjék immunogénje előnyösen a megfelelő epitopokat tartalmazó fehérjékben vagy ezek fragmentumaiban dús. Pontosabban szétzúzott vírus lizátumokat vagy extraktumokat, vagy biológiailag kifejezett rekombináns fehérjék vagy szétzúzott kifejező vektorok felülűszóit tartalmazó oldatokat glikoproteinekre lehet dúsítani, ha szükséges, olyan tisztítási módszereket alkalmazva, mint pl. poliakrilamid gélek elektroforézis. A lektin affinitásos tisztítás előnyös és kényelmes módszer a gp110 és más glikoproteinek tisztításához, pl. lencse lektint alkalmazó affinitás tisztítás. A tisztítás mértéke, amelyre a glikoproteineket az oldatokból immunogénként való felhasználáshoz tisztítjuk, széles határok közt változhat, pl. kevesebb, mint 50%-ra, általában 75%–95%-ra, kívánatosan 95%–99%-ra, de legkívánatosabban teljes homogenitásig.

Amikor a fehérjéket a kívánt mértékig megtisztítottuk, ezeket az immunizáláshoz szuszpendálhatjuk vagy hígíthatjuk megfelelő fiziológiai hordozóban, vagy adjuvánsal kapcsolhatjuk össze. Az egyik előnyös technika pl. magában foglalja a fehérjék és fragmentumaik adszorbeálását lencse lektin agarózhoz vagy más makromolekuláris hordozóhoz az injekció készítésénél. A HIV fehérjékben (beleértve a gp110 glikoproteineket és p25 mag fehérjéket, vagy antigén részeit) dúsított antigén készítmények immunogén mennyiségeit a gazdaszervezetbe injektáljuk, általában 1 µg–20 mg/kg gazdaszervezet koncentráció-tartományban. A beadás lehet injekció formájában, pl. intramuszkulárisan, peritoneálisan, szubkután, intravénásan stb. A beadás történhet egyszer, vagy több időben, általában egy–négy hét időtartamon át. Az immunizált állatokat megfigyeljük a kívánt antigénekre való antitestek termelésére, majd a lépeket kivesszük és a lép-eredetű B-limfocitákat izoláljuk és egy mielőtt sejtvonallal fuzionáljuk vagy transzformáljuk. A transzformálást vagy fúziót hagyományos módon hajthatjuk végre, a fúziós technikát nagy mennyiségű szabadalmi leírás mutatja be, pl. a 4,172,124; 4,350,683; 4,363,799; 4,381,292; és 4,423,147 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások. Ezen kívül lásd még: Kennet és munkatársai: Monoclonal Antibodies (1980) c. kiadványt, és az ebben szereplő irodalmi hivatkozásokat (ezek mind a jelen bejelentésbe referenciaként vannak beépítve) és Goding fentebb idézett munkáját.

A nem pusztulóvá tett sejtvonalat lehet klónozni és átvizsgálni hagyományos technikákkal összhangban, és a sejt felülűszókban levő antitestekről kimutatni, hogy képesek kötődni a kívánt gp110 vagy p25 HIV vírusfehérjékhez, rekombináns fúziós fehérjékhez vagy szintetikus peptidekhez, amelyek tartalmazzák a kívánt epitop területet. A megfelelő, nem pusztulóvá tett sejtvonalat azután in vitro lehet növesztetni, vagy egy megfelelő gazdaszervezet peritoneális üregébe injektálni ascites

folyadék előállítására. Annak alapján, hogy néhány jelen találmány szerinti olyan antitest rendelkezésre áll, amelyekről ismeretes, hogy fajlagosak pl. a LAV<sub>BRU</sub> genom terület 6688. bázispárjától mintegy 6750. bázispárjáig terjedő terület (amely a 29. peptidet kódolja) vagy a mintegy 7246. bázispárjától mintegy 7317. bázispárjáig terjedő terület (amely a 36. peptidet kódolja) által kódolt területen belül található epitopokra, a felülűszókat úgy lehet átvizsgálni, hogy a szóban forgó monoklonális antitestekkel gátoljuk egy kompetitív mérésben [a fenti számozások Wain–Habson és munkatársai módszere alapján értendők, az alábbi irodalmi hely szerint: Cell, 44, 9 (1985); ez az irodalmi hely a jelen bejelentésbe referenciaként van beépítve]. Így könnyen lehet előállítani további, nem pusztulóvá tett hibridóma sejt vonalakat a kívánt kötési jellemzőkkel sokféle forrásból annak alapján, hogy az adott antigénre fajlagos jelen antitestek rendelkezésre állnak. Egy másik módszer szerint ezeket a sejt vonalakat más neoplazmás B-sejtekkel lehet fuzionálni, ahol az ilyen más B-sejtek az antitestet kódoló genom DNS-t befogadják.

Bár a rágszáló, főleg egér neoplazmás B-sejtek az előnyösek, más emlős fajok is lehet alkalmazni, pl. nyulat, szarvasmarhát, juhot, lovat, sertést, madarat, vagy hasonló fajok. Ezeknek az állatoknak az immunizálását könnyen végre tudjuk hajtani, és limfocitáikat, főleg splenocitáikat kinyerhetjük fúziókhoz.

A transzformált vagy hibrid sejt vonalak által kiválasztott monoklonális antitestek lehetnek az immunglobulinok bármelyik osztályából vagy alosztályából, pl. lehetnek IgM, IgD, IgA, IgG<sub>1-4</sub> vagy IgE immunglobulinok. Mivel az IgG a legáltalánosabb izotípus, amelyet a diagnosztikai vizsgálatokban alkalmaznak, ez gyakran előnyös. A monoklonális antitesteket lehet ép formában alkalmazni, vagy fragmentumai, pl. Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, formájában, de általában ép formában.

Hogy megihűsítsuk egy állatból származó monoklonális antitest lehetséges antigenicitását, kiméra antitesteket lehet konstruálni, ahol egy immunglobulin molekula antigén-kötő fragmentuma (variábilis régió) peptidkötéssel össze van kötve egy másik fehérje legalább egy részével, amely fehérjét az ember nem idegenként ismeri fel, ilyen pl. egy humán immunglobulin molekula kivett részlete. Ezt úgy lehet végrehajtani, hogy az állati variábilis régió exonját fuzionáljuk humán kappa vagy gamma konstans régió exonokkal. Különböző technikák ismeretesek a szakterületen jártasak számára, ilyenek vannak leírva pl. a PCT 86/01533, EP 171496 és EP 173494 közzétételi számú bejelentésekben, amelyek leírása a jelen bejelentésbe referenciaként van beépítve.

#### *A gyógyászati kiserelés és alkalmazás*

A jelen találmány szerinti antitesteket, amelyek semlegesítő aktivitást mutatnak, pl. azokat, amelyek a gp110-en vagy p25-ön levő epitop helyekkel reagálnak, vagy amelyek egy blokkoló peptiddel reagálnak, be lehet építeni komponensként a HIV fertőzések gyengítésére szolgáló gyógyászati kompozíciókba. A kompozíciónak tartalmaznia kell legalább egy jelen találmány szerinti monoklonális antitest terápiás vagy megelőző mennyi-



ségét, gyógyászatiilag hatékony hordozóval. A gyógyászati hordozó lehet bármilyen összeférhető, nem toxikus anyag, amely alkalmas arra, hogy a monoklonális antitestet a pacienseknek szolgáltatassa. Hordozóként steril vizet, alkoholt, zsírokat, viaszokat és közömbös szilárd anyagokat alkalmazhatunk. Gyógyászatiilag elfogadható adjuvánsokat (pufferoló szerek, diszpergáló szerek) szintén beépíthetünk a gyógyászati kompozícióba. Az ilyen kompozíciók tartalmazhatnak egyedi monoklonális antitestet, amely pl. fajlagos a 6688. bp–6750. bp közti terület által kódolt területen belül levő epitop helyet tartalmazó burok-glikoproteinekkal rendelkező HIV törzsekre. Egy más módszer szerint egy gyógyászati kompozíció tartalmazhat egy vagy több monoklonális antitestet, „koktél”-t képezve. Így pl. HIV különböző törzsei elleni monoklonális antitesteket tartalmazó koktél lehetne univerzális termék a HIV klinikai izolátumok nagy többsége elleni terápiás vagy megelőző aktivitással. A koktél tartalmazhat olyan monoklonális antitesteket, amelyek gp110-tól vagy p25-től eltérő HIV fehérjékhez vagy glikoproteinekhez kötődnek, pl. gp41 glikoproteinhez, vagy p34 nukleáz/integráz-hoz. A különböző monoklonális antitest kompozíciók molaránya általában nem tér el jobban, mint 10. szorzóval, és még inkább nem tér el jobban, mint 5. szorzóval, és a molarány leginkább mintegy 1:1–2 a többi antitest komponens bármelyikéhez.

A jelen találmány szerinti monoklonális antitesteket lehet alkalmazni elkülönítetten beadott kompozíciók formájában, más retrovírus elleni szerekkel együtt, ezek közé beleértve a blokkoló peptideket is. A retrovírus-ellenes szerek, és főleg a HIV elleni szerek fejlődésének jelenlegi állapotát Mitsuya és munkatársai tekintik át [Nature, 325, 773–778 (1987)], ez az irodalmi hely referenciaként van beépítve a jelen bejelentésbe.

A jelen találmány szerinti monoklonális antitestek, peptidek és gyógyászati kompozíciók főleg orális vagy parenterális beadáshoz alkalmazhatók. A gyógyászati kompozíciókat előnyösen parenterálisan, azaz szubkután, intramuszkulárisan vagy intravénásan adhatjuk be. Így a jelen találmány kompozíciókat nyújt parenterális beadáshoz, amely kompozíció monoklonális antitestet, peptidet, vagy ezek „koktél”-jét tartalmazza elfogadható hordozóban, előnyösen vizes hordozóban. Vizes hordozók széles választékát alkalmazhatjuk, pl. vizet, pufferolt vizet, 0,4%-os sóoldatot, 0,3%-os glicint stb. Ezek az oldatok sterilek és általában mentesek a szemcsés anyagoktól. Ezeket a kompozíciókat hagyományos, jól ismert sterilizálási technikákkal lehet sterilizálni. A kompozíciók tartalmazhatnak gyógyászatiilag elfogadható kiegészítő anyagokat, ha ezek szükségesek a megfelelő fiziológiai körülményekhez, ilyenek pl. a pH beállító és pufferoló szerek, toxicitást beállító szerek, pl. nátrium-acetát, nátrium-klorid, kálium-klorid, kalcium-klorid, nátrium-laktát stb. Az antitest koncentrációja ezekben a kiszerezésekben széles határok közt változó lehet, pl. kevesebb, mint 0,5%-tól, általában legalább 1%-tól egészen 15–20%-ig (a fentiek tömegszázalékban értendők), és a koncentrációt elsősorban a folyadék térfogatát, viszkozitását stb. figyelembe véve választjuk meg, előnyösen figyelembe véve a beadás kiválasztott módszerét is.

Így tipikus gyógyászati készítményt lehet készíteni intramuszkuláris injekcióhoz, amely 1 ml steril, pufferolt vizet és 50 mg monoklonális antitestet tartalmaz. Tipikus gyógyászati készítményt lehet készíteni intravénás infúzióhoz, amely 250 ml steril Ringer-oldatot és 150 mg monoklonális antitestet tartalmaz. Parenterálisan beadható kompozíciók elkészítéséhez szolgáló módszerek ismertek vagy nyilvánvalóak azok számára, akik a szakterületen jártasak, ezek részletesebben is le vannak írva pl. az alábbi szakkönyvekben: Remington's Pharmaceutical Science, 15. kiadás, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980), ez a szakkönyv a jelen bejelentésbe referenciaként van beépítve.

A jelen találmány szerinti monoklonális antitesteket és peptideket lehet liofilezni tároláshoz, és használat előtt ezeket helyre lehet állítani megfelelő hordozóban. Erről a technikáról már kimutatták, hogy hatékony a hagyományos immunglobulinokhoz, így a szakterületen ismert liofilezési és helyreállítási technikát alkalmazhatjuk. Azok, akik a szakterületen jártasak, tudják, hogy a liofilezés és a helyreállítás az antitest aktivitásban változó mértékű csökkenéshez vezethet (pl. a hagyományos immunglobulinoknál az IgM antitestek nagyobb aktivitásvesztéseket mutatnak, mint az IgG antitestek), és hogy a felhasználási szinteket kell esetleg beállítani, hogy kiegyenlítsük ezt.

A jelen monoklonális antitesteket, peptideket vagy ezek koktéljait be lehet adni HIV fertőzések megelőző és/vagy terápiás kezelésére. A gyógyászati alkalmazásban a kompozíciót olyan pacienseknek adjuk be, aki már fertőzött HIV-vel, ez esetben olyan mennyiségben, amely gyógyít vagy legalábbis részlegesen feltartóztatja a fertőzést és ennek komplikációit. Az ennek a feladatnak a teljesítéséhez alkalmas mennyiséget „terápiásan hatásos adag”-ként határozzuk meg. Ennél az alkalmazásnál a hatásos mennyiség függ a fertőzés súlyosságától és a beteg saját immunrendszerének állapotától, de ezt általában 1–200 mg antitest/kg testtömeg közti tartományban alkalmazzák legáltalánosabban, 5–25 mg/kg testtömegnek megfelelő adagokban. Figyelembe kell venni, hogy a jelen találmány szerinti anyagokat általában a betegség súlyos állapotában alkalmazzák, vagyis életveszélyes vagy életveszélyessé válható betegekben. Ilyen esetekben lehetséges, és ha a kezelő orvos úgy érzi, kívánatos ezeknek az antitesteknek jelentős feleslegét beadni.

Megelőző alkalmazásokhoz a jelen találmány szerinti peptideket, antitesteket vagy ezek koktélját tartalmazó kompozíciókat olyan pacienseknek adjuk be, akik még nincsenek fertőzve HIV-vel, de esetleg nemrégiben ki voltak téve, vagy úgy véljük, hogy ki voltak téve a vírusnak; ez esetben növelni akarjuk a paciens ellenállását az ilyen lehetséges fertőzések ellen, vagy vakcinálni akarjuk a vírus ellen. Az ehhez szükséges mennyiséget „megelőzéshez hatásos adag”-ként határozzuk meg. Az ilyen alkalmazásnál a pontos mennyiség ismét csak függ a beteg egészségi állapotától és immunitásának általános szintjétől, de ez az adag általában 0,1 mg–25 mg/kg, elsősorban 0,5 mg–2,5 mg/kg közti tartományban van.

A kompozíciók egyedi vagy többszöri beadását a dózisszintekkel és adagolási menetrenddel lehet szabá-

lyozni, ezt a kezelőorvos választja ki. Mindenesetre a gyógyászati kiszerezéseknek a jelen találmány szerinti antitesteknek olyan mennyiségét kell szolgáltatniuk, amely elegendő a beteg hatékony kezeléséhez. Ezen kívül a jelen találmány szerinti monoklonális antitestek cél-specifikus hordozó molekulaként is nyerhetnek alkalmazást. Egy antitest lehet kötve egy toxinhoz, hogy immunotoxin keletkezzen, vagy radioaktív anyaghoz vagy gyógyszerhez, hogy radiógyógyászati vagy gyógyászati készítmény képződjen. Immunotoxinok és radiógyógyászati szerek előállításának módszerei jól ismertek [lásd pl.: *Cancer Treatment Reports* 68, 317 (1984)].

Az is lehetséges, hogy jelen találmány szerinti monoklonális antitestek és humán T-sejt aktivátorok (pl. monoklonális antitestek CD3 antigén ellen vagy T-sejteken levő  $F_c$  gamma receptorok ellen) heteroaggregátuma képessé teszik a humán T-sejteket vagy  $F_c$ -gamma hordozó sejteket (pl. K-sejteket vagy neutrofileket), hogy elpusztítsák a HIV-vel fertőzött sejteket antitestfüggő, sejt-közvetített citolízissel (ADCC). Az ilyen heteroaggregátumokat pl. az anti-HIV antitestek kovalens keresztkötésével lehet összeállítani az anti-CD3 antitestekhez, az N-szukcinimidil-3-(2-piridil-ditio)-propionát heterobifunkciós reagenst alkalmazva, amint ezt Karpinsky és munkatársai leírták [*J. Exp. Med.* 160, 1686 (1984)]; ez az irodalmi hely a jelen bejelentésbe referenciaként van beépítve.

Maguk a szóban forgó peptid-kompozíciók is találhatnak alkalmazást terápiásan, ahol a beadás a HIV csökkenését vagy eltűnését eredményezi egy fertőzött gazdaszervezetben. Ezeket a kompozíciókat, mint pl. a 29. peptidet, a blokkoló peptideket, és a 126. peptidet megfelelő fiziológiai hordozókban intravénásan, szubkután, intramuszkulárisan, intraperitoneálisan stb. lehet beadni. A különböző hordozók között találjuk a foszfátal pufferolt fiziológiás sóoldatot, vizet, kálium-kloridot, nátrium-laktátot stb. A peptidek koncentrációja széles határok közt változhat, végső felhasználásuktól, aktivitásuktól, és a beadás módjától függően. A peptidek előnyösen amidálva vannak a  $-COOH$  terminálison, formilve vannak az  $-NH_2$  terminálison, vagy más gyógyászatilag elfogadható származék formájában vannak. Blokkoló peptidek hozzáadása semlegesítő HIV területet utánzó peptidekhez és/vagy a jelen találmány szerinti, fajlagosan reaktív antitestekhez jelentősen megnövelt gyógyászati hatékonyságot eredményez. Más anti-HIV szereket is bele lehet foglalni a kiszerezésekbe (a monoklonális antitestektől eltérő szereket, amelyek kötik a peptideket), pl. 3'-azido-3'-deoxi-timidin; 2',3'-dideoxi-citidin; 2'3'-dideoxi-2'3'-didehidro-citidin stb.

#### *Monoklonális antitestek alkalmazása immun-affinitás tisztításban*

gp110-et vagy más antigén determinánsokat, különösen biológiailag kifejezett rekombináns fúziós fehérjékből vagy tenyésztett HIV lizátumaiból vagy extraktumaiból kapott antigén determinánsokat, tartalmazó polipeptidre fajlagos monoklonális antitestek különösen előnyösek a tisztítási munkamenetben való felhasználáshoz. Általában az antitestek  $10^8$ – $10^{12}$  M nagyságrendű

affinitás asszociációs konstanssal bírnak. Az ilyen antitesteket lehet alkalmazni rekombináns kifejező rendszer tenyészközegéből származó rekombináns fúziós fehérjék tisztítására, ha a kifejezett fehérje kiválasztódik, vagy a szétzúzott biológiai kifejező rendszer komponenseiből származó fehérjék tisztítására, ha a fehérje nem választódik ki. Általában a monoklonális antitestek, amelyek képesek gp110-zel vagy más antigén determinánsokkal reagálni, valamely szubsztrátumon vagy támasztó anyagon vannak rögzítve vagy immobilizálva. A HIV antigén determinánsokat tartalmazó oldatot azután érintkezésbe hozzuk az immobilizált antitesttel olyan körülmények között, amely alkalmas immunkomplexek képzésére az antitest és a gp110 antigén determinánst tartalmazó polipeptidek között. A nem kötött anyagot elkülönítjük a kötött immunkomplexektől, amely komplexeket vagy gp110 antigén fragmentumokat azután elkülönítjük a hordozótól.

Tipikusan a monoklonális antitesteket durván tisztítjuk aszcitesz folyadékból vagy sejtenyészet felülúszóból, mielőtt hordozóhoz rögzítenénk. Az ilyen eljárások jól ismert azok számára, akik a szakterületen jártasak, és magukban foglalhatják a semleges sókkal végzett frakcionálást nagy koncentrációknál. Más módszerek, pl. DEAE kromatográfia, gélszűrési kromatográfia, preparatív gélelektroforézis, vagy A–fehérje affinitás kromatográfia, szintén alkalmazhatók a monoklonális antitestek tisztítására immunadszorbensként való felhasználásuk előtt.

A hordozónak, amelyhez a monoklonális antitesteket immobilizáljuk, a következő általános jellemzőkkel kell bírnia: (a) gyenge kölcsönhatások fehérjékkel általában, hogy minimálisak legyenek a nem fajlagos kötések; (b) jó átfolyási jellemzők, amelyek lehetővé teszik az átáramlást a nagy molekulatömegű anyagokon keresztül; (c) rendelkezik olyan kémiai csoportokkal, amelyeket lehet aktiválni vagy módosítani úgy, hogy a monoklonális antitestek kémiai kötése lehetővé váljon; (d) fizikai és kémiai stabilitás olyan körülmények között, amelyet a monoklonális antitestek kapcsolásához alkalmazunk; és (e) stabilitás az antigén adszorpciójához és elválásához szükséges feltételek között és puffer-alkotórészeknél. Általánosan használt hordozók az agaróz, polisztirol-származékok, poliszacharidok, poliakrilamid gyöngyök, aktivált cellulóz, üveg stb. Különböző kémiai módszerek léteznek antitestek rögzítésére a hordozó szubsztrátumokhoz, lásd pl.: Cuatrecasas P.: *Advances in Enzymology* 36, 29 (1972). A jelen találmány szerinti antitesteket közvetlenül lehet rögzíteni a hordozóhoz; vagy más módszer szerint, a rögzítést kapcsolón vagy térköz-tartó (spacer) karon keresztül végezhetjük.

A monoklonális antitesteknek kromatográfias hordozókhoz való immobilizálásához szükséges általános feltételek a szakterületen jól ismertek. Lásd pl. Tijssen P.: *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay* /1985/; ezt az irodalmi helyet referenciaként építjük be a jelen bejelentésbe. A tényleges kapcsolási eljárások valamelyest függenek a kapcsolandó antitest jellemzőitől és típusától. A monoklonális antitestek olyan jellemzőkkel bírnak, amelyek tételről tételre állandók, ezáltal lehetővé

válí, hogy ezeket a feltételeket optimalizáljuk. A rögzítés tipikusan kovalens kötéseken keresztül történik.

A HIV vírus kivonatainak vagy lizátumainak szuszpenzióját, vagy tenyésztett biológiai kifejező rendszerből kapott felülcsúzóit, vagy a széttűzött sejtek szuszpenzióját azután hozzáadjuk az elkülönítő (szeparáló) mátrixhoz. A keveréket olyan körülmények között és annyi ideig inkubáljuk, amely alkalmas arra, hogy immunkomplex képződés történjék, az időtartam általában legalább 30 perc, leginkább 2–24 óra. A gp110 antigén részeivel rendelkező polipeptideket tartalmazó immunkomplexekeket azután elkülönítjük a keveréktől. Tipikusan a keveréket pl. elúcióval távolítjuk el, és a kötött immunkomplexekeket erőteljesen mossuk adszorpciós pufferral. Az immunkomplexekeket azután eluáljuk az elkülönítő mátrixról, olyan eluáló szert alkalmazva, amely az adott, alkalmazandó hordozóval összeférhető; ilyen eluáló szerek jól ismertek azok számára, akik a szakterületen jártasak. A gp110-et vagy más antigén részeket tartalmazó polipeptideket szelektíven lehet eltávolítani. Így pl. olyan peptideket, amelyek egy, az antitestek által felismert epitópot tartalmaznak, lehet alkalmazni, hogy versengjenek az antitest kötőhelyért; ez alternatív elúciós technikát jelent, amelyet enyhe elúciós körülmények között lehet alkalmazni. A gp110 antigént tartalmazó, szelektíven adszorbeált polipeptidet úgy lehet eluálni egy antitest affinitás adszorbensről, hogy változtatjuk a puffer pH-ját és/vagy ionerősségét. Kaotróp szerek is alkalmazást nyerhetnek a kötött antigén eltávolításában. Egy kaotróp szer kiválasztása, koncentrációja és a további eluálási körülmények függenek az antitest-antigén kölcsönhatás jellemzőitől, de ha egyszer ezeket meghatároztuk, további változásnak ezeket nem kell kitenni, amelyek pl. általában szükségesek a poliklonális affinitás-szeparációs rendszerekben.

Az eluált anyag igényelheti a beállítást fiziológiás pH-ra, ha kis vagy nagy pH-jú vagy ionerősségű puffereket alkalmazunk a kötött gp110 antigének elkülönítésére a szeparációs mátrixtól. Dialízis vagy gelszűrő-kromatográfia szintén szükséges lehet az eluáló szerben alkalmazott fölösleges sók eltávolítására, hogy lehetőségessé váljék a gp110 vagy gp110 antigén fragmentumait tartalmazó polipeptidek helyreállítása natív konformációkra.

Ennek a találmánynak a módszere pl. lényegesen tisztított gp110-et vagy ennek antigén fragmentumait tartalmazó polipeptideket termel, vagy természetesen állítva elő fertőzött sejtenyészetek révén, vagy baktériumok, élesztők, vagy tenyésztett rovar- vagy emlős sejtek rekombináns kifejező rendszerei révén. A gp110 és fragmentumai vagy más tisztított fehérjék tipikusan több, mint 50% tisztaságúak, de inkább legalább 75% tisztaságúak, gyakran több, mint 95%–99% tisztaságúak. Ezek a molekulák azután további felhasználást nyerhetnek az alkalmazási területek széles választékában.

A HIV gp110 fehérjék, ezek antigén fragmentumait tartalmazó polipeptidek, vagy más, lényegében sokféle alkalmazási területen használhatók fel, beleértve az AIDS aleggység vakcina kiszerezéseket, amelyekben az immunogén pl. gp110 vagy ennek semlegesítő területe antigén determinánsainak hatásos adagját tartalmazza. A kiszere-

elés más komponensei közt lehetnek HIV fehérjék vagy glikoproteinek olyan antigén részei, amelyek stimulálják antitest termelését (előnyösen semlegesítő antitestekét) egy immunizált gazdaszervezetben, amely antitestek képesek védelmet nyújtani HIV által történő későbbi fertőzések ellen.

#### *Monoklonális antitestek diagnosztikai alkalmazása*

A jelen találmány szerinti monoklonális antitestek alkalmazásak diagnosztikai célokra is. Ezek lehetnek jelzetek vagy jelzetlenek erre a célra. Tipikusan a diagnosztikai vizsgálatok egy olyan komplex keletkezésének kimutatásával járnak együtt, amely a monoklonális antitest egy HIV antigénhez való kötődése révén jön létre. Ha az antitestek jelzetlenek, akkor pl. agglutinációs vizsgálatokban nyerhetnek alkalmazást. Ezen kívül jelzetlen antitesteket lehet alkalmazni más, jelzett antitestekkel („második antitestek”) kombinálva, amelyek reaktívak a monoklonális antitestre, ilyenek pl. immunglobulinokra fajlagos antitestek. Egy másik módszer szerint a monoklonális antitesteket közvetlenül lehet jelezni. Jelzések széles választéka alkalmazható, pl. radionuklidok, fluoreszcens anyagok, enzimek, enzimszubsztrátumok, enzim kofaktorok, enzim-inhibitorok, ligandumok (főleg haptének), stb. Immunoassay-k számos típusa áll rendelkezésre, csak példa kedvéért említjük meg azokat, amelyek az alábbi lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban található leírva: 3,817,827; 3,850,752; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; és 4,098,876; mindezek az irodalmi helyek a jelen bejelentésbe referenciaként vannak beépítve.

Általában a jelen találmány szerinti monoklonális antitesteket és peptideket enzim immunoassaykban alkalmazzák, ahol pl. a szóban forgó antitesteket, vagy más fajokból származó második antitesteket, valamilyen enzimhez konjugálják. Amikor egy HIV antigéneket tartalmazó biológiai mintát, pl. emberi vérszérumot, nyálát, ondót, hüvelyváladékot, vagy vírussal fertőzött sejtenyésztet szuszpenziót, egyesítünk a szóban forgó antitestekkel, kötés jön létre az antitestek és azok között a molekulák között, amelyek a kívánt epitópot mutatják. Ilyen fehérjéket vagy vírus részecskéket lehet azután elkülöníteni a nem kötött reagensektől, és egy második antitestet (valamilyen enzimmel jelzettet) lehet hozzáadni. Ezután az antigénhez fajlagosan kötött antitestenzim konjugátumok jelenléteit meghatározzuk. Más hagyományos technikák is jól ismertek azok számára, akik a szakterületen jártasak.

Készleteket is tudunk nyújtani a szóban forgó antitestek alkalmazásával a HIV fertőzés kimutatására vagy HIV antigén jelenlétének kimutatására. Így a jelen találmány szerinti, szóban forgó monoklonális antitest kompozíciókat szolgáltathatjuk, általában liofilezett formában, vagy egyedül, vagy HIV más epitopjaira fajlagos további antitestekkel együtt. Az antitestek, amelyek lehetnek jelzéshez konjugálva, vagy lehetnek jelzetlenek, a készletekben együtt vannak pufferekkel, pl. trisz-szel, foszfáttal, karbonáttal stb., stabilizáló anyagokkal, biocidokkal, közömbös fehérjékkel, pl. szarvasmarha szérum albuminnal vagy hasonlókkal. Ezek az anyagok általá-

ban kevesebb, mint 5 tömeg% mennyiségben vannak jelen az aktív antitest mennyiségéhez viszonyítva, és általában kevesebb, mint 0,001 tömeg% össz mennyiségben vannak jelen, ismét csak az antitest koncentrációhoz viszonyítva. Gyakran kívánatos, hogy a készletben legyen jelen közömbös kötőanyag vagy töltőanyag, hogy higítsák az aktív hatóanyagot, ahol a töltőanyag a teljes kompozíció mintegy 1%–99% közti mennyiségében lehet jelen. Ahol a monoklonális antitest kötésére képes második antitestet alkalmazunk, ez általában egy külön fiolában van jelen. A második antitest tipikusan valamilyen jelzéshez van konjugálva, és hasonló módon van kiserelve, mint a fentebb leírt antitest kiserelések.

A gp110 vagy p25 antigének vagy a teljes vírus kimutatása különböző biológiai mintákban a HIV vírussal való folyamatban levő fertőzés diagnosztizálásához nyerhet alkalmazást. Biológiai minták lehetnek (de nemcsak ezekre korlátozódnak) vérszérum, nyál, ondó, szövetmetszet minták (agy, bőr, nyirokcsomók, lép stb.), sejtenyészet felülűszók, szétzúzott eukarióta és bakteriális kifejező rendszerek, és hasonlók. A vírus jelenlétét úgy vizsgáljuk, hogy a monoklonális antitestet a biológiai mintával inkubáljuk olyan körülmények között, amelyek immunkomplex képződéséhez vezetnek, majd a komplex képződését kimutatjuk. Az egyik kiviteli módban a komplex képződését a monoklonális antitesthez kötődni képes valamely második antitest alkalmazása révén mutatjuk ki, ahol a második antitest tipikusan valamilyen jelzéshez van konjugálva és hasonlóképpen van kiserelve, mint a fentebb leírt antitest kiserelések. Egy másik kiviteli módban a monoklonális antitestet szilárd fázisú rögzítő anyaghoz kötjük, amelyet azután érintkezésbe hozunk a biológiai mintával. Inkubálási lépést követően jelzett monoklonális antitestet adunk hozzá, hogy kimutassuk a kötött antigént.

#### *Szintetikus peptidok előállításának és felhasználása*

Új peptidokat nyújtunk a jelen találmányban, amelyek többek között, immunológiai utánoznak HIV retrovírusok által kódolt fehérje epitopokat, elsősorban a gp110et vagy p25-öt kódoló vírus genom *env* illetve *gag* területén belül kódolt epitopokat. Hogy kiegyenlítsük a törzsről törzsre való variációkat különböző izolátumok között, konzervatív helyettesítéshez beállításokat végezhetünk, valamint szelekciót végezhetünk azok közül a változatok közül, ahol nem konzervatív helyettesítések szerepelnek. Ezeket a peptidokat immunogénként lehet alkalmazni, hogy gátolják vagy megszüntessék a HIV antigén termelést in vitro vagy in vivo, valamint a vírus vagy a vírus elleni antitestek kimutatására lehet alkalmazni fiziológiai mintákban. A munkamenet természetétől függően a peptidokat össze lehet kapcsolni hordozóval vagy más anyagokkal, jelzettekkel vagy nem jelzettekkel, vagy lehet szilárd hordozóhoz rögzíteni stb.

Az egyik kiviteli módban a szóban forgó peptidok a vírus gp110 területéből származnak. Különösen érdekesek azok a területek az *env* nyitott leolvadó kereten belül, amelyek a mintegy 6688. bázispártól (bp) a mintegy 6750. bp-ig és a mintegy 7246. bp-tól a mintegy 7317. bp-ig terjednek.

A szóban forgó peptidok, beleértve a blokkoló peptidokat, magukban foglalnak legalább 5, néha 6, néha 8, néha 20, néha 21, általában kevesebb, mint 50, még általánosabban kevesebb, mint 35, és előnyösen kevesebb, mint 25 aminosavat, belefoglalva egy HIV retrovírus által kódolt szekvenciába. Kívánatosan a peptid legyen olyan kicsiny, amilyen lehetséges, de tartsa meg mégis a nagyobb peptid lényegében teljes immunreaktivitását vagy vírusellenes aktivitását. Néhány esetben kívánatos lehet egyesíteni két vagy több oligopeptidet, amelyek nincsenek átfedésben, így képeznek egyedi peptid-szerkezetet, vagy lehet egyes peptidekként alkalmazni ezeket egy időben; így ezek külön-külön vagy együtt azonos, szülőkre való érzékenységet nyújtanak.

A peptidokat lehet módosítani konzervatív vagy nem konzervatív helyettesítések bevitelével a peptidbe; általában az aminosavak számának 20%-ánál kevesebbet, még általánosabban 10%-ánál kevesebbet cserélünk. Azokban a helyzetekben, ahol a területeket polimorfnak találjuk, kívánatos lehet megváltoztatni egy vagy több adott aminosavat, hogy hatékonyabban utánozzák a különböző retrovírus törzsek különböző epitopjait. Több esetben abból a célból, hogy kémiai stabilitást biztosítsunk, a metionint helyettesíthetjük norleucinnal (Nor).

Meg kell érteni, hogy a jelen találmányban alkalmazott peptidnek nem szükséges azonosnak lenni semmiféle adott HIV polipeptid szekvenciával, feltéve, hogy a szóban forgó anyag képes immunológiai versengésre a HIV retrovírus legalább egy törzsének fehérjéivel. Ezért a szóban forgó peptidok különböző változások tárgyai lehetnek, ilyen változások pl. a beiktatások, kiiktatások és helyettesítések, akár konzervatívok, akár nem-konzervatívok, ahol az ilyen változások bizonyos előnyöket adnak az alkalmazáshoz. A konzervatív helyettesítések révén az alábbi csoportokon belül irányunk elő helyettesítéseket: gly, ala, val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; phe, tyr; és nor (norleucin), met. Általában a szekvencia nem különbözik 20%-nál nagyobb mértékben egy HIV retrovírus legalább egy törzsének szekvenciájától, kivéve ahol további aminosavakat adhatunk bármelyik véghez abból a célból, hogy egy „kar”-t létesítsünk, amellyel a jelen találmány szerinti peptidet hagyományos módon immobilizálni lehet. A karok általában legalább egy aminosav hosszúságúak, és lehetnek 50 vagy több aminosav hosszúságúak, leginkább azonban 1–10 aminosav hosszúságúak.

Annak a peptidnek, amelyben az aminosav szekvencia aminosavak helyettesítése, hozzáadása vagy kiiktatása révén módosul, meg kell tartania a nem módosított peptidok lényegében teljes immunreaktivitását vagy vírusellenes aktivitását; ezeket hagyományos módon lehet mérni különböző vizsgálati technikákkal, amelyeket itt leírunk. Egy vagy több aminosav d-izomer formáját is lehet alkalmazni, ha kívánatos, biológiai tulajdonságok, mint pl. aktivitás, elbomlás sebessége stb. módosítása érdekében.

Ezen kívül egy, két vagy több aminosavat adhatunk egy oligopeptid vagy peptid végeihez, hogy könnyítést nyújtsunk egyik peptidnek másik peptidhez való kapcsolásához, vagy nagyobb peptidhez vagy hordozóhoz való

kötéshez abból a célból (amelyet a későbbiekben tárgyalunk), hogy a peptid vagy oligopeptid fizikai vagy kémiai tulajdonságait módosítsuk.

Aminosavként tirozint, ciszteint, lizint, glutaminsavat, vagy aszparaginsavat vezethetünk be a peptid vagy oligopeptid C- vagy N-terminálisánál, hogy hasznos funkció csoportokat biztosítsunk a kapcsoláshoz. A cisztein különösen előnyös a más peptidekhez való kovalens kapcsolat megkönnyítésére vagy polimerek képzéséhez oxidáció révén.

Ezen kívül a peptid vagy oligopeptid szekvenciák különbözhetnek a természetes szekvenciától olyan szekvenciával, amely terminális-NH<sub>2</sub> acilezéssel, pl. acetilezéssel, vagy tioglikolsav amidálással, vagy pl. ammóniával vagy metil-amminnal végzett terminális karboxil amidálással van módosítva, így biztosítva stabilitást és megnövekedett hidrofobicitást egy hordozóhoz vagy más molekulához való kapcsoláshoz vagy kötéshez, vagy polimerizáláshoz.

Így pl. a fentiekben ismertetett I-VIII és IX-XV peptidekben, ahol Y és Y' van jelen, egyik létező előnyös kiviteli mód, amikor Y vagy Y' egy vagy több cisztein gyököt tartalmaz, vagy egy vagy több cisztein gyök kombinációját tartalmazza térkitöltő (spacer) aminosavakkal. A glicin különösen előnyös térkitöltő. Előnyös peptidek az oxidatív polimerizálásban való felhasználásban azok, amelyekben Y vagy Y' legalább két cisztein gyököt képvisel. Amikor két cisztein gyök van jelen a peptidnek ugyanazon a végén, olyan előnyös kiviteli mód létezik, amikor a cisztein gyököket elkülönítjük egymástól egy-három térkitöltő aminosavgyökkel, előnyösen glicinnel. A cisztein gyökök jelenléte lehetővé teszi dimerek keletkezését és/vagy az így létrejövő peptid hidrofobicitásának megnövekedését, ez pedig megkönnyíti a peptid immobilizálását szilárd fázisban vagy immobilizált mérő rendszerekben.

Különösen érdekes a terminális aminocsoportok acilezéséhez alkalmazott ciszteinek vagy tioglikolsavak merkaptán csoportjainak alkalmazása két vagy több peptid vagy oligopeptid vagy ezek kombináció összekapcsolásához diszulfid kötés vagy hosszabb kötések révén, így olyan polimereket képezve, amelyek több epitopot tartalmaznak. Az ilyen polimereknek az az előnyük, hogy megnövekedett immunológiai reaktivitásuk van. Ahol különböző peptideket alkalmazunk a polimer felépítéséhez, ezek birtokában lesznek annak a további képességnek, hogy olyan antitesteket indukáljanak, amelyek immunreakcióba lépnek különböző HIV izolátumok sokféle antigén determinánsával.

Hogy antigén polimerek (szintetikus multimerek) keletkezését érjük el, olyan anyagokat alkalmazhatunk, amelyek bisz-halogén-acetil csoportokkal, nitro-aril-halogenidekkel stb. rendelkeznek, ahol a reagensek tiocsoportokra fajlagosak. Így a különböző peptidek vagy oligopeptidek két merkaptocsoportja közti kapcsolat lehet egyedi kötés vagy lehet egy kötőcsoport legalább 2, általában legalább 4, nem több, mint kb. 16, és általában nem több, mint 14 szénatommal.

A szóban forgó peptidet lehet oldható makromolekuláris hordozóhoz (pl. nem kevesebb, mint 5 kdaltan)

kötve alkalmazni. Kényelmesen a hordozó lehet poli(aminosav), vagy természetben előforduló, vagy szintetikus, amellyel az antitestek nem valószínű, hogy találkoznak a humán szérumban. Az ilyen hordozókra példák a poli-L-lizin, kulcslyuk-kagyló (keyhole limpet) hemocianin, tiroglobulin, albuminok, pl. szarvasmarha szérumban, tetanusz toxoid stb. A hordozó kiválasztása elsődlegesen az antigén szándékozott végleges alkalmazásától függ, valamint a kényelmes kezelhetőségtől és a hozzáférhetőségtől.

Az ilyen konjugátumoknál legalább egy szóban forgó peptid legalább egy molekulája kell, hogy jelen legyen a makromolekulában, és nem több mint mintegy 1 molekula a makromolekula 0,5 kdaltinjára, általában nem több, mint 1 molekula a makromolekula 2 kdaltinjára. Egy vagy több különböző peptidet lehet kapcsolni ugyanahhoz a makromolekulához.

A kapcsolat módja hagyományos, olyan reagenseket alkalmazva, mint p-maleimido-benzoosav, p-metil-ditio-benzoosav, maleinsav-anhidrid, borkósav-anhidrid, glutaraldehid stb. A kapcsolat történhet az N-terminálison, C-terminálison, vagy egy olyan helyen, amely a molekula végei között van. A szóban forgó peptidből származékokat lehet készíteni kapcsolással, vagy lehet kapcsolni úgy is, hogy egy hordozóhoz van kötve.

Különböző vizsgáló és mérő munkameneteket, amelyek ismerősek azok számára, akik a szakterületen jártasak, lehet alkalmazni vagy a retrovírus eredetű fehérjék elleni antitestek jelenlétének kimutatására, vagy maguknak a retrovírus eredetű fehérjéknek a kimutatására. Különösen fontos a peptidek alkalmazása jelzett reagensként, ahol a jelzés kimutatható jelet biztosít vagy a peptid közvetlen vagy közvetett kötését biztosítja valamely felülethez, ahol a peptid elleni antitest a mintában a felületen levő peptidhez kötötté válik. A peptidhez kötött humán antitest jelenlétét azután úgy lehet kimutatni, hogy humán immunglobulinra (normálisan mind humán IgM-re, mind humán IgG-re) fajlagos xenogén antitestet alkalmazunk, vagy immunkomplexekre, pl. S. aureus A-fehérje R<sup>L</sup>-faktorára fajlagos jelzett fehérjét alkalmazunk.

A mérési-vizsgálati technikára jellemző minta-tároló alkalmazása, pl. mikrotitráló lemezek üregeinek alkalmazása, ahol a szóban forgó polipeptidet vagy konjugátumait a tárolóedény fenekéhez és/vagy falaihoz adszorbeáljuk kovalensen vagy nem kovalensen. A mintát, normálisan emberi vért vagy szérumot, hozzávetőlegesen puffertolt közegben, a tárolóedénybe helyezük és megfelelő időt biztosítunk, hogy komplex képződése lehetővé váljék a polipeptid(ek) és a mintában levő bármilyen rokon antitest között. A felülűszót eltávolítjuk és a tárolóedényt mossuk, hogy eltávolítsuk a nem fajlagosan kötött fehérjéket. Egy jelzett fajlagos kötő fehérjét, amely fajlagosan köt a komplexhez, pl. mint a xenogén antiszérumban humán immunglobulinhoz, alkalmazunk a kimutatáshoz.

A peptidet sokféle módon elő lehet állítani. A peptidet, viszonylag rövid mérete miatt, lehet oldatban vagy szilárd rögzítőanyagon szintetizálni hagyományos technikákkal összhangban. Különböző automatikus szinteti-

záló berendezések ma már kereskedelmi forgalomban kaphatók és ismert munkamenetekkel összhangban alkalmazhatóak. Lásd pl. Stewart és Young: Solid Phase Peptide Synthesis (Szilárd fázisú peptidszintézis) 2. kiadás, Pierce Chemical Co. (1984); és Tam és munkatársai: J. Am. Chem. Soc. 105, 6442 (1983).

Egy másik módszer szerint hibridizációs DNS technológiát lehet alkalmazni, ahol szintetikus gént állíthatunk elő olyan egyedi szálakat alkalmazva, amelyek a polipeptidet kódolják, vagy ezek lényegében komplementer szálait, ahol az egyedi szálak átfednek és összehozhatók valamilyen összeforrasztó közegben, hogy hibridizáljanak. A hibridizált szálakat lehet azután ligálni a megfelelő végek kiválasztásával, hogy a komplett gént alakítsák ki, és a gént kifejező vektorokba lehet iktatni, amelyek ma könnyen beszerezhetőek. Lásd pl. Maniatis és munkatársai: Molecular Cloning (Molekuláris klónozás), Laboratóriumi kézikönyv, CSH, Cold Spring Harbor Laboratory (1982). A peptidet kódoló vírus genom területet lehet klónozni hagyományos rekombinációs DNS technikákkal is, majd kifejezni (lásd Maniatis fentebb idézett munkáját).

A HIV LAV<sub>BRU</sub> és ARV2 izolátumaiból származó DNS kódoló szekvenciák, amelyeket a peptidok kifejezéséhez alkalmazhatunk, magukba foglalják az alábbiakat:

```
LAVBRU 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 GLA TTT CAT ACA
      ACA GGA AGA ATA ATA GGA GAT ATA AGA AAA GCA
      CAT TGT.
```

Egy szekvenciából fragmentumokat alkalmazhatunk peptid fragmentumok kifejezéséhez, konzervatív báziscseréket végezhetünk, ahol a módosított kodon(ok) azonos aminosavakat kódolnak, vagy nem konzervatív változásokat hajthatunk végre a kódoló szekvenciában, ahol az így létrejövő aminosav jelenthet konzervatív vagy nem konzervatív változást az aminosavszekvenciában; ezt a későbbiekben megtárgyaljuk.

A kódoló szekvenciát kiterjeszthetjük akár az 5'-, akár a 3'-terminálnál, vagy mindkét végnél, hogy a peptidet megnöveljük, miközben epitop helye(i) megmarad(nak). A kiterjesztés kart szolgáltathat kapcsoláshoz, pl. valamilyen jelzéshez, mint pl. enzimhez, két vagy az összes peptid egyesítéséhez azonos láncban, antigén aktivitás nyújtásához, vagy a klónozásnál kényelmes restriktions helyekhez stb.

A DNS szekvenciát magát, vagy fragmentumait, vagy nagyobb szekvenciákat általában legalább 15 bázissal, előnyösen legalább 18 bázissal alkalmazhatjuk nukleotid vizsgáló mintaként retrovírus RNS vagy provírus RNS kimutatására, vagy homológ területek azonosítására klónozáshoz vagy szekvenciaelemzéshez. Számos technikát írtak le, pl. a Grunstein-Hagness techni-

kát, Southern technikát, Northern technikát, a „dot-blot” (pont-folt) technikát, valamint más módszereket is, pl. azt, amely a 4,358,535 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban le van írva; ez utóbbit a jelen bejelentésbe referenciaként építjük be.

A szóban forgó peptidokat, beleértve a blokkoló peptidokat, és analógjaikat magukban alkalmazhatjuk, vagy kombinációban vakcinákban. Hasonlóképpen anti-idiotípus antitesteket, azaz olyanokat, amelyek reaktívak a jelen találmány szerinti antitestek idiotípusaival és ezáltal a HIV semlegesítő területeit utánzó epitopokat tartalmaznak, szintén alkalmazhatunk vakcinákban. A peptidokat vagy anti-idiotípus antitesteket kényelmes módon lehet kiszerezni, általában 1 µg–20 g/kg gazdaszervezet koncentrációban. Fiziológiailag elfogadható közeget lehet alkalmazni hordozóként, pl. steril vizet, fiziológiás sóoldatot, foszfáttal puffertolt fiziológiás sóoldatot, és hasonlókat. Adjuvánsokat is lehet alkalmazni, pl. alumíniumhidroxid gél, felületaktív anyagokat, mint lizolecitint, többértékű polioloikat, polianionokat, peptidokat, fehérjéket (pl. diftéria- vagy kolera toxint) és olajemulziókat. A peptidokat be lehet építeni liposzómákba is, vagy lehet konjugálni poliszacharidokhoz, polipeptidekhez, vagy polimerekhez vakcina kiszerezésekben való felhasználáshoz. A beadás lehet injekció formában, pl. intramuszkulárisan, peritoneálisan, szubkután, intravénán stb. Immunogén szempontból hatásos dózis beadása történhet egyszerre vagy több időtartamban, általában 1–4 hetes időközökben. Az „immunogén szempontból hatásos dózis” a vakcinának az a mennyisége, amely elegendő immunválasz kiváltásához valamely gazdaszervezetben, amely által a gazdaszervezet megnövekedett fertőzödést mutat.

A jelen találmány más vonzatai és előnyei nyilvánvalóak lesznek az itt következő kísérleti leírásokból, amelyek példák segítségével írják le a találmányt. A példákat csak szemléltetés kedvéért adjuk meg, és nem korlátozás célját szolgálják.

#### 1. példa

##### Monoklonális antitestek kialakítása és jellemzése

Az I. példa olyan hibrid sejt vonalak kialakítását írja le, amelyek HIV burok-glikoproteinjeire fajlagos monoklonális antitesteket termelnek. A módszer magában foglalja LAV<sub>BRU</sub> lektinnel tisztított, lencse lektin agarózhoz kötött extraktumainak alkalmazását immunogénként. A monoklonális antitesteket, amelyeket ezt követően alakítunk ki a hibrid sejt vonalak révén, azzal jellemezzük, hogy képesek immunfoltot és radioimmun csapadékot képezni a tisztított LAV-ból származó gp110-zel, ezek biológiailag kifejezett rekombináns fúziós fehérjék. [A gp110 a HIV burok régóta ismert és szétterjedt eljárásokkal előállítható glikoproteinje; előállításával többek között az alábbi irodalmi hely foglalkozik: Robey és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7023 (1986)] Azok a monoklonális antitestek, amelyek a gp110-en levő epitopokhoz kötődnek, reaktívak ELISA-ban szétzúzott teljes vírussal, fúziós fehérjékkel és szintetikus peptidokkal is, és reagálnak a teljes vírussal közvetett fluoreszcens vizsgálatokban.

A monoklonális antitestet termelő hibrid sejtvonalak kialakítására szolgáló munkamenet és az antitestek jellemzője az alábbi:

A 83 24 800 lajstromszámú nagy-britanniai szabadalmi leírásban ismertetett eljárás szerint fertőzött GEM sejtkekből /ATCC CRI 8904/ tisztított LAV vírust /a tisztítás részleteit később ismertetjük/ szétzúzunk 50 mmól/l trisz-t /pH 7,4/, 0,15mól/l NaCl-t, 1,0% aprotinint és 2% Nonidet P-40-et (NP-40) (oktil-fenoxi-polietoxi-etanol) tartalmazó oldatban. Az extraktumot kétszer tisztítjuk centrifugálással és 0,5% NP-40 tartalomra állítjuk be három térfogat, NP-40 nélküli szétzúzó puffer hozzáadásával. Lencse lektin Sepharose-t (Pharmacia, Piscataway, New Jersey, Amerikai Egyesült Államok) előmosunk NP-40 nélküli szétzúzó pufferban, majd kiegyensúlyozzuk adszorpciós pufferban [50 mmól/l trisz (pH 7,4), 0,15 mól/l NaCl, 1,0% aprotin, 0,5% NP-40]. A tisztított vírus extraktumokat a lencse lektin Sepharose-val adszorbeáljuk 40 °C hőmérsékleten 42 órán át. A nem adszorbeált anyagot feleslegben levő adszorpciós pufferral végzett mosással távolítjuk el. Az adszorbeált anyag eluálását 0,2 mól/l alfa-metil mannoziddal hajtjuk végre adszorpciós pufferban. Az eluátumot PBS-sel (foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat) szemben dializáljuk, hogy eltávolítsuk a cukrot és az anyagot újra adszorbeáljuk a lencse lektin Sepharose-ra.

A glikoprotein-lencse lektin Sepharose komplexet alkalmazzuk BALB/c egerek immunizálására három intraperitoneális injekcióval adjuváns nélkül, egymástól 2–3 hetenként adva. Az immunizálási munkamenet Godstein és munkatársai [Infect. Immun. 38, 273–281 (1982)] eljárását követi. A lépeket eltávolítjuk azokból az immunizált egerekből, amelyek demonstrálják a HIV glikoproteinjei elleni keringő antitesteket immunfoltképzéssel, RIP-pel és/vagy ELISA-val.

A sejtvonalak kialakításához alkalmazott munkamenet általában azok, amelyeket Kohler és Milstein leírt [Nature, 256, 495 (1985)], Goldstein L.C. és munkatársainak módosításával [Infect. Immun. 38, 277 (1982)]. Az immunizált egerekből kapott lép-eredetű B-limfocitákat NS-1 mielőma sejtekkel (ATCC TIB 18) fuzionáljuk, 40% (tömeg/térfogat) polietilénlikolt alkalmazva. A fúziót követően a sejtkeveréket újra szuszpendáljuk HAT tápközegben (RPMI-1640 tápközeg, 15% borjúembrió szérummal,  $1 \cdot 10^{-4}$  mól/l hipoxantinnal,  $4 \cdot 10^{-7}$  mól/l aminopterinnel és  $1,6 \cdot 10^{-5}$  mól/l timidinnel), hogy a hibrid sejtek növekedésére szelektáljunk, majd szétosztjuk 96 üreges mikrotenyészet lemezekre  $1-3 \cdot 10^6$  sejt/ml koncentrációval és 37 °C hőmérsékleten inkubálunk nedvesített atmoszférában, amely 6% CO<sub>2</sub>-t tartalmaz. A tenyészeteket olyan módon tápláljuk, hogy a felülúszó felét helyettesítjük friss HAT tápközeggel. Az üregeket fordított mikroszkópot alkalmazva figyeljük meg, keresve a sejtburjánzás jeleit, és amikor a sejtek megfelelő sűrűségűek, a felülúszókat átvizsgáljuk anti-LAV antitestre.

A LAV elleni antitestet termelő hibridsejtek tartalmazó üregeket ELISA-val azonosítjuk, a kötést mérve vagy a tisztított, egész szétzúzott vírushoz, vagy biológiailag kifejezett fúziós fehérjékhez. A szétzúzott vírust

alkalmazó ELISA vizsgálatokat LAV EIA lemezeken hajtjuk végre (Genetic Systems, Seattle, Washington). A lemezeket 37 °C hőmérsékleten 45 percig inkubáljuk sejttényészet folyadékokkal, majd háromszor mossuk foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldattal, amely 0,05% Tween20-at is tartalmaz (PBS-Tween).

Peroxidáz-kecske anti-egér IgG-t (1:2000 hígítás PBS-Tweenben; Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, Kalifornia) adunk hozzá (100 µl/üreg), és a lemezeket 45 percen át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk, és a fentiek szerint mossuk. Szubsztrátumot (0,025 mól/l citromsav, 0,05 mól/l nátrium-dihidrogén-foszfát, pH 5,0, amelynek 50 ml-e 14 mg o-fenilén-diamint és 10 ml hidrogén-peroxidot tartalmaz), adunk hozzá és a lemezeket 30 percig inkubáljuk szobahőmérsékleten, sötétben. A reakciót 3 n kénsavval állítjuk le, és a kalorimetriás reakciót kvantitatíven kiértékeljük automatizált mikrolemez leolvasóval. Azokat az üregeket, amelyek pozitív eredményeket adnak, határhígítással szubklónozzuk, fajlagosságra újra megvizsgáljuk, majd felhasználjuk,

Az így létrejövő hibrid sejtvonalak által kiválasztott monoklonális antitesteket tovább jellemezzük fajlagosságra és reaktivitásra immunfoltképzéssel, immunkicsapással, és ELISA-val, szétzúzott LAV vírust, rekombináns LAV fúziós fehérjéket és szintetikus LAV peptideket alkalmazva. Az összes antitesteket IgG<sub>1</sub> izotípusúknak határozzuk meg. A HIV-gp110-1, HIV-gp110-2 és HIV gp110-3 sejtvonalakat letétbe helyeztük az American Type Culture Collection-nál a jelen bejelentés benyújtása előtt, ezek az ATCC HB 9175, illetve HB 9176, illetve HB 9177 jelzést kapták.

A reaktivitásra vizsgált rekombináns fúziós fehérjéket előzőleg ENV2-nek, ENV3-nak, ENV4-nek és ENV5-nek neveztük. Az ENV2 fehérje a pENV2-ből (ATCC 53071) fejeződik ki, amely a LAV 6598. bázispárjától (bp) 7178 bp-jáig terjedő terület [Wain-Hobson és munkatársai számozása szerint, Cell, 44, 9 (1985)]; az ENV3 a pENV3-ből fejeződik ki (ATCC 53072), amely a LAV 7178. bp-tól 7698. bp-ig terjedő területet tartalmazza; az ENV4 a pENV4-ből fejeződik ki (ATCC 53073), ez a 7698. bp-tól a 8572. bp-ig terjedő területet tartalmazza; és az ENV5 a pENV5-ből fejeződik ki (ATCC 53074), amely az 5889. bp-tól 7698. bp-ig terjedő LAV-területet tartalmazza. A rekombináns fúziós fehérjék előállítását részletesen leírja az EP 201 716 lajstromszámú európai szabadalmi leírás.

#### Szintetikus peptidek összeállítása

Az I. peptidet (29.) és VIII. peptidet (110-2-2) benzilhidrilamin (polisztirol/divinil-benzol) gyantán (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Kalifornia) állítjuk össze. Az V. peptidet (177) t-butoxi-karbonil (Boc)-etil-benzil-cisztein-fenilacetamido-metil (PAM) polisztirol/divinil-benzol gyantán állítjuk össze. A fenti reakciókkal kapcsolatban utalunk az alábbi szakirodalomra: Stewart és Young: „Solid Phase Peptide Synthesis”, Pierce Chem. Co./kiadó/, Rockford, Illinois/1984/.

Szimmetrikus anhidrid kapcsolásokat hajtunk végre Applied Biosystems 430A szintetizáló berendezésben. Ciszteint adunk első gyökként mindkét peptidnél.

Aszparaginnál és glutaminnál diciklohexil-karbodiimid kapcsolásokat alkalmazunk hidroxibenzotriazol jelenlétében. Benzilalapú oldallánc védelmet és Boc alfa amin védelmet alkalmazunk.

Más rutinszerűen alkalmazott oldallánc-védelmek a Boc(formil)triptofán, Boc metionin-szulfoxid, Boc(tozil) arginin, Boc(metil-benzil) cisztein, Boc(tozil) hisztidin, Boc(klór-benzil-oxi-karbonil) lizin és Boc(bróm-benzil-oxi-karbonil) tirozin.

Amikor a peptideket radioaktívan jelezzük, ez az amino-terminálisnál végzett acetilezéssel történik  $^3\text{H}$ -ecetsavval és di-ciklohexil-karbodiimid fölöslegével. Az utóbbi két bekezdésben foglalt reakciókra vonatkozólag szintén a Stewart féle szakkönyvre utalunk.

A védőcsoport eltávolítása és a peptid lehasítása a gyantáról a Tam-féle „alacsony-magas” HF munkamenet szerint történik (Tam és munkatársai, fentebb idézett munka). Az extrahálás a gyantáról 5%-os ecetsavval történik, és az extraktumot gélszűrési kromatográfiának vetjük alá 5%-os ecetsavban.

A monoklonális antitestekkel való reaktivitásra vizsgált szintetikus HIV peptidek magukban foglalják a 29., 36., és 39. peptideket. A 29. peptidet a LAV<sub>BRU</sub> genom terület kódolja mintegy 6688. bp-től 6750. bp-ig; a 36. peptidet a mintegy 7246. bp-től 7317. bp-ig terjedő terület kódolja; és a 39. peptidet a mintegy 7516. bp-től 7593. bp-ig terjedő terület kódolja. A 36. és 39. peptidek részletesen le vannak írva a 4,629,783 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban.

A IX–XV blokkoló peptideket lényegében úgy állítjuk össze, amint fentebb leírtuk, metil-benzilhidrilamin (polisztirol/divinilbenzol) gyantán (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Kalifornia). Szimmetrikus anhidrid kapcsolásokat hajtunk végre Applied Biosystems 430A szintetizáló berendezésben. Aszparaginhoz diciklohexil-karbodiimidet alkalmazunk hidroxibenzotriazol jelenlétében. A védelemhez benzilalapú oldalláncot és Boc alfa-amin védelmet alkalmazunk, míg Boc(bróm-benzil-oxi-karbonil)-t alkalmazunk speciálisan tirozin oldalláncához. Az acetilezést, ha van ilyen, ecetsavanhidridet vagy jégecetet és dicikloheximidet alkalmazva hajtjuk végre. A védőcsoport eltávolítását és a peptid lehasítását a gyantáról sztenderd „magas” HF munkamenettel végezzük el (Stewart és munkatársai, fentebb idézett munka). A gyantáról való extrahálást 50%-os ecetsavval hajtjuk végre, és az extraktumot ezt követően gélszűrési kromatográfiának vetjük alá 20%-os ecetsavban. Ha szükséges, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiát végzünk Vydac C18 oszlopon (Rainin Instrument Co., Emeryville, Kalifornia), 0,1% trifluorecetsav-acetonitril gradienst alkalmazva.

#### Immundefektség

Az immundefektséggel való jellemzést klón felülűszókon vagy aszcitesz folyadékokon végezzük, tisztított LAV vírust és rekombináns fúziós fehérjét alkalmazva antigénként. Az antigéneket először poliakrilamid gradiens gélelektroforézissel (7,0–15,0%) különítjük el, és elektroforézissel [4 óra, 25 V, 25 mmól/l nátrium-foszfátban (pH 7,0)] átvisszük nitrocellulóz membránra

(NCM). Átvitel után az NCM-et blokkoljuk PBS-Tweenben vagy Blotto-ban (5% nem zsíros tejpor PBS-ben) egy órán át szobahőmérsékleten végzett inkubálással, hogy meggátoljuk a nem fajlagos kölcsönhatásokat. Az NCM-et PBS-Tweennel sztenderd arányban hígított sejttenyészet felülűszóval vagy aszcitesz folyadékkal inkubáljuk egy órán át szobahőmérsékleten, és háromszor átöblítjük PBS-Tweennel. A második lépésben az NCM-et PBS-Tweennel 1:2000 arányban hígított kecske-anti-egér IgG-torma-peroxidázzal inkubáljuk egy órán át szobahőmérsékleten. Ezt az inkubálást PBS-Tweennel végzett mosás követi, majd a membránt tormaperoxidáz színkifejlesztő oldatba merítjük (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornia) 20 perc-re. A reakciót úgy állítjuk le, hogy a membránt ionmentesített vízbe merítjük. A monoklonális antitest reaktivitást összehasonlítjuk tisztított szétzúzott vírussal vagy kifejezett fúziós fehérjével reaktív pozitív kontroll szérummal. Az eredmények azt mutatják, hogy az összes antitest kötődik gp110-hez és prekursor molekulájához, a gp150-hez, szétzúzott víruskészítményt alkalmazva. A 110-1 és 110-2 antitestek felismerik az ENV3 fúziós fehérjét is, míg a 110-3, 110-4, 110-5 és 110-6 antitestek immunkomplexet képeznek ENV2-vel.

#### Immunkicsapás

Radioimmun kicsapáshoz vírus-extraktumokat készítünk olyan HIV LAV<sub>BRU</sub> izolátumaival (amelyeket Montagnier szerint állítunk elő a GB 83 24 800 lajstromszámú nagybritanniai szabadalmi leírás alapján) fertőzött CEM sejtekből, amely HIV-t folyamatos passzálassal litikus növesztéshez adaptáltunk. Amikor a korai citopátikus hatások nyilvánvalóvá válnak, a sejteket átvisszük jelzést adó vizes közegbe, amely  $^{35}\text{S}$ -metionint (0,05 mCi/ml) vagy  $^3\text{H}$ -glükóزامint (0,025 mCi/ml) tartalmaz, majd 24 órán át inkubáljuk, amíg a sejtek nagy része lizálódik, vírust bocsátva ki a tenyészet felülűszóba. A vírust üledékbe visszük (1 óra 100000 g-nél) a sejtmentes felülűszóból, és detergens extraktumot készítünk P-RIPA pufferban (foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat, amely 1,0% Triton X-100-at, 1,0% dezoxikolatot, 0,1% SDS-t és 1% aprotinint tartalmaz). Hasonló extraktumokat készítünk nem fertőzött CEM sejtek felülűszóiból is.

Immunkicsapásos vizsgálatokat hajtunk végre 100  $\mu\text{l}$  vírus extraktumot egy órán át jégen inkubálva 100  $\mu\text{l}$  hibrid sejtvonalból származó tenyészet felülűszóval. 4 mikroliter nyúl-anti-egér-Ig-t (Zymed Laboratories, South San Francisco, Kalifornia) adunk mindegyik mintához, és inkubálunk 30 percen át. 1% ovalbumint is tartalmazó P-RIPA pufferban újra szuszpendált immunprecipitint (100  $\mu\text{l}$ ; Bethesda Research Laboratory, Bethesda, Maryland) adunk mindegyik mintához, és inkubálunk további 30 percen át. A kötött komplexeket mossuk és SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (15,0% akrilamid; DATD gél) szeparáljuk. Az elektroforézist követően a géleket rögzítjük, Enhance-ban (New England Nuclear, Boston, Massachusetts) áztatjuk, megszáritjuk, és Kodak XR-5 filmre helyezzük. Egy pozitív referencia szérumot, amely immunkicsapást idéz elő minden HIV vírus fehérjével, reagáltatunk vírussal fertőzött és ál-fer-



II. táblázat  
Rekombináns fehérjékkel és szintetikus peptidokkal reaktivitást mutató monoklonális antitestek,  
ELISA-val kimutatva

	Rekombináns fúziós fehérje				Szintetikus peptidok			LAV	CEM
	ENV2	ENV3	ENV4	ENV5	29.	36.	39.	Kontroll	Kontroll
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	0,486	0,032

ND = nem mutatható ki

tőzött CEM sejt felülűzőkkel, mint pozitív és negatív kontrollokkal.

Az eredmények azt mutatják, hogy mind a hat monoklonális antitest fajlagos immun-kicsapást hoz létre gp110-zel és gp150-nel.

#### Enzimmel kötött immunadszorbens vizsgálat

Hogy feltérképezzük a jelen találmány szerinti monoklonális antitestek által felismert gp110 epitopokat, a hibrid sejtvonalakból származó tenyészet felülűzőkat vagy az aszcitesz folyadékot tovább jellemezzük ELISA-ban való reaktivitással biológiai kifejezett fúziós fehérjékkel és szintetikus peptidokkal. A munkamenet azonos azzal, amelyet fentebb leírtunk, azzal a kivétellel, hogy fúziós fehérjék vagy szintetikus peptidok helyettesítik a tisztított vírust antigénként a mikrotitráló üregek felületén adszorbeálva.

Amikor peptidokat alkalmazunk antigénként, a lemezre vitel munkamenete az alábbi. A liofilezett peptidet feloldjuk 6 mól/l guanidin HCl-ben. Közvetlenül a 96 üreges lemezre felvitel előtt a guanidin oldatot hígítjuk 0,05 mól/l-es karbonát/bikarbonát pufferban (pH 9,6), 100 µg/ml végső peptid koncentrációra. 50 ml térfogatú hígított peptidet helyezünk el mindegyik mikrotitráló üregbe, és a lemezeket ezután 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk egy éjszakán át. A főleges peptid oldatot „kirázzuk”, a lemezeket Blotto-val blokkoljuk, és a fentebb leírt folyamatot az ELISA további munkamenet követi. Hasonlóképpen, rekombináns fehérjét hígítunk 2 µg/ml végső koncentrációra 0,05 mól/l-es karbonát/bikarbonát pufferban (pH 9,6), mielőtt ugyanezt a munkamenetet követnénk.

Az eredményeket a II. táblázat mutatja be. A HIV gp110-1 és HIV gp110-2 sejtvonalak által termelt monoklonális antitestek reagálnak ENV3-mal, ENV5-tel, 36. peptiddel és szétzúzott vírussal. A HIV-gp110-3, HIV-gp110-4, HIV-gp110-5 és HIV-gp110-6 sejtvonalakból származó antitestek ENV2-vel és 29. peptiddel, valamint szétzúzott vírussal reagálnak.

A II. táblázatban található eredmények azt mutatják, hogy a 110-1 és 110-2 monoklonális antitestek felismer-

20

nek egy, a pENV3 területen belül található DNS szekvencia által kódolt antigén determinánst, pontosabban a 36. peptiden belül található egy aminosavszekvencia által meghatározott HIV genom területe által kódolt antigén determinánst. Ez azt jelenti, hogy a gp110-1 és gp110-2 monoklonális antitestek kötődnek a gp110 7246 bp. és 7317 bp. közti terület által kódolt peptid területéhez, amint ezt a 36. peptiddel és ENV3-mal kialakult immunkomplexek képződése bizonyítja. A HIV genomnak ezt a területét már korábban megőrzöttnek azonosították, azaz csak kicsiny változások vannak a 36. peptidet kódoló DNS szekvenciákban a különböző földrajzi helyekről származó különböző vírus-izolátumok között [lásd: Starcich és munkatársai: Cell, 46, 637 (1986)]. Ezzel ellentétben a gp110-3, -4, -5, és -6 monoklonális antitestek a 29. peptid által meghatározott, 6688 bp. és mintegy 6750. bp. közti terület által kódolt HIV-peptidokhoz kötődnek. A 29. peptiddel meghatározott gp110 területet úgy azonosították, hogy számos nukleotid-helyettesítéssel rendelkezik a különböző vírus-izolátumok között. Azok a monoklonális antitestek, amelyek szelektíven kötik a megőrzött epitopokat tartalmazó gp110 polipeptideket, pl. a 110-1 és 110-2 antitesteket, növekvő mértékben hasznosíthatók sokféle körülmények között, pl. affinitás-kromatográfiában stb. ELISA vizsgálatban pedig a 110-2-2 peptid reagál olyan egyénből kapott szérummal, akiből LAV-2-t izoláltak.

25

30

35

40

45

50

55

60

#### Közvetett immunfluoreszcens mérés

A HIV gp110 antigénje ellen irányuló monoklonális antitestet alkalmazó közvetett immunfluoreszcens mérést hajtunk végre acetonnal rögzített és élő sejteken. LAV-val fertőzött CEM sejtekből készített, acetonnal rögzített lemezeket inkubálunk hígított tenyészet felülűzőval vagy aszcitesz folyadékkal egy órán át 37 °C hőmérsékleten, míg az élő sejteket a tenyészet felülűzőval vagy aszcitesz folyadékkal egy órán át 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk, mielőtt a sejteket lemezre helyeznénk és acetonnal rögzítenénk. Mindkét módszer fluoreszcen-izotiocianáttal jelzett anti-egér IgG-t (Zymed

Laboratories, Inc., South San Francisco, Kalifornia) alkalmaz a reaktív gp110 antigént hordozó sejtek kimutatására. A HIV-gp110-1 monoklonális antitest pozitív eredményeket ad, akár élő, akár acetonnal rögzített, LAV-fertőzött sejteket alkalmazunk.

## II. példa

### HIV fertőzőképesség semlegesítése anti-gp110 monoklonális antitestekkel

Ez a példa HIV fertőzőképesség semlegesítését írja le és jellemzi, olyan monoklonális antitesteket alkalmazva, amelyek gp110-hez és gp110-en belül levő peptidekhez kötődnek. Az eredmények azt jelzik, hogy a gp110-3, -4, -5, és -6 semlegesítő aktivitással rendelkeznek, és hogy a gp110-3 és -4 különösen magas szintű semlegesítő aktivitással rendelkeznek.

### A semlegesítés vizsgálata

Érzékeny semlegesítési vizsgálatot fejlesztettünk ki, hogy mennyiségileg vizsgálhassuk a monoklonális antitestek hatását a HIV fertőzőképességre. A HIV fertőzésre nagyon fogékony CD4+ sejtvonalat (CEM) választunk ki célsejtként a fertőzőképességek összehasonlításához. Az I. példában leírt módon készített aszcitesz folyadékokat, vagy ezek ammónium-szulfátos kicsapást alkalmazva tisztított IgG frakcióit hővel inaktíváljuk 56 °C hőmérsékleten 30 percig, majd szükség szerint hígítjuk olyan RPMI tápközegben, amely 10% borjúembrió-szérumot tartalmaz. LAV<sub>BRU</sub> HIV törzs szuszpenziót nyerünk ki CEM mintegy négy napos, log fázisban levő tenyészetéből, amelyet 0,2 vagy 0,45 mikronos szűrőn szűrünk, és -70 °C hőmérsékleten lefagyasztunk. Egy alikvotot felolvasztunk, titráljuk a TCID<sub>50</sub> meghatározására /a TCID<sub>50</sub> jelentése „szövettenyészetet fertőző dózis”, vagyis az a koncentráció, amelynél a szövettenyészet sejteinek 50%-a fertőzve van a vírussal/, majd végrehajtjuk az ezt követő méréseket frissen felolvasztott alikvotokkal, amelyeket 1:500 arányban hígítunk tenyésztő tápközeggel, hogy a CEM sejtek 50%-ának tenyésztetben való fertőzéséhez szükséges mennyiség mintegy tízszeresének megfelelő koncentrációt (10 TCID<sub>50</sub>) kapjuk meg. A vírus-suszpenziót összekeverjük azonos térfogatú (250 µl), ötszörös hígítású monoklonális antitest-készítménnyel 1:5–1:9765625 arányban. A vírus/antitest keveréket 45 percig inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, majd másolatot készítünk az 1:5–1:9765625 arányokból. A vírus/antitest keveréket 45 percig 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk, majd 200 µl-es másolati mintákat alkalmazunk üregenként mintegy 2·10<sup>5</sup> CEM sejtet tartalmazó 1 ml oldatot tartalmazó üregek inokulálásához. A tenyészeteket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk nedvesített, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó atmoszférában 14 napon át. A sejteket kinyerjük, üledékbe visszük, és 1% Triton X-100-at tartalmazó PBS-sel lizáljuk mintegy 10 percen át. A lizált sejtekben jelenlevő vírus (vagy vírus antigén) mennyiségét úgy határozzuk meg, hogy az alább leírt, érzékeny HIV antigén befogó „szendvics” enzim-immunassayt alkalmazunk. A semlegesítő aktivitás titerét – ha van ilyen – annak a monoklonális antitest-hígításnak reciprokaként határozzuk

meg, amely gátolja az antigén-termelést az antitest nélkül inkubált vírus kontroll tenyészetek több, mint 50%-ában vagy olyan, azonos izotípusú monoklonális antitestekkel inkubált vírustenyészetek több, mint 50%-ában, amelyekről előzőleg kimutattuk a semlegesítő aktivitás hiányát.

A HIV antigén befogó vizsgálat, amelyre fentebb utaltunk, két p25 antigén ellen irányuló monoklonális antitestet alkalmaz befogó reagensként. Ezeket a hibridóma sejtvonalakat lényegében a fentebb leírt módszerekkel alakítottuk ki, beleértve egy tisztított rekombináns fúziós fehérje alkalmazását immunogénként, és az így létrejött monoklonális antitestek jellemzését olyan módon, hogy ezek fajlagosak és reaktívak a korábban GAG-1-nek, GAG-2-nek és GAG-3-nak nevezett rekombináns fúziós fehérjéket és a 141. szintetikus peptidet alkalmazva. A GAG-1 fehérjét a pGAG-1 (ATCC 53379), a GAG-2-t a pGAG-2 (ATCC 53111), és a GAG-3-at a pGAG-3 (ATCC 53112) fejezi ki. A rekombináns fúziós fehérjék termelését részletesen leírja a WO 86/06099 számú PCT szabadalmi közrebocsátási irat.

A 141. szintetikus peptidet a LAV<sub>BRU</sub> genom terület kódolja, ez a 198.–242. aminosavaknak felel meg. A p25-2 és p25-3 hibridóma sejtvonalak által termelt monoklonális antitestekről úgy találjuk, hogy reaktívek a GAG-1, GAG-2 és GAG-3 rekombináns fúziós fehérjékkel, és a p25-3 monoklonális antitestje reaktív a 141. szintetikus peptiddel is.

Hogy az antigén befogó vizsgálatot végrehajtsuk, az első befogó reagenseket szilárd hordozókra adszorbeáljuk. A p25-2 és p25-3 hibridóma sejtvonalakból származó aszcitesz folyadékot 1:5000 arányban hígítjuk 25 mmól/l trisz-pufferban (pH 8,5), és 200 µl-t mikroüreges lemezek üregeibe helyezünk. Az üregeket leforrasztjuk és mintegy 16 órán át 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Az oldatot az üregekből leszívással eltávolítjuk, mielőtt a blokkoló oldatot (0,3% Blotto PBS-ben) hozzáadnánk. A blokkolást 15 percig végezzük szobahőmérsékleten. A blokkoló oldatot leszívjuk, és a mintát hozzáadjuk. Két század mikroliter lizált sejtuszuszpenziót és 5,0 µl, alább leírtak szerint készített kimutató konjugátumot adunk mindegyik üreghez. Az üreges csíkokat vagy lemezeket 2 órán át inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, ezután a szuszpenziót leszívjuk és az üregeket négy-szer mossuk pufferral (0,05% Tween 20 PBS-ben). A kimutató konjugátumot az alábbiak szerint készítjük. p25-6 és p25-7 monoklonális antitesteket konjugálunk torna-peroxidázzal (HRP) 3:1 molarányban (Ab:HRP) három órán át, peroxidációs eljárást alkalmazva [Nakone és munkatársai: J. Histochem. Cytochem. 22, 1084(1974)]. A konjugátumokat 1:1500 arányban hígítjuk 2,5%-os (tömeg/térfogat) nem zsíros tejport, 0,01% timerozalt és 0,005% Antifoam A-t tartalmazó 20 mmól/l-es nátrium-citrát oldattal. Az ELISA eljárás további részét úgy hajtjuk végre, amint ezt az I. példában leírtuk.

A semlegesítő aktivitás vizsgálatának eredményei a gp110-3, -4, -5, és -6-tal az alábbiak. A legnagyobb titerként, amelyek megőrzik a semlegesítő aktivitást,

az alábbiakat határozzuk meg: gp110-3=15,625; gp110-4=9,765,625; gp110-5=125; és gp110-6=625.

A 29. peptid által meghatározott terület előre várt genetikai variabilitása miatt a gp110-4 monoklonális antitestnek azt a képességét vizsgáljuk, hogy HIV más izolátumait is felismeri-e. Az immunfluoreszcenciás vizsgálatokat úgy végezzük, amint ezt fentebb leírtuk. A gp110-4 antigén a 16 vizsgált HIV izolátumból legalább háromnak a tenyészetében mutat ki antigént.

A gp110-4 antitest képes semlegesíteni LAV<sub>BRU</sub>-val inokulált csimpánzból, mint az AIDS vakcinálási kísérletben kontrollként alkalmazott állatból, 15 héten át izolált vírusokat. A monoklonális antitest képes semlegesíteni az izolátumokat akkor is, ha az állat olyan antitesteket kap, amelyek a HIV-et in vitro semlegesítik, és mérhető sejt-közvetített immunválasz fejlődik ki HIV fertőzésre. Ez jelzi az antigén génsodródás (drift) hiányát in vivo a gp110-4 antitest által felismert epitopnál.

### III. példa

#### HIV fertőzőképesség semlegesítése anti-gp110 és anti-p25 monoklonális antitestek koktélijával

Ez a példa a HIV fertőzőképesség semlegesítését írja le olyan monoklonális antitesteket alkalmazva, amelyek a gp110-et, valamint a gp110-ben levő peptideket kötik, olyan monoklonális antitestekkel együtt alkalmazva, amelyek a p25-öt és a p25-ben levő peptideket kötik, és amelyek egyedül kicsiny semlegesítő aktivitást mutatnak, vagy egyáltalán nem mutatnak semlegesítő aktivitást. Az eredmények azt jelzik, hogy a gp110-2 monoklonális antitest vagy p25-6-tal, vagy p25-7-tel kombinálva különösen magas szintű semlegesítő aktivitással bír.

A p25-6 és p25-7 hibridóma sejt vonalakat olyan módszerekkel alakítjuk ki, amelyeket fentebb leírtunk, olyan módosításokkal, amelyek magukban foglalják az inaktivált, széttűzött vírus vagy az E. coli-ban kifejezett, tisztított gag rekombináns fúziós fehérje alkalmazását immunogénként (lásd a WO 86/06093 számú PCT szabadalmi közrebocsátási iratot), és az így létrejött monoklonális antitestek jellemzését olyan módon, hogy ezek fajlagosak és reaktívak a korábban GAG-1-nek, GAG-2-nek, és GAG-3-nak nevezett rekombináns fúziós fehérjéket és a 15., 88., 150., 147., és 148. szintetikus peptideket alkalmazva. A szintetikus peptideket a LAV<sub>BRU</sub> genom terület kódolja, ezek a következő aminosav-gyököknek felelnek meg: 15. peptid=329.-350. aminosavgyökök; 88. peptid=315.-350. aminosavgyökök; 150. peptid=318.-363. aminosavgyökök; 147. peptid=278.-319. aminosavgyökök; és 148. peptid=290.-319. aminosavgyökök. A p25-6 és p25-7 hibridóma sejt vonalakat által termelt hibridóma sejt vonalakat reaktívak a GAG-3 rekombináns fúziós fehérjével, a p25-6 reaktív a 147. és 148. szintetikus peptidekkel, és a p25-7 reaktív a 15., 88., és 150. szintetikus peptidekkel.

Semlegesítési méréseket hajtunk végre, amint fentebb leírtuk, azzal a különbséggel, hogy amikor koktélokot alkalmazunk, az egyes monoklonális antitesteket először 1:5 arányban hígítjuk tenyésztő tápközegben, majd egyenlő arányban összekeverjük, hogy a végső

hígítás 1:10 legyen. A mérés további részét a fentebb leírtak szerint végezzük.

A gp110-2, p25-6 és p25-7 monoklonális antitestek kevesebb, mint 50% semlegesítő aktivitást mutatnak, amikor egyedül használjuk. Amikor olyan koktélt alkalmazunk ezeket, amely gp110-2-t p25-6-tal vagy gp110-2-t p25-7-tel tartalmaz 1:10 hígításban, a semlegesítés teljes. A p25-6 monoklonális antitestet p25-7-tel kombinálva tartalmazó koktélt 60–90% semlegesítő aktivitást mutat.

### IV. példa

#### A 29. peptid és homológjai immun-potenciálja

A 29. peptid és homológ peptidei, beleértve a 177. peptidet, képességét HIV elleni immunválasz stimulálására először két egértörzsből vizsgáljuk. A peptid immunogének előállításához szükséges eljárásokat, az immunizálási munkameneteket, és a kialakult immunválasz jellemzéséhez szükséges eljárásokat az alábbiakban részletezzük.

A 29. peptidet az immunizáláshoz egy tisztított tiroglobulinhoz konjugálva készítjük el. A tiroglobulint származékká lehet alakítani N-szukcinimidil-4-(N-maleimido-metil)-ciklohexán-1-karboxiláttal (SMCC) a konjugáláshoz, a 4629783 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban (10. oszlop, 28–51. sor) körvonalazott eljárás szerint. Második immunogénként a tiroglobulint származékba visszük glutaraldehiddel a következőképpen. 27 mg sertés tiroglobulint feloldunk 1 ml 0,1 mól/l-es nátrium-bikarbonátban, amelyhez azután 8,3 µl 25%-os glutaraldehid oldatot adunk cseppenként, és a keveréket egy éjszakán át kevertetjük szobahőmérsékleten. 1 ml nátrium-karbonát/bikarbonát puffert (pH 9,3) adunk az oldathoz, majd 8 órán át dializáljuk 2 liter azonos pufferral szemben 4 °C hőmérsékleten, a dializátum teljes lecserélésével a 4. órában. A 29. peptidet azután hozzáadjuk a származékká alakított tiroglobulinhoz mintegy 100-szoros molaris fölöslegben, és a keveréket egy éjszakán át kevertetjük szobahőmérsékleten. A nem reagált glutaraldehidet 200 µl 0,2 mól/literes lizin-oldattal blokkoljuk, amely keveréket több órán át (vagy egy éjszakán át) kevertetjük szobahőmérsékleten. A peptid-tiroglobulin konjugátumot azután élénken dializáljuk PBS ellen 4 °C hőmérsékleten.

Két egér-törzset (C37 fekete és BALB/c) inokulálunk a konjugálás mindegyik módszerével készített peptidekkel. Mindegyik állat mintegy 2–4 hetes az inokulálás időpontjában. Az inokulálás útja lehet a mancs, farokbemetszés, szubkután, intranazális, vagy intraperitoneális. Az inokulum 25 mg konjugált peptidből áll, amely 0,5 ml komplett Freund-féle adjuvánsban van szuszpendálva, olyan emlékeztető oltásokkal, amelyet a 2., 3. és 5. hét végén ismétlünk meg azonos immunogénnel, amely nem komplett Freund-féle adjuvánsban van szuszpendálva. Az egyes egerekből szérum-mintákat gyűjtünk az immunizálás előtt, 4 nappal a 3. héten végzett emlékeztető oltás után, és 4 nappal a 5. héten végzett utolsó emlékeztető oltás után. A szérum-mintákat homológ peptidek vagy teljes vírus elleni antitestekre elemezzük

ELISA-val történő átvizsgálással. A LAV-ra antitest aktivitást mutató szérumokat további átvizsgálásnak vetjük alá semlegesítő aktivitásra, ezt követi a szérumok elemzése szétzúzott LAV antigénekre való immunfoltképzéssel és radioaktívan jelzett gp110-zel végzett radioimmun-kicsapási vizsgálatokkal.

Az immunizálások eredményei azt jelzik, hogy a 29. peptiddel immunizált egerek 29. peptiddel és LAV-1 vírussal reaktív antitesteket fejlesztenek ELISA vizsgálat szerint. A 29. peptid konjugálása glutáraldehid segítségével általában a 29. peptid elleni antitestek magasabb titerét alakítja ki BALB/c egerekben, bár a maleimid segítségével végzett konjugálás is sikeresen alakít ki anti-29. peptid antitesteket néhány BALB/c egérben. 177. peptiddel immunizált egerek a peptidre antitesteket fejlesztenek ki, és a 177. peptid konjugálás glutáraldehid segítségével jobb az immunológiai válasz kialakításában. A C57 egerek fogékonyabbak a 177. peptiddel végzett stimulálásra, mint a BALB/c egerek. A 110-2-2 LAV-2 peptiddel immunizált egerek antitesteket fejlesztenek ki a 110-2-2-re és a LAV-2 vírusra, az ELISA vizsgálattal kimutatva. A glutáraldehid segítségével konjugált 110-2-2 peptid immunogén mind a C57, mind a BALB/c egerekben, bár a 110-2-2 peptid titerai általában magasabbak a BALB/c egerekben, mint a C57 egerekben, míg a LAV-2 vírusra adott titerek C57 egerekben általában magasabbak, mint a BALB/c egerekben.

Általában azok az immunizált egerekből kapott szérum-minták, amelyek (i) antitesteket mutatnak a teljes vírusra; (ii) képesek HIV-et semlegesíteni pl. a II. példában leírt vizsgálatban; és (iii) reaktívak a 29. peptiddel az ELISA vizsgálat szerint, együttesen jelzik a 29. peptid alkalmazásának hatékonyságát a vakcina-készítésben.

#### V. példa

##### *gp110 immunaffinitásos elkülönítése, monoklonális antitestet alkalmazva*

A HIV gp110 antigénje elleni monoklonális antitesteket lehet alkalmazni immunaffinitásos elválasztási eljárásokban a bakteriálisan kifejezett rekombináns fúziós fehérjék jelentős tisztításához. Ha a kifejezett fehérjét baktériumok kiválasztják, a fehérjéket a tenyészet felülúszójából lehet izolálni; ha a fehérje nem választódik ki, a baktériumsejtek szétzúzása válhat szükségessé.

A pENV-5 plazmid (ATCC 53074) megalkotását a jelen bejelentők által 721,237 számon benyújtott, folyamatban levő szabadalmi bejelentés írja le, amelyet a jelen bejelentésbe referenciaként építünk be. A pENV-5 a gp110 karboxil-végének nagyobb részét és a LAV gp41-e amino-terminálisának egy részét kódolja, a *trp* kifejező vektorba beiktatva. Az ezzel a vektorral transzformált *E. coli* C600 kifejezi a gp110 fúziós fehérjét, de nem választja ki ezt.

A pENV-5 plazmidot tartalmazó *E. coli* C600-at triptofánt (20 µg/ml) és ampicillint (100 µg/ml) tartalmazó tápközegben növesztjük egy éjszakán át 37 °C hőmérsékleten levegőztetés mellett. Az egy éjszakán át nőtt tenyészeteket azután 1:100 arányban inokuláljuk friss minimál tápközegbe, amely tartalmaz ampicillint

(100 µg/ml), de triptofánt nem. Ezeket a tenyészeteket levegőztetést alkalmazva növesztjük 2–3 órán át (a korai log fázisig) 37 °C hőmérsékleten. Az induktort, 3-β-indol-akrilsavat (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) hozzáadjuk 20 µg/ml végső koncentrációig, 20 mg/ml-es, 95%-os etanollal frissen készített törzsolatból. Az indukált tenyészeteket azután 37 °C hőmérsékleten növesztjük 4–5 órán át levegőztetés mellett, majd a tenyészeteket üledékbe visszük és kívánt esetben fagyaszttjuk. A fehérje-hozam pENV-5-ből tipikusan kevesebb, mint 1 mg/liter.

Az üledékbe vitt bakteriális sejteket lizáljuk P-RIPA puffert alkalmazva (1% Triton X-100-at, 1% dezoxikolátot, 0,1% nátrium-dodecil-szulfátot és 1% aprotinint tartalmazó PBS), amely lizálja az *E. coli* sejteket. A szuszpenziót ultrahangos kezelésnek vethetjük alá, hogy feldaraboljuk a DNS-t és RNS-t, ezt centrifugálás követi, hogy eltávolítsuk a szilárd részecskéket. Hígítási vagy koncentrálnálási lépés is lehet szükséges, hogy a fehérje koncentráció standard legyen.

A HIV-gp110-1 monoklonális antitestet először kicsapjuk az aszcitesz folyadékból vagy sejtenyészetből szobahőmérsékleten (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-gyel, vagy pH 7,3-ra pufferolt Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oldattal, hogy 33%, illetve 18% végső telítést érjünk el. A kicsapott fehérjéket centrifugálással kinyerjük, és PBS-ben újra oldjuk, majd másodszor is kicsapjuk 33% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-gyel vagy 12–15% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-gyel. Ezt a lépést megismételjük, ha szükséges. Az üledéket ismét feloldjuk PBS-ben, és a fölösleges sókat gélszűrővel eltávolítjuk egy sómentesítő mátrix segítségével, vagy PBS elleni kimerítő dialízissel.

A tisztított 110-1 monoklonális antitestet azután cianogén-bromiddal aktivált Sepharose-hoz köthetjük. A gél szükséges mennyiségét 10<sup>-3</sup> mól/l-es HCl oldatban duzzasztjuk üvegszűrőn (1 g fagyaszttva szárított anyag mintegy 3,5 ml végső géltérfogatot termel ki), és 15 percen át mossuk ugyanezzel az oldattal, és ezután azonnal hozzáadjuk az antitestet. A kapcsolási reakció általában leghatékonyabban a 8–10 közötti pH tartományban megy végbe, de alacsonyabb pH értéket is lehet alkalmazni, ha ez szükséges az antitest stabilitásához. Az antitestet PBS-ben kell feloldani, vagy nagy ionerősségű karbonát/bikarbonát vagy borát pufferban 150 mmól/l NaCl-lel. Az aktivált Sepharose-t és az antitest szuszpenziót gyengéden kevertetjük 2–4 órán át szobahőmérsékleten, vagy egy éjszakán át 4 °C hőmérsékleten, majd mossuk rétegesen zsugorított üvegszűrőn kapcsoló pufferal. Minden megmaradó aktív csoport leblokkolódik 1,0 mól/l-es etanol-aminnal pH 8-nál 2 órán át végzett kezeléssel. A végső antitest-Sepharose terméket azután váltakozva mossuk magas és alacsony pH-jú pufferoldatokkal (0,1 mól/l-es borát puffer, pH 8,5; 1 mól/l NaCl és 0,1 mól/l acetát-puffer, pH 4,0; és 1 mól/l NaCl) négyszer vagy ötször.

Ez a mosás eltávolítja a nem kovalensen adszorbeált anyagok nyomait. A kész immunaffinitás szeparáló mátrixot 8 °C hőmérséklet alatt tároljuk megfelelő bakteriosztatikus szer, pl. 0,01% azid jelenlétében.

A kifejezett fehérje szuszpenzió hozzáadása az immunaffinitásos szeparáló mátrixhoz a gp110 antigén sze-

lektív kinyerését eredményezi. A keveréket 2–24 órán át hagyjuk kölcsönhatásba lépni, előnyösen 12–18 órán át, lassú keverés vagy rázás mellett. Oszlop-alakot is alkalmazhatunk, amelyben az immunaffinitásos mátrixot oszlopba töltjük, kiegyensúlyozzuk, és a kifejezett fehérje szuszpenzióját lassan az oszlopra tápláljuk. Miután a fehérje-szuszpenziót hozzáadtuk, az áramlást le kell állítani, hogy lehetővé tegyünk a maximális immunkomplex képződést.

A nem kötött anyagot kimossuk vagy elkülönítjük adszorpciós pufferral végzett élénk mosással. Rétegesen zsugorított üvegszűrőt vákuummal, vagy oszlopon való átáramoltatást alkalmazhatunk. A kötött anyagot azután eluáljuk, alacsony vagy magas pH-jú puffereket (acetát-puffer, pH 4,0, vagy borát-puffer, pH 8,56) vagy kaotróp szereket alkalmazva.

#### VI. példa

##### *Rekombináns gp110 immunoaffinitásos tisztítása emlős kifejező rendszerekből*

A jelen találmány szerinti monoklonális antitestek alkalmazást nyerhetnek az emlős sejtekben kifejezett rekombináns fúziós gp110 immunaffinitásos tisztításában. Emlős sejteket fertőzünk rekombináns Vaccinia vírussal [Mackett és munkatársai: J. Virol. 49, 857 (1984); ezt referenciaként építjük be a jelen bejelentésbe], amely a gp110 legalább egy részét kódoló szekvenciát tartalmaz, ahol ez a szekvencia antigén, és semlegesítő antitesteket vált ki.

A rekombináns Vacciniát a 2 181 435 számú nagy-britanniai szabadalmi leírásban leírt módszer szerint alkotjuk meg, ezt a bejelentést referenciaként beépítjük a jelen bejelentésbe. Röviden ismertetve, a HIV burkoglikoproteinjét kódoló szekvenciákat beiktatjuk egy plazmid vektorba (pGS20), egy Vaccinia átírási szabályozó elemtől „lefelé”. Ezt a kiméra részt a vírus timidin kináz (TK) gént kódoló szekvenciák szegélyezik.

A LAV burkolati génhez ligált Vaccinia vírus promotort tartalmazó kiméra plazmid vektorokat alkalmazunk E. coli MC1000 törzs [az E. coli MC1009 /ATCC 33760/ törzs származéka] transzformálására. A kiméra LAV-env szekvenciák beiktatását a Vaccinia vírus genomba in vivo rekombinációval hajtjuk végre; ezt az a tény teszi lehetővé, hogy a pv-env5 plazmidokban levő kiméra géneket a TK gént kódoló Vaccinia szekvenciák szegélyezik. Ezt a plazmidot azután előzőleg vad típusú Vaccinia vírussal fertőzött sejtekbe vezetjük be, és lehetővé tesszük, hogy rekombináció játszódjék le a plazmidban levő TK szekvenciák és a Vaccinia vírus genomban levő homológ szekvenciák között, ilyen módon iktatva be a kiméra gént. Afrikai zöld majom vesesejtek [BSC-40 törzs, egy olyan sejt vonal, amely BSC-1 sejtekből származik (ATCC CCL26)] alkalmazunk gazdaszervezetként a kifejező rendszerben.

Összefolyó BSC-40 sejteket fertőzünk rekombináns Vaccinia vírussal 10-szer fertőzve. A fertőzés végbemenegetelére 12 órát hagyunk, ezután a sejteket kinyerjük, egyszer PBS-sel mossuk, és centrifugálással összegyűjtjük. A sejt-üledéket újból szuszpendáljuk lizáló pufferban (1,0% NP 40, 2,5% nátrium-dezoxikolat, 0,1 mól/l NaCl,

0,01 mól/l trisz-HCl, pH 7,4, 1 mmól/l EDTA), és a lizátumot centrifugálással derítjük. A kifejezett rekombináns fúziós fehérje immunaffinitásos szeparálását úgy hajtjuk végre, amint ezt fentebb a bakteriális kifejező rendszereknél leírtuk, a gp110-1 monoklonális antitestet alkalmazva. Az ez által a kifejező rendszer által termelt fehérje sokkal inkább emlékeztet a természetben termelt HIV gp110-re, az emlős sejtek által nyújtott feldolgozás és glikozilezés miatt.

#### VII. példa

##### *A HIV fertőzés gátlása blokkoló peptidekkel*

A blokkoló peptidek hatékonyságát vizsgáljuk szövettenyészet sejtjeinek a HIV LAV<sub>BRU</sub> törzsével való fertőzésére, a T-peptid kiértékeléséhez kialakított munkamenet (Pert és munkatársai, fentebb idézett munka) módosított változatát alkalmazva. Az előnyös HIV gátlási vizsgálatok magukban foglalják egyenlő térfogatnyi blokkoló peptid és CEM sejt ( $2,5 \cdot 10^5$ ) egyesítését tápközegben [RPMI, 10% borjúembrió-szérum (FCS) és 2 mg/ml polibren], és inkubálást 45 percig 37 °C hőmérsékleten. Vírust adunk azután hozzá különböző adagokban (10, 50, 500 TCID<sub>50</sub>), majd a felülűszót megvizsgáljuk vírus antigén (pl. p25 belső) termelésre.

A CEM sejtek előinkubálása a peptidekkel a vírusnak a tenyészethez való hozzáadása előtt növeli a gátló hatást a vizsgálatokban. A gátlásról úgy találjuk, hogy függ a vírus dózistól, erős aktivitást mutat a kis és közepes dózisoknál, míg kisebb hatása van a legnagyobb vírusdózisoknál.

A vírus antigén termelés mintegy 60–90%-os gátlását érjük el kis vírus dózisú kísérletekben T-peptiddel. A további kísérletek X.–XV. peptidekkel, amelyek tipikusan –COOH végen amidáltak és –NH<sub>2</sub> végen acetilezettek, hasonló eredményeket mutatnak, míg a XI. peptid különösen hatásos széles dózis-tartományban. Semlegesítő antitesteket adhatunk hozzá vagy az előinkubálási időszak során, vagy akkor, amikor a vírust hozzáadjuk, hogy a vírus antigén termelés additív vagy szinergikus gátlását idézzük elő.

Az előzőekből felbecsülhető, hogy a jelen találmány szerinti monoklonális antitestek és peptidek, beleértve a blokkoló peptideket is, javított módszert nyújtanak HIV fertőzések semlegesítéséhez és/vagy gátlásához. Ez lehetővé teszi, hogy könnyen kifejleszthessünk olyan megelőző és terápiás kompozíciókat, amelyek hatásosak a legtöbb, ha nem az összes HIV törzs fertőzése ellen. Ezenkívül az új anyagok a diagnosztikai vizsgálatokban és más jól ismert eljárásokban nyernek alkalmazást.

Bár a jelen találmány több részletét leírtuk szemléltetés és példák formájában, hogy a megértést világosabbá tegyük, nyilvánvaló, hogy bizonyos változásokat és módosításokat is lehet a gyakorlatban bevezetni, amelyek azonban a mellékelt igénypontok oltalmi körén belül vannak.

#### *A mikroorganizmusok letétbe helyezésének adatai*

Az alábbi mikroorganizmusok, amelyek a jelen találmány részét képezik, letétbe vannak helyezve az American Type Culture Collection-nál (12301 Parklawn Drive,

<u>Tudományos</u> <u>leírás</u>	<u>A letevő hivat-</u> <u>kozási száma</u>	<u>ATCC hivatko-</u> <u>zási szám</u>	<u>A letétbe helye-</u> <u>zés dátuma</u>
Egér hibridó- ma (BALBc/NS-1)	HIV-gp 110-1	HB 9175	1986. augusztus 15
-"-	HIV-gp 110-2	HB 9176	1986. augusztus 15
-"-	HIV-gp 110-3	HB 9177	1986. augusztus 15
-"-	HIV-gp 110-6	HB 9404	1987. április 30
-"-	HIV-gp 110-4	HB 9405	1987. április 30
-"-	HIV-gp 110-5	HB 9406	1987. április 30
-"-	HIV-p25-2	HB 9407	1987. április 30
-"-	HIV-p25-3	HB 9408	1987. április 30
-"-	HIV-p25-6	HB 9409	1987. április 30
-"-	HIV-p25-7	HB 9410	1987. április 30

Rockville, Maryland 20852, Amerikai Egyesült Államok). A letétbe helyezés adatai az alábbiak:

A HB 9175, HB 9176 és HB 9177 hibridómákat 1986. augusztus 26-án megvizsgáltuk és élőknek találtuk. A további hibridómákat 1987. május 4-én vizsgáltuk meg, és élőknek találtuk.

ATCC HB 9177, ATCC HB 9405, ATCC HB 9406, vagy ATCC HB 9404. (Elsőbbsége: 1987. 05. 01.)

30 4. Eljárás HIV gag p25 fehérjével reagáló monoklonális antitestek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a HIV-p25-6 (ATCC HB 9409) vagy HIV-p25-7 (ATCC HB 9410) sejtvonalat tenyésztjük, és a tenyészetben kialakult monoklonális antitestet kinyerjük. (Elsőbbsége: 1987. 05. 01.)

35 5. Eljárás a LAV 301-336. aminosavainak megfelelő HIV gp110 antigén determinánsaival reaktív monoklonális antitesteket termelő sejtvonalak előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

40 - valamely emlős gazdaszervezetbe HIV gp110 fehérjék vagy fragmentumait tartalmazó antigén készítmény immunogén mennyiségét juttatjuk be;

- a gazdaszervezetből antitest-termelő sejteket nyerünk ki és ezeket a sejteket halhatatlanná tesszük;

45 - kiválasztjuk azokat a halhatatlanná tett sejteket, amelyek a LAV 301-336. aminosavainak megfelelő HIV gp110 antigén determinánsok elleni antitestek termelésére képesek; és

- a halhatatlanná tett sejtek klónozásával sejtvonalat alakítunk ki.

(Elsőbbsége: 1986. 08. 20.)

50 6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antigén készítményként HIV extraktumából vagy lizátumából kapott fehérjéket, vagy eukarióta vagy bakteriális gazdaszervezet által kifejezett rekombináns fúziós fehérjéket juttatunk a gazdaszervezetbe. (Elsőbbsége: 1986. 08. 20.)

55 7. Az 5. igénypont szerinti eljárás a HIV-gp-110-3, (ATCC HB 9177), HIV-gp-110-4 (ATCC HB 9405),  
60 HIV-gp-110-5 (ATCC HB 9406) vagy HIV-gp-110-6

#### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás HIV fertőzés elleni, a LAV mintegy 301-336. aminosavainak megfelelő HIV gp110 területen belüli semlegesítő epitoppal fajlagosan reaktív monoklonális antitest előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

- az említett monoklonális antitestet kifejező sejtvonalat tenyésztünk, és

- a sejtvonalt által termelt monoklonális antitestet kinyerjük.

(Elsőbbsége: 1986. 08. 20.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás az alábbi peptiddel fajlagosan reaktív monoklonális antitest előállítására:

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

*azzal jellemezve*, hogy a megfelelő monoklonális antitestet kifejező sejtvonalat tenyésztjük és a megfelelő monoklonális antitestet nyerjük ki. (Elsőbbsége: 1986. 08. 20.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az alábbi sejtvonalak valamelyikét tenyésztjük:

(ATCC HB 9404) sejtvonallakkal azonos immunológiai tulajdonságú antitestet termelő sejtvonalak előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő sejteket klónozzuk és alakítjuk sejtvonallá. (Elsőbbsége: 1987. 05. 01.)

8. Eljárás ötvennél kevesebb aminosavból álló, HIV semlegesítő epitopot magában foglaló, HIV antigén determinánst meghatározó immunreaktív peptid előállítására, amely legalább hat egymás utáni aminosavat tartalmaz a HIV gp110 301–336. aminosav-szekvenciájából, *azzal jellemezve*, hogy a peptidet alkotó aminosavakat önmagában ismert módon, kívánt esetben védőcsoportok alkalmazásával, vegyi úton összekapcsoljuk és kívánt esetben a védőcsoportokat lehasítjuk. (Elsőbbsége: 1986. 08. 20.)

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az alábbi szekvenciák valamelyikéből vett legalább hat, egymás után következő aminosavat kapcsolunk össze:

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,  
vagy

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.

(Elsőbbsége: 1986. 08. 20.)

10. A 8. igénypont szerinti eljárás, az alábbi HIV gp110 aminosav-szekvenciák egyikét tartalmazó szintetikus peptid előállítására:

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

ahol Y és Y' egymástól függetlenül a HIV szekvencia 0–20 egymásra következő aminosavmaradékából álló szekvenciáit képviseli, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő aminosavakat kapcsoljuk össze. (Elsőbbsége: 1986. 08. 20.)

11. A 10. igénypont szerinti eljárás olyan szintetikus peptid előállítására, amelynek Y és/vagy Y' részei glicin, tirozin, cisztein, lizin vagy glutaminsav kapcsológyököket tartalmaznak, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő aminosavakat kapcsoljuk össze. (Elsőbbsége: 1986. 08. 20.)

12. Eljárás HIV fertőzések kezelésére alkalmas gyógyászati kompozíció előállítására, *azzal jellemezve*, hogy – a LAV 301–336. aminosavainak megfelelő HIV területen belüli reaktív epitoppal semlegesítő monoklonális antitestet állítunk elő,  
– az előállított monoklonális antitest gyógyászatiilag hatékony mennyiségét gyógyászatiilag elfogadható hordozóval keverjük össze. (Elsőbbsége: 1986. 08. 20.)

13. Eljárás HIV fertőzések kezelésére alkalmas gyógyászati kompozíció előállítására, *azzal jellemezve*, hogy – két monoklonális antitestet állítunk elő, amelyek egyike a LAV 278–319. aminosavak közt lévő p25 semlegesítő epitoppal, vagy a LAV 315–363. aminosavai közt lévő p25 semlegesítő epitoppal, másik a a LAV 301–336. aminosavainak megfelelő HIV gp110 semlegesítő epitoppal fajlagosan reaktív,  
– az említett monoklonális antitesteket elegyítjük, és  
– az elegyített monoklonális antitestek gyógyászatiilag hatékony mennyiségét valamely gyógyászatiilag elfogadható hordozóval keverjük össze. (Elsőbbsége: 1987. 05. 01.)

14. Eljárás HIV fertőzés elleni vakcina előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy vagy több, a 8–10. igénypontok bármelyike szerinti peptid immunológiailag hatásos mennyiségét összekeverjük valamely fiziológiailag elfogadható hordozóval. (Elsőbbsége: 1986. 08. 20.)

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy több peptid hatásos mennyiségét keverjük össze valamely fiziológiailag elfogadható hordozóval. (Elsőbbsége: 1986. 08. 20.)