

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2089/87

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> : C12N 15/12  
C12P 21/08

(22) Anmeldetag: 20. 8.1987

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 1.1994

(45) Ausgabetag: 26. 9.1994

(30) Priorität:

20. 8.1986 US 898273 beansprucht.  
1. 5.1987 US 45026 beansprucht.  
29. 6.1987 US 67996 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

GENETIC SYSTEMS CORPORATION  
98121 SEATTLE (US).

(56) Entgegenhaltungen:

WO-A1-86/06414                      WO-A1-86/06099  
WO-A1-86/04336

(54) IMMORTALISIERTE ZELLINIE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN SOWIE DIAGNOSEVERFAHREN UND -MITTEL

(57) Das Prinzip der Erfindung betrifft Mittel zur Diagnose von HIV unter Anwendung von monoklonalen Antikörpern, die mit einem oder mehreren neutralisierenden Bereichen von HIV-Proteinen reagieren, sowie von Peptiden oder Homologen davon aus diesem Bereich und von verwandten Nukleinsäuresegmenten und blockierenden Peptiden. Zu derartigen neutralisierenden Bereichen zählen selektierte Teile der env- und gag-Gene von verschiedenen HIV-Isolaten. Zu den Zelllinien, die monoklonale Antikörper sekretieren, zählen HIV-gp110-1, -2, -3, -4, -5 und -6 (ATCC Nr. HB9175, HB9176, HB9177, HB9405, HB9406 und HB9404) und HIV-p25-2, -3, -6 und -7 (ATCC Nr. HB9407, HB9408, HB9409 und HB9410).

AT 398 080 B

Die Erfindung beschäftigt sich mit dem Gebiet der Diagnose, Behandlung und Prävention viraler Infektionen. Aufgabe der Erfindung ist es, Mittel und verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper und Peptide, welche bei der Behandlung, Diagnose, Neutralisierung und beim Impfen im Zusammenhang mit der Behandlung von Human-Immundeficiency Virus (HIV) - Infektion brauchbar sind, zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der Erfindung ist daher in erster Linie eine immortalisierte Zelllinie, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der in der Lage ist, mit einer Hüllglykoprotein-gp110-Antigen-Determinate zu reagieren, die innerhalb des neutralisierenden Bereichs oder blockierenden Peptids des HIV enthalten ist.

Das für das Acquired Immunodeficiency-Syndrom (AIDS) und dessen prodromale Phasen, AIDS-related Complex (ARC) und das Lymphadenopathie-Syndrom (LAS) verantwortliche infektiöse Agens ist ein neuartiges lymphotropes Retrovirus. Dieses Virus wurde auf verschiedene Weise bezeichnet, nämlich als LAV, HTLV-III, ARV und neuerdings als HIV.

Seit der pandemischen Ausbreitung von HIV ist die Behandlung infizierter Personen und die Verhütung der Übertragung auf uninfizierte Risikogruppen von größter Wichtigkeit. Eine Vielzahl von Behandlungsstrategien richtet sich auf unterschiedliche Phasen im Lebenszyklus des Virus. Sie sind in Mitsuya und Broder, 1987, *Nature* 325:773 beschrieben. Eine Möglichkeit umfaßt die Anwendung von Antikörpern, die an das Virus binden und die Virusreplikation inhibieren, entweder weil sie den Eintritt des Virus in die Wirtsstellen stören oder aufgrund anderer Mechanismen. Sobald die virale Komponente(n), die einem Eingreifen des Antikörpers unterliegt(en), identifiziert ist (sind), hofft man Antikörper-Titer erzeugen zu können, die ausreichen, um die Infektivität des Virus zu neutralisieren und zwar durch Impfung oder in alternativer Weise durch passive Verabreichung von Immunglobulinen oder monoklonalen Antikörpern der gewünschten Spezifität.

Man nimmt an, daß die Hüllglykoproteine der meisten Retroviren mit Rezeptormolekülen an der Oberfläche der für das Virus anfälligen Zellen reagieren und so die Virusinfektivität gegenüber bestimmten Wirten bestimmen. Antikörper, die an die Glykoproteine binden, können die Interaktion des Virus mit den Zellrezeptoren blockieren und somit die Infektivität des Virus neutralisieren, siehe *The Molecular Biology of Tumor Viruses*, 534 (J. Tooze, Hrsg., 1973) und *RNA Tumor Viruses*, 226, 236 (R. Weiss et al, Hrsg., 1982); auf beide Publikationen wird hiermit Bezug genommen. Man vergleiche außerdem Gonzalez-Scarano et al., 1982, *Virology* 120:42 (La Crosse Virus); Matsuno und Inouye, 1983, *Infect. Immun.* 39:155 (Neonatal Calf Diarrhea Virus); und Mathews et al., 1982, *J. Immunol.*, 129:2763 (Encephalomyelitis Virus).

Die allgemeine Struktur des HIV besteht in einem Ribonukleoproteinkern, der von einer Lipid-enthaltenen Hülle umgeben ist, welche das Virus im Laufe seiner Entwicklung aus der Membran der infizierten Wirtszelle bildet. Die viralen kodierten Glykoproteine sind in die Hülle eingebettet und stehen nach außen hervor. Die Hüllglykoproteine von HIV werden ursprünglich in der infizierten Zelle als Prekursormolekül von 150.000 bis 160.000 Daltons (gp150 oder gp160) synthetisiert und anschließend in der Zelle in ein N-terminales Fragment von 110.000 bis 120.000 Daltons (gp 110 oder gp 120) um das externe Glykoprotein zu erzeugen und in ein C-terminales Fragment von 41.000 bis 46.000 Daltons (gp41), das das Transmembran-Hüllglykoprotein darstellt, überführt.

Aus den oben angegebenen Gründen war das gp110 HIV-Glykoprotein Gegenstand zahlreicher Untersuchungen bezüglich eines potentiellen Targets zur Unterbrechung des Lebenszyklus des Virus. Es wurde gezeigt, daß Sera von HIV-infizierten Personen HIV *in vitro* neutralisieren und daß Antikörper, die an gereinigtes gp110 binden, in den Sera vorliegen, Robert-Guroff et al., 1985, *Nature* 316:72, Weiss et al., 1985, *Nature* 316:69 und Mathews et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:9709. Gereinigtes und rekombinantes gp100 stimulierte die Produktion neutralisierender Serumantikörper, wenn man sie zur Immunisierung Tieren verabreichte, Robey et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7023; Lasky et al., 1986, *Science* 233:209; und Zagury et al., 1986, *Nature* 326:249. Weiter konnte gezeigt werden, daß das gp110-Molekül an den CD4 (T4)-Rezeptor bindet und daß monoklonale Antikörper, die bestimmte Epitope des CD4-Rezeptors erkennen, die HIV-Bindung, Syncytiumbildung und Infektivität blockieren, McDougal et al., 1986, *Science* 231:382. Putney et al. (1986, *Science* 234:1392) wiesen neutralisierende Serumantikörper in Tieren nach Immunisierung mit einem rekombinanten Fusionsprotein nach, das die carboxyl-terminale Hälfte des gp110-Moleküls enthielt. Sie konnten weiter zeigen, daß die Glykosylierung des Hüllproteins für ein Ansprechen auf den neutralisierenden Antikörper unnötig ist.

Es wäre deshalb wünschenswert, ein Subunit-Vakzin gegen AIDS unter Anwendung des HIV gp110-Moleküls oder Teilen davon zur Verfügung zu haben. Subunit-Vakzine sind eine Alternative zu Vakzinen, die aus inaktivierten oder in ihrer Wirkung geschwächten Viren hergestellt werden. Inaktivierte Vakzine sind problematisch, weil möglicherweise nicht alle Viruspartikel abgetötet wurden und die in ihrer Wirkung geschwächten Viren besitzen die Fähigkeit zu mutieren und ihre krankheitsauslösende Wirkung wieder zu gewinnen. Bei Subunit-Vakzinen verwendet man nur diejenigen Teile des Virus zur Immunisierung des

Wirts, welche die Antigene oder Epitope enthalten, die in der Lage sind, die Immunantwort auszulösen, d.h. ein Ansprechen auf neutralisierende Antikörper, ADCC und ein cytotoxisches T-Zell-Ansprechen. Der Hauptvorteil von Subunit-Vakzinen liegt darin, daß irrelevantes Virusmaterial ausgeschlossen ist.

Virale Subunits (Untereinheiten) zur Anwendung in einem Vakzin kann man nach verschiedenen Methoden erzeugen. Beispielsweise kann das Hüllglykoprotein von einem Bakterienwirt exprimiert und gereinigt werden, obwohl diesem Molekül die meisten post-translationalen Modifikationen (wie die Glykosylierung) oder andere Weiterverarbeitungen fehlen. Eine derartige Modifikation kann man durch Verwendung eines eukaryotischen Expressionssystems, beispielsweise Hefe oder kultivierte Säugetierzellen, erzielen. Virale Gene wurden in Säugetierzellen unter Verwendung von Vaccinia-Viren als Vektor eingeführt, siehe beispielsweise Mackett, M. et al, 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79:7415; D. Panicali und E. Paoletti, 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79:4927. Rekombinante Vaccinia-Viren kann man gemäß den Methoden von Hu et al., Nature 320:537 (1986) oder Chakrabarti et al., Nature 320:535 (1986), auf die hiermit Bezug genommen wird, konstruieren. In diesen Systemen werden die viralen Glykoproteine, die durch Zellen erzeugt werden, welche mit rekombinanten Vaccinia infiziert sind, in geeigneter Weise glykosyliert. Sie können zur Extrusion und abschließenden Isolierung an die Zelloberfläche transportiert werden.

Ein wichtiger Schritt in der Produktion eines Subunit-Vakzines ist eine adequate Reinigung des gewünschten Glykoproteins aus der komplexen Mischung des Expressionssystems. Hierfür sind mehrere Methoden geeignet. Dazu zählen, ohne darauf begrenzt zu sein, die präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Gelpermeations-Chromatographie, verschiedene Chromatographiemethoden (d.h. Ionenaustausch-, Umkehrphasen-, Immunoaffinitäts- und hydrophobe Interaktionschromatographie) und andere. Die meisten dieser Methoden verwendet man in verschiedenen Kombinationen, um im wesentlichen reine Präparate zu erhalten, siehe D.G. Kleid et al., 1981, Science 214:1125, C.D. Cabradilla et al., 1986, Biotechnology 4:128, D.J. Dowbenko, 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:7748, auf die hiermit Bezug genommen wird.

Zur Herstellung von Subunit-Vakzinen werden Methoden benötigt, die die Zahl der Stufen reduzieren, die erforderlich sind, um die beste Reinigung eines bestimmten viralen Antigens aus einer komplexen Expressionsmischung zu erzielen. Eine effiziente Abtrennung der Antigene von Fremdkomponenten kann unter Anwendung der Immunoaffinitätschromatographie erfolgen. Diese auch als Immunoadsorption bekannte Methode besteht im Prinzip in der selektiven Adsorption eines Antigens an einen festen Träger, an den ein spezifischer Antikörper kovalent geknüpft wurde. Das selektiv adsorbierte Antigen eluiert man dann von einem derartigen Adsorbens mit Antikörper-Affinität, indem man beispielsweise den pH-Wert und/oder die Ionenstärke des Puffers ändert.

Polyklonale Antikörper, die von Tieren, welche mit dem gewünschten Antigen immunisiert wurden oder von natürlich infizierten Personen (siehe beispielsweise Laksy et al., oben) erhalten wurden, wurden häufig als Immunoadsorbentien verwendet. Diese Reagentien besitzen aber im allgemeinen entscheidende Nachteile, beispielsweise daß (i) nicht alle der Antikörper, die an den unlöslichen Träger binden, spezifisch für das interessierende Molekül sind, so daß eine weitere Reinigung erforderlich wird; (ii) die Ausbeuten an gewünschtem Antigen häufig niedrig sind; und (iii) die Antikörper-Affinitäten häufig von einem Präparat zum anderen schwanken, so daß Modifizierungen der Elutionsmethode erforderlich sind. Mit der Verwendung monoklonaler Antikörper, die spezifisch für das gewünschte virale Antigen sind, in Subunit-Vakzinpräparationen anstelle von polyklonalen Antikörpern könnte man diese Schwierigkeiten umgehen.

Monoklonale Murinantikörper, die HIV-Antigene binden, wurden bereits beschrieben. Mehrere Arbeitsgruppen haben über monoklonale Antikörper berichtet, die spezifisch für das Kernprotein p25 sind (siehe beispielsweise di Marzo Veronese et al., 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:5199 und J. Chassagne et al., 1986, J. Immunol. 136:1422). Monoklonale Antikörper, die spezifisch für das Membranglykoprotein gp41 sind, wurden ebenfalls bereits beschrieben (siehe beispielsweise di Marzo Veronese et al., 1985, Science 229:1402).

Die WO-A1-86/06414 beschreibt bestimmte Peptide von LAV/HTLV-III(HIV), die zur Diagnose von HIV oder Antikörpern zu HIV verwendbar sind. Monoklonale Antikörper mit neutralisierender Wirkung (oder Zelllinien, die solche Antikörper produzieren) sind in dieser Literaturstelle nicht erwähnt.

Die WO-A1-86/06099 beschreibt die Klonierung und Expression von LAV/HTLV-III-gag-(Kern)-Proteinen, nicht die der gp110- oder gp41-Hüllproteine, und erwähnt nirgends monoklonale Antikörper und schon gar nicht neutralisierende monoklonale Antikörper oder Zelllinien für LAV/HTLV-III.

Die WO-A1-86/04336 beschreibt monoklonale Antikörper gegen Kernproteine. Es findet sich keine Erwähnung der neutralisierenden Wirkung gegen das HIV-Virus, weder allein noch in Kombination mit monoklonalen Antikörpern gegen das gp110 Hüll-Glycoprotein.

Es besteht ein Bedürfnis nach monoklonalen Antikörpern, die spezifisch für Epitope in genau definierten Bereichen des Haupthüllglykoproteins gp110 sind. Monoklonale Antikörper, welche an diese Bereiche binden und eine Reduktion oder Eliminierung der Replikation und der Übertragbarkeit von HIV verursachen,

wären von großem, therapeutischem und prophylaktischem Nutzen. Darüber hinaus könnte man die monoklonalen Antikörper auch dazu verwenden, den gewünschten Bereich von gp110 beispielsweise für die Anwendung in Vakzinen aus zerstörten Viren oder rekombinanten Expressionssystemen zu reinigen. Weiters könnte der Bereich chemisch synthetisiert werden, der das (die) Epitop(e) enthält (enthalten), das  
 5 (die) von den monoklonalen Antikörpern erkannt wird (werden), wodurch die mit der Reinigung und Verabreichung größerer Fragmente des gp110-Moleküls verbundenen Schwierigkeiten vermieden werden könnten. Die vorliegende Erfindung erfüllt diese und andere Bedürfnisse.

Die immortalisierte Zelllinie, die den Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellt, ist dadurch gekennzeichnet, daß sie durch ein Verfahren herstellbar ist, das folgende Schritte umfaßt:

- 10 - Verabreichen einer immunogen wirksamen Menge eines mit HIV-Proteinen angereicherten Antigenpräparates an einen Wirt;
- Überwachen der Produktion der Antikörper, die mit gp110-Antigen-Determinanten reagieren, im immunisierten Wirt;
- Gewinnung von Antikörper-produzierenden Zellen aus dem Wirt und Immortalisieren derselben;
- 15 - Selektion der immortalisierten Zellen, die Antikörper gegen HIV gp110 produzieren; und
- Klonierung der immortalisierten Zellen für die Produktion von Zelllinien.

Gegenstand der Erfindung sind auch ein Verfahren zur Erzeugung dieser Zelllinie sowie Diagnoseverfahren und -mittel zur Feststellung von HIV in einer biologischen Probe.

Somit betrifft die Erfindung neue Mittel und Methoden zur Feststellung und Neutralisierung von HIV. Die  
 20 Methoden können zur Verhinderung oder substantiellen Inhibierung der Bildung oder cellulären Transmission von infektiösem HIV in einem Wirt herangezogen werden. Insbesondere können Peptide, die einen neutralisierenden Bereich des HIV nachahmen, sowie monoklonale Antikörper, die mit einem derartigen Bereich reagieren, für die Diagnose und Behandlung und zur Impfung gegen HIV-Infektionen verwendet werden. Der Ausdruck "neutralisierender Bereich" bezeichnet in diesem Zusammenhang diejenigen Teile  
 25 des HIV, insbesondere HIV-Proteine, welche Aminosäuresegmente enthalten, die ein oder mehrere Epitope definieren, die mit Antikörpern reagieren, welche entweder alleine oder in Kombination mit anderen erfindungsgemäßen Antikörpern in der Lage sind, HIV-Infektionen zu neutralisieren. Geeignete Assays für die Neutralisierung sind bekannt, dazu zählen beispielsweise die Reduktion von HIV-Infektionen in T-Zelllinien, die Reduktion von Plaque-bildenden Einheiten von VSV (HIV), Pseudotypen, welche die Hüllglyko-  
 30 proteine von HIV tragen, Syncytium-Inhibitionstests.

Wie erwünscht, ist die neutralisierende Aktivität mit der Antikörperreaktivität in immunochemischen Tests, wie Immunofluoreszenz-, Immunoblot- und Radioimmunopräzipitations-Assay, vergleichbar.

Die neuen Peptide mit typischerweise weniger als ungefähr 50 Aminosäuren enthalten 5 oder mehr  
 35 zusammenhängende Aminosäuren, die Epitope bilden, welche im wesentlichen denjenigen Epitopen ähneln, welche sich an den neutralisierenden Bereichen von HIV gp110 oder p25 befinden, die durch die env- und gag-Bereiche des HIV-Genoms codiert sind. Von besonderem Interesse sind diejenigen Bereiche, die sich etwa vom Aminosäurerest 301 bis etwa 336 von gp110 und etwa 278 bis etwa 319 und etwa 315 bis etwa 363 von p25 (alle von dem als LAV<sub>BRU</sub> bezeichneten HIV-Stamm) erstrecken. Die Bezeichnung der  
 40 Aminosäurereste stammt von der Los Alamos Datenbank (AIDS virus sequence database, Los Alamos National Laboratory, Theoretical Division, Los Alamos, NM 87545).

Für den Fachmann ist ersichtlich, daß weitere analoge Bereiche ("Homologe") von anderen HIV-Isolaten identifiziert werden können, basierend auf ihrer Lage in verwandten Proteinen aus unterschiedlichen  
 45 Isolaten. In der Praxis können derartige Homologe unter Bezug auf LAV<sub>BRU</sub>-Sequenzdaten folgendermaßen identifiziert werden:

- a) die Aminosäuresequenzen von HIV-Isolaten und LAV<sub>BRU</sub> können so ausgerichtet werden, daß maximale Homologie zwischen den beiden Sequenzen besteht.
- b) man kann Peptide identifizieren, die diejenigen Aminosäuresequenzen von HIV-Isolaten umfassen, die  
 50 der Lokation der LAV<sub>BRU</sub>-Peptide entsprechen, welche immunologisch die LAV<sub>BRU</sub>-Proteine nachahmen. Peptide, welche die auf diese Weise identifizierten Aminosäuresequenzen von HIV-Isolaten umfassen, ahmen typischerweise die entsprechenden Proteine des HIV-Isolats immunologisch nach.

Diese Methode kann auch auf HIV-Stämme angewandt werden, die erst noch aufzufinden sind. Wenn beispielsweise neue HIV-Stämme identifiziert werden, können deren Hüll- und Kernaminosäuresequenzen mit denjenigen von LAV<sub>BRU</sub> zur Erzielung maximaler Homologie in Übereinstimmung gebracht werden. Die  
 55 Methoden, mit denen die Sequenzen in Übereinstimmung gebracht werden, sind dem Fachmann bekannt. Wenn die Sequenzen in Übereinstimmung gebracht werden, ist es wünschenswert, die Homologie zwischen den Cysteinresten so groß wie möglich zu halten. Die Aminosäuresequenz des neuen HIV-Stamms oder der HIV-Spezies, die der Lokation der hier offenbarten Peptide entspricht, kann synthetisiert und erfindungsge-

mäß zur Anwendung gebracht werden.

Eine weitere Methode zur Bestimmung von Sequenzen eines homologen Bereichs in anderen HIV-Stämmen wurde von Scharf et al., Science (1986) 233:1076 beschrieben. Dabei verwendet man zwei Oligonukleotid-Primer, die an konservierte Sequenzen außerhalb des hier interessierenden Sequenzbereiches binden, wobei in jedem Primer unterschiedliche restriktive Stellen vorhanden sind. Die DNA von HIV-Stämmen kann dann in vitro vervielfacht werden und die erhaltenen Oligonukleotide können in Vektoren für die Sequenzanalyse kloniert und einem Vakzin als Cassette einverleibt werden, die ein bestimmtes Epitop des HIV-Stamms darstellt.

Es ist bei der vorliegenden Erfindung nicht erforderlich, daß die Epitope, die innerhalb derartiger Sequenzen vorhanden sind, mit Antikörpern aller HIV-Stämme oder -spezien eine Kreuzreaktion eingehen. Peptide, die immunologische Epitope umfassen, welche eine Spezies oder Serogruppe von einer anderen unterscheiden, finden zur Identifizierung bestimmter Spezies oder Serogruppen Anwendung und können zur Identifizierung von Personen dienen, die mit einer oder mehreren HIV-Spezies oder -Serogruppen infiziert sind. Sie sind auch in therapeutischen Mitteln in Kombination mit anderen Peptiden brauchbar, die entweder von einem homologen Bereich oder einem anderen neutralisierenden Bereich stammen.

Die hier interessierenden Peptide stammen vorzugsweise von gp110-Region des Virus ab. Von besonderem Interesse in diesem Bereich sind Peptide, die im offenen env-Leseraster codiert sind, der sich etwa von Basenpaar (bp) 6667 bis etwa zum Basenpaar 6774 des LAV<sub>BRU</sub>-Isolats erstreckt. Unterschiedliche homologe Bereiche anderer HIV-Isolate umfassen somit, wie in Tabelle I aufgeführt, die homologen Sequenzen, die von der Los Alamos Datenbank (ausgenommen LAV2) erhalten wurden.

Weitere Peptide, die zur Erzeugung von und zum Screening auf monoklonale Antikörper brauchbar sind, sind diejenigen, die im offenen env-Leseraster etwa vom bp 7246 bis etwa 7317 von LAV<sub>BRU</sub> kodiert sind. Derartige Antikörper und reaktive Peptide sind insbesondere im Immunoassay brauchbar.

Im gag-Bereich des LAV<sub>BRU</sub>-Isolats stellen die p25 Aminosäuresequenzen von etwa 278 bis 319 und 315 bis 363 weitere neutralisierende Bereiche des HIV dar.

Es ist für den Fachmann ersichtlich, daß weitere neutralisierende Bereiche des HIV identifiziert werden können und zwar auf der Grundlage der erfindungsgemäßen Lehre. Insbesondere zeigen Kombinationen monoklonaler Antikörper, die mit verschiedenen HIV-Epitopen reagieren, eine neutralisierende Aktivität.

30

35

40

45

50

55

TABELLE 1

5	HXB2	TGTACAAGACCCAACAACAATACAAGAAAAAGA.....ATCCGTATC	
		CysThrArgProAsnAsnAsnThrArgLysArg.....IleArgIle	309
	BH102	-----Ser-----	309
	BH8	-----Lys-----	309
	HXB3	-----Lys-----	309
	H9M	-----Ser-----	309
10	BRU	-----Ser-----	314
	MAL	-----Gly-----ArgGly-----HisPhe	314
	ELI	---Ala---TyrGln---Gln---ThrPro---	310
	ARV2	-----Ser-----Tyr---	312
	WMJ2	-----Tyr---Val---ArgSer-----LeuSer---	306
15	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
20	HXB2	CAGAGA.....GGACCAGGAGAGCATTGTGTTACAATAGGAAAAATAGGAAATATG	
		GlnArg.....GlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIleGlyAsnMet	326
	BH102	-----	326
	BH8	-----	326
25	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
30	WMJ2	.....Arg---ArgGlu...---IleGlyIle	320
	RFENV	.....ValIleTyrAlaThr---Gln---IleGlyAsp	337
	Z6	GlyLeu-----...GlnAlaLeuTyrThr---Arg---ArgThrLysIleIle	327
	Z3	ArgIle-----LysVal---TyrAlaLys---Gly.....	319
	NY5	GlyPro-----ThrLeuTyrAlaArgGlu-----AspIle	320
	CDC42	.....ValTrpTyr---Thr---Glu---LeuGlyAsn	335
35	LAV2	MetSer-----HisVal---HisSerHisTyrGlnProIle---Lys	323
40	HXB2	...AGA...CAAGCACATTGT	
		...Arg...GlnAlaHisCys	331
	BH102	-----	331
	BH8	-----	331
	HXB3	-----	331
	H9M	-----	331
	BRU	-----	336
	MAL	-----Arg---Tyr---	334
	ELI	IleIleGly-----	330
45	ARV2	Ile---Lys...-----	333
	WMJ2	Ile-----	326
	RFENV	Ile---Lys...-----	343
	Z6	Gly...-----	334
	Z3	IleThrGly-----	326
	NY5	-----	325
50	CDC42	Ile-----	341
	LAV2	ArgProArg-----Met---	330

55 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung von Peptiden, die in der Lage sind, immunologisch die neutralisierenden Bereiche von HIV-Proteinen nachzuahmen, welches Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- die monoklonalen Antikörper, die unter Verwendung der oben genannten Zelllinie hergestellt sind, an ein Substrat oder einen Träger bindet oder daran immobilisiert;

- die rekombinanten Fusionsproteine, die von einem eukaryontischen oder bakteriellen Wirt exprimiert werden, oder die HIV-Proteine aus einem HIV-Extrakt oder -Lysat mit den immobilisierten Antikörpern unter Bildung eines Immunkomplexes in Kontakt bringt;
- die Immunkomplexe oder Antigenfragmente vom Träger abtrennt, und
- die Peptide gewinnt.

Ein solches Peptid I, das auch als Peptid 29 bezeichnet wird, ist im offenen env-Leseraster etwa von den Aminosäureresten 308 bis 328 codiert und besitzt die folgende Aminosäuresequenz, bei der die Oligopeptide innerhalb dieser Sequenz lineare Epitope dieser Sequenz umfassen:

**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'**

In der Y und Y', soweit vorhanden, jeweils Sequenzen von bis zu etwa 20 Aminosäuren bedeuten. Wenn Y und/oder Y' vorhanden sind, können diese beispielsweise eine oder mehrere Aminosäuren aus Sequenzen, die die Aminosäurereste 308 bis 328 der HIV-Hüllsequenz flankieren, oder irgendeinen Teil dieser flankierenden Sequenzen umfassen. So kann Y beispielsweise und ohne darauf begrenzt zu sein, die LAV<sub>BRU</sub>-Hüllaminosäuresequenz etwa von den Resten 301 bis 307 ganz oder teilweise umfassen und Y' kann die LAV<sub>BRU</sub>-Hüllaminosäuresequenz etwa von den Resten 329 bis 336 ganz oder teilweise umfassen, wie folgt:

**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.**

In alternativer Weise kann man gekürzte Sequenzen dieser Peptide herstellen. In dieser Hinsicht sind die folgenden Sequenzen des Peptids 29 besonders brauchbar:

**III (29b)**

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

worin Y und/oder Y', soweit vorhanden, jeweils Sequenzen von bis zu etwa 20 Aminosäureresten bedeuten;

**IV (29c)**

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

worin Y und Y', soweit vorhanden, jeweils Sequenzen bis zu etwa 20 Aminosäureresten bedeuten.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform sind besonders interessierende homologe Bereiche des ARV-2-Isolats in dem env-open-Leseraster von etwa den Aminosäureresten Nr. 306 bis etwa 323 codiert. Sie haben typischerweise die folgende Aminosäuresequenz, bei der Oligopeptide innerhalb dieser Aminosäuresequenz lineare Epitope innerhalb einer derartigen Sequenz umfassen.

## V (177)

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

worin Y und Y', soweit vorhanden, jeweils 1 bis etwa 20 oder mehr Aminosäurereste umfassen. Wenn Y und/oder Y' vorhanden sind, können sie 1 oder mehrere Aminosäurereste von Sequenzen, welche die Aminosäurereste 306 bis 323 der ARV-2-Hüllsequenz flankieren, oder einen Teil dieser flankierenden Sequenzen umfassen. Insbesondere kann Y die HIV-Hüllaminosäuresequenz etwa von den Resten 299 bis 306 ganz oder teilweise umfassen; Y' kann die HIV-Hüllaminosäuresequenz etwa von den Resten 324 bis 333 ganz oder teilweise umfassen.

In alternativer Weise kann man verkürzte Sequenzen der Peptide V herstellen. In dieser Hinsicht sind die folgenden Sequenzen besonders brauchbar:

## VI (177a)

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

## 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'**

worin Y und/oder Y', soweit vorhanden, jeweils Sequenzen von bis zu 20 oder mehr Aminosäureresten bedeuten.

Ein weiteres Beispiel umfaßt homologe Bereiche des LAV-2-Isolats, wie sie beispielsweise im offenen env-Leseraster etwa von den Aminosäureresten 311 bis 330 codiert sind. Sie besitzen typischerweise die folgende Sequenz:

## 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'**

worin Y und/oder Y', soweit vorhanden, jeweils Sequenzen von bis zu 20 oder mehr Aminosäurereste bedeuten (siehe Nature 326:662 (1987), worauf hiermit Bezug genommen wird).

Die von der neuen Zelllinie produzierten monoklonalen Antikörper sind in der Lage, bei extrem hohen Titern (von  $10^2$  bis  $10^4$  bis etwa  $10^7$  oder mehr) neutralisierende Bereiche, die in einer vorbestimmten Sequenz des Hüllglykoproteins gp110 oder p25 enthalten sind, deren Proteinprekursoren, biologisch exprimierte rekombinante Fusionsproteine und synthetische Peptide, die ein oder mehrere Epitome innerhalb des vorbestimmten Sequenzbereiches von gp110 oder p25 enthalten, selektiv zu erkennen. Die Hybridzellen besitzen ein identifizierbares Chromosom, bei dem sich die Keimbahn-DNA umgeordnet hat, um für einen Antikörper zu codieren, der eine Bindungsstelle für ein Epitop an gp110 oder p25 aufweist, das einige oder alle klinischen HIV-Isolate aufweisen. Diese monoklonalen Antikörper kann man auf vielfältige Weise anwenden. Dazu zählen die Anwendungen in der Diagnose und Therapie sowie die Anwendung zur Identifizierung weiterer kreuz-reaktiver Antikörper, wie blockierende Antikörper. Peptide oder Polypeptide, die das (die) Epitop(e) enthalten, mit dem (denen) sie reagieren, finden separate Anwendung als Immunogene für Vakzine oder als therapeutische Mittel.

55 Blockierende Peptide

Hauptsächlich zur Anwendung zusammen mit den obigen Peptiden oder neutralisierenden monoklonalen Antikörpern können weitere Peptide oder Antikörper verwendet werden, die die HIV-Bindung an Rezeptoren

stören, um die HIV-Infektivität weiter zu schwächen. Vorzugsweise kann man die sogenannten "blockierenden Peptide", die in der Lage sind, die Virusproliferation zu inhibieren, sowie monoklonale Antikörper, die spezifisch für Epitope sind, die in derartigen blockierenden Peptiden enthalten sind, dazu verwenden, die Wirksamkeit der Behandlung von HIV-Infektionen zu steigern. HIV-blockierende Peptide entsprechen typischerweise derjenigen HIV-Aminosäuresequenz, von der man annimmt, daß sie für die Anlagerung des Virus an eine Wirtszelle wesentlich ist, beispielsweise die env-codierten Aminosäurereste etwa 190 bis etwa 197 von LAV<sub>BRU</sub> und etwa 185 bis etwa 192 von ARV-2 und HTLV-III(BH-10). Dazu zählen das Peptid T-Oktapeptid (Ala-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr) und dessen verschiedene Derivate (z.B. IX unten) und Analoge (z.B. XI, unten), das von Pert et al (1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9254-9258, worauf hiermit Bezug genommen wird) beschrieben ist und das sich auf dem Hüllglykoprotein (gp110 oder 120) befindet.

Von besonderem Interesse sind beispielsweise blockierende Peptide mit den nachfolgenden Sequenzen, wobei vorzugsweise der NH<sub>2</sub>-Terminus acetyliert und der COOH-Terminus amidiert ist:

- 15 **IX (173D)**  
**Y-dAla-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y' ;**  
**X (186)**  
**Y-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y' ;**  
20 **XI (187)**  
**Y-Thr-Thr-Ser-Tyr-Thr-Y' ;**  
**XII (188)**  
25 **Y-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y' ;**  
**XIII (189)**  
**Y-Asn-Thr-Ser-Tyr-Gly-Y' ;**  
30 **XIV (190)**  
**Y-Asp-Thr-Asn-Tyr-Ser-Y' ;**  
**XV (191)**  
**Y-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y' ;**  
35

worin bei jedem Peptid Y und Y', soweit vorhanden, jeweils eine Aminosäuresequenz von bis zu etwa 20 Aminosäuren bedeutet. Epitope oder antigene Determinanten innerhalb dieser Peptide sind typischerweise durch wenigsten 5 benachbarte Aminosäuren definiert und finden Anwendung beispielsweise für die Nachahmung natürlich vorkommender HIV-Antigen Stellen bei der Herstellung von HIV-reaktiven Antikörpern und Vakzinen.

Gewinnung monoklonaler Antikörper

45 Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die spezifisch mit einem oder mehreren neutralisierenden Bereichen von HIV reagieren, verwendet die oben genannte Zelllinie und ist gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

- Verabreichen einer immunogen wirksamen Menge eines mit HIV-Proteinen angereicherten Antigenpräparates an einen Wirt;
- 50 - Überwachen der Produktion der Antikörper, die mit gp110-Antigen-Determinanten reagieren, im immunisierten Wirt;
- Gewinnung von Antikörper-produzierenden Zellen aus dem Wirt und Immortalisieren derselben;
- Selektion der immortalisierten Zellen, die Antikörper gegen HIV gp110 produzieren;
- Klonierung der immortalisierten Zellen für die Produktion von Zelllinien; und
- 55 - Züchtung der Zelllinien, die in der Lage sind, Antikörper zu produzieren, die mit einem oder mehreren neutralisierenden HIV-Bereichen reagieren, und Gewinnung der Antikörper.

Erfindungsgemäß ist ein Verfahren zur Erzeugung einer solchen Zelllinie dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Schritte umfaßt:

- Verabreichen einer immunogen wirksamen Menge eines mit HIV-Proteinen angereicherten Antigenpräparates an einen Wirt;
- Überwachen der Produktion der Antikörper, die mit gp110-Antigen-Determinanten reagieren, im immunisierten Wirt;
- 5 - Gewinnung von Antikörper-produzierenden Zellen aus dem Wirt und Immortalisieren derselben;
- Selektion der immortalisierten Zellen, die Antikörper gegen HIV gp110 produzieren; und
- Klonierung der immortalisierten Zellen für die Produktion von Zelllinien.

Zu derartigen Zellen zählen Myelomlinien, Lymphomlinien oder andere Zelllinien, die in der Lage sind, die Expression und Sekretion des Antikörpers *in vitro* herbeizuführen. Der Antikörper kann ein natürlich vorkommendes Immunglobulin eines Säugetieres sein, das durch Transformation eines Lymphocyten, insbesondere eines Splenocyten, mit Hilfe eines Virus oder mittels Fusion des Lymphocyten mit einer neoplastischen Zelle, beispielsweise einem Myelom, unter Bildung einer Hybridzelllinie produziert wird. Typischerweise erhält man den Splenocyten von einem Tier, das gegen das HIV-Virus oder ein Fragment mit einer epitopen Stelle davon immunisiert wurde.

15 Immunisierungsmethoden sind bekannt, sie können beträchtlich variieren und dennoch wirksam bleiben, siehe Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 2. Aufl. (1986), auf das hiermit Bezug genommen wird. Zerstörte Viren, synthetische Peptide und bakterielle Fusionsproteine, die die antigenen Fragmente des gp110 oder p25-Moleküls enthalten, kann man als Immunogene verwenden. Vorzugsweise wird das Immunogen zerstörter Viren, Peptide oder rekombinanter Proteine durch Proteine 20 oder Fragmente davon angereichert, welche die Epitope enthalten, wofür Antikörper produzierende B-Zellen oder Splenocyten gewünscht sind. Insbesondere kann man Lösungen, die Lysate oder Extrakte zerstörter Viren enthalten, oder Überstände von biologisch exprimierten rekombinanten Proteinen oder zerstörten Expressionsvektoren durch Glykoproteine wie gewünscht anreichern, wobei man Reinigungsmethoden, wie beispielsweise die Polyacrylamid-Gelelektrophorese, verwendet.

25 Die Lektin-Affinitätsreinigung ist eine bevorzugte zweckmäßige Methode zur Reinigung von gp110 und anderen Glykoproteinen, beispielsweise die Affinitätsreinigung unter Verwendung von lentilem Lektin. Das Ausmaß, in dem die Glykoproteine aus den Lösungen zur Anwendung als Immunogen gereinigt werden, kann stark schwanken, d.h. von weniger als 50 % bis zu üblicherweise wenigstens 75 bis 95 %, wünschenswerterweise 95 bis 99 % und besonders erwünscht bis zur absoluten Homogenität.

30 Wenn man die Proteine in dem gewünschten Maß gereinigt hat, kann man sie in einem zur Immunisierung geeigneten physiologischen Träger suspendieren oder darin lösen oder man kann sie an ein Adjuvans koppeln. Eine bevorzugte Technik umfaßt beispielsweise die Adsorption der Proteine und der Fragmente davon an lentiler Lektinagarose oder einem anderen makromolekularen Träger für die Injektion. Immunogene Mengen antigener Präparate, die mit HIV-Proteinen, einschließlich dem gp110-Glykoprotein und dem 35 p25-Kernprotein, oder den antigenen Teilen davon angereichert sind, werden im allgemeinen in Konzentrationen im Bereich von 1 µg bis 20 mg/kg des Wirtes injiziert. Die Verabreichung kann, beispielsweise durch intramuskuläre, peritoneale, subkutane, intravenöse etc., Injektion erfolgen. Die Verabreichung kann 1 x oder mehrere Male und üblicherweise in 1- bis 4-wöchigen Intervallen erfolgen. Die immunisierten Tiere kontrolliert man hinsichtlich der Produktion von Antikörpern gegen die gewünschten Antigene, anschließend 40 entfernt man die Milz, isoliert die B-Lymphocyten der Milz und fusioniert sie mit einer Myelomzelllinie oder transformiert sie. Die Transformation oder Fusion kann man in üblicher Weise durchführen, die Fusionsmethode ist in zahlreichen Patenten beschrieben, beispielsweise in US-PS'en 4 172 124, 4 350 683, 4 363 799, 4 381 292 und 4 423 147; man vergleiche auch, Kennett et al, *Monoclonal Antibodies* (1980) und die darin angeführten, sowie Godin wie oben erwähnt; auf alle diese Publikationen wird hiermit Bezug 45 genommen.

Die immortalisierten Zelllinien kann man klonieren und gemäß üblichen Verfahren einem Screening unterziehen. In den Zellüberständen kann man die Antikörper, die in der Lage sind, an die gewünschten gp110 oder p25-HIV-Proteine zu binden, die rekombinanten Fusionsproteine oder die synthetischen Peptide nachweisen, die den gewünschten epitopen Bereich enthalten. Geeignete immortalisierte Zelllinien kann man dann *in vitro* wachsen lassen oder in die Peritonealkavität eines geeigneten Wirts zur Gewinnung von 50 Ascites-Flüssigkeit injizieren. Weil erfindungsgemäße Antikörper vorliegen, die als spezifisch für Epitope bekannt sind, welche beispielsweise innerhalb der Bereiche vorhanden sind, die durch den LAV<sub>BRU</sub>-Genombereich von etwa bp6688 bis etwa bp 6750 (kodierend für Peptid 29) oder von etwa bp7246 bis etwa 7317 (kodierend für Peptid 36) (bp-Numerierung gemäß Wain-Hobson et al., *Cell* 44:9 1985, auf die hiermit 55 Bezug genommen wird), kodiert sind, kann man die Überstände mit den monoklonalen Antikörpern einem kompetitiven Assay unterziehen. Somit können weitere immortalisierte Hybridom-Zelllinien mit den gewünschten Bindungseigenschaften leicht aufgrund der Verfügbarkeit der erfindungsgemäßen, für ein bestimmtes Antigen spezifischen Antikörper aus einer Vielzahl von Quellen herstellen. Alternativ kann man

diese Zelllinien mit anderen neoplastischen B-Zellen fusionieren, wobei diese anderen B-Zellen als Empfänger für die Genom-DNA, die für die Antikörper kodiert, dienen kann.

Neoplastische B-Zellen von Nagetieren, insbesondere Mäusen oder Ratten, sind bevorzugt. Sie können jedoch auch von anderen Säugetierspezies stammen, beispielsweise von Lagomorpha, Rindern, Schafen, 5 Pferden, Schweinen, Vögel (Avian) oder dergleichen. Man kann die Immunisierung dieser Tiere auf einfache Weise durchführen und ihre Lymphocyten, insbesondere die Splenocyten, für Fusionen gewinnen.

Die von den transformierten oder Hybridzelllinien sekretierten monoklonalen Antikörper können von einer der Klassen oder Unterklassen der Immunoglobuline sein, wie IgM, IgD, IgA, IgG<sub>1-4</sub> oder IgE. IgG ist bevorzugt, weil es sich dabei um den üblichsten Isotyp handelt, der in Diagnose-Assays verwendet wird. 10 Die monoklonalen Antikörper können intakt oder als Fragmente, wie Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, verwendet werden. Sie werden üblicherweise jedoch intakt verwendet.

Um eine mögliche Antigenität eines monoklonalen Antikörpers, der nicht vom Menschen stammt, in einem Humanwirt zu umgehen, kann man chimere Antikörper konstruieren, bei denen das Antigen-Bindungsfragment eines Immunoglobulinmoleküls (variabler Bereich) mittels einer Peptidverknüpfung von 15 wenigstens einem Teil eines anderen Proteins gebunden ist, das beim Menschen nicht als fremd erkannt wird, wie beispielsweise die "cast out portion" eines Humanimmunoglobulinmoleküls. Dies kann dadurch erfolgen, daß man die Exone des variablen Bereichs des Tieres mit Human-Kappa- oder -gammaexonen des konstanten Bereichs fusioniert. Hierfür sind dem Fachmann mehrere Methoden bekannt, beispielsweise diejenigen, die in PCT 86/01533, EP-A-171496 und EP-A-173494 beschrieben sind, auf die hiermit Bezug 20 genommen wird.

#### Pharmazeutische Formulierungen und Anwendungen

Die monoklonalen Antikörper mit neutralisierender Wirkung, beispielsweise diejenigen, die mit einer 25 Epitopstelle auf gp110 oder p25 oder mit einem blockierenden Peptid reagieren, können pharmazeutischen Mitteln als eine Komponente einverleibt werden, um HIV-Infektionen zu schwächen. Das Mittel soll eine therapeutische oder prophylaktische Menge von wenigstens einem der genannten monoklonalen Antikörper zusammen mit einem pharmazeutisch wirksamen Träger enthalten. Der pharmazeutische Träger soll eine 30 kompatible, nicht-toxische Substanz sein, die geeignet ist, die monoklonalen Antikörper an den Patienten zu vermitteln. Man kann steriles Wasser, Alkohol, Fette, Wachse und inerte Feststoffe als Träger verwenden. Pharmazeutisch annehmbare Adjuvantien (Puffer, Dispergiermittel) können den Mitteln ebenfalls einverleibt werden. Diese Mittel können einen einzelnen monoklonalen Antikörper enthalten, um beispielsweise 35 spezifisch für HIV-Stämme mit Hüllglykoproteinen zu sein, die eine Epitopstelle innerhalb eines Bereiches enthalten, der durch bp6688 bis bp6750 kodiert ist. In alternativer Weise kann ein pharmazeutisches Mittel einen oder mehrere monoklonale Antikörper enthalten und einen "Cocktail" bilden. Beispielsweise ein 40 Cocktail, der monoklonale Antikörper gegen verschiedene HIV-Stämme enthält, stellt ein universell anwendbares Produkt mit therapeutischer oder prophylaktischer Aktivität gegen die meisten klinischen HIV-Isolate dar. Der Cocktail kann monoklonale Antikörper enthalten, die an HIV-Proteine oder -glykoproteine binden, die sich von gp110 oder p25 unterscheiden, wie beispielsweise gp41-Glykoprotein oder p34-Nuklease/Integrase. Das Molverhältnis der verschiedenen monoklonalen Antikörperkomponenten unterscheidet sich im allgemeinen um nicht mehr als den Faktor 10, insbesondere um nicht mehr als den Faktor 5 und liegt im allgemeinen bei etwa 1:1-2 pro jeder anderer Antikörperkomponente.

Die monoklonalen Antikörper kann man als separat zu verabreichende Mittel einsetzen, die zusammen mit anderen anti-retroviralen Mitteln, einschließlich blockierenden Peptiden, gegeben werden. Der gegen- 45 wärtige Stand der Entwicklung anti-retroviraler Mittel und von Anti-HIV-Mittel ist im einzelnen in Mitsuya et al., Nature 325:773-778, 1987 beschrieben, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Die monoklonalen Antikörper, Peptide und pharmazeutischen Mittel sind insbesondere zur oralen und parenteralen Verabreichung brauchbar. Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Mittel parenteral verabreicht, d.h. subkutan, intramuskulär oder intravenös. Die Mittel zur parenteralen Verabreichung umfassen 50 eine Lösung der monoklonalen Antikörper, Peptide oder eines Cocktails davon in einem annehmbaren Träger, vorzugsweise einem wäßrigen Träger. Man kann eine Vielzahl wäßriger Träger einsetzen, beispielsweise Wasser, gepuffertes Wasser, 0,4%-ige Kochsalzlösung, 0,3%-iges Glycin und dergleichen. Diese Lösungen sind steril und im allgemeinen frei an Teilchen. Die Mittel kann man mit Hilfe herkömmlicher und bekannter Methoden sterilisieren. Die Mittel können pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe enthalten, wie sie erforderlich sind, um annähernd physiologische Bedingungen einzustellen, wie Mittel zur Einstellung des 55 pH-Werts und Puffer, Mittel zur Einstellung der Toxizität und dergleichen, beispielsweise Natriumacetat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid, Natriumlactat und dergleichen. Die Menge an Antikörper in diesem Formulierungen kann in weitem Umfange variieren, d.h. von weniger als ungefähr 0,5 Gew.-%,

üblicherweise etwa oder wenigstens etwa 1 Gew.-% bis zu 15 oder 20 Gew.-%. Diese Menge wird hauptsächlich im Hinblick auf die Flüssigkeitsvolumina, Viskositäten und dergleichen, und vorzugsweise im Hinblick auf die Art der Verabreichung gewählt.

Ein typisches pharmazeutisches Mittel zur intramuskulären Injektion kann somit 1 ml steriles gepuffertes Wasser und 50 mg monoklonale Antikörper enthalten. Ein typisches Mittel zur intravenösen Infusion kann 250 ml sterile Ringer-Lösung und 150 mg monoklonale Antikörper enthalten. Methoden zur Herstellung parenteral verabreichbarer Mittel sind bekannt oder dem Fachmann geläufig und sind detailliert beispielsweise in Remington's Pharmaceutical Science, 15. Aufl., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) beschrieben, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Die monoklonalen Antikörper und Peptide kann man zur Lagerung lyophilisieren und vor der Anwendung in einem geeigneten Träger rekonstituieren. Dieses Verfahren hat sich bei üblichen Immunglobulinen als wirksam erwiesen. Dabei kann man bekannte Lyophilisierungs- und Rekonstitutionstechniken anwenden. Es ist für den Fachmann ersichtlich, daß die Lyophilisierung und Rekonstitution zu einem unterschiedlichen Grad an Antikörperaktivitätsverlust führen kann (bei herkömmlichen Immunglobulinen neigen IgM-Antikörper dazu einen größeren Aktivitätsverlust zu erleiden als IgG-Antikörper) und daß daher die angewandte Menge angepaßt werden muß, um den Verlust zu kompensieren.

Die Mittel, die die monoklonalen Antikörper, Peptide oder Cocktails davon enthalten, kann man zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von HIV-Infektionen verabreichen. Bei der therapeutischen Verabreichung werden die Mittel einem Patienten, der bereits mit HIV infiziert ist, in einer Menge verabreicht, die ausreicht, um die Infektion und die damit verbundenen Komplikationen zu heilen oder zumindest teilweise zum Stehen zu bringen. Die Dosis, die man benötigt, um dies zu erreichen, ist als "therapeutisch wirksame Dosis" definiert. Die bei dieser Anwendung wirksamen Mengen richten sich nach der Schwere der Infektion und dem allgemeinen Zustand des Immunsystems des Patienten, sie liegen im allgemeinen im Bereich von etwa 1 bis 200 mg Antikörper pro kg Körpergewicht, wobei Dosierungen von 5 bis 25 mg pro kg üblicherweise zur Anwendung kommen. Da diese Produkte im allgemeinen bei schweren Erkrankungen, d.h. in lebensbedrohenden oder potentiell lebensbedrohenden Situationen zur Anwendung kommen, ist es möglich und kann vom behandelnden Arzt erwünscht sein, eine wesentlich größere Menge dieser Antikörper zu verabreichen.

Bei prophylaktischer Anwendung verabreicht man die Mittel, die die genannten Peptide, Antikörper oder einen Cocktail davon enthalten, einem Patienten, der noch nicht mit HIV infiziert ist, der aber möglicherweise vor kurzem einer derartigen Infektion ausgesetzt war oder angenommen hat, daß er dieser ausgesetzt war oder einem Risiko unterliegt, dem Virus ausgesetzt zu sein. Die prophylaktische Verabreichung dient dazu, die Widerstandskraft des Patienten gegen eine potentielle Infektion zu stärken oder den Patienten gegen das Virus zu impfen. Eine hierfür geeignete Menge wird als "prophylaktisch wirksame Dosis" definiert. Auch bei dieser Anwendung richten sich die genauen zu verabreichenden Mengen nach dem Gesundheitszustand und dem allgemeinen Zustand des Immunsystems des Patienten, sie liegen im allgemeinen im Bereich von 0,1 mg bis 25 mg pro kg, insbesondere 0,5 mg bis 2,5 mg pro kg.

Man kann Einzel- oder Mehrfachverabreichungen der Mittel vornehmen, wobei die Dosis und das Verabreichungsschema vom behandelnden Arzt ausgewählt werden. Die pharmazeutischen Formulierungen sollten in jedem Fall eine Menge an erfindungsgemäßen Antikörpern zur Verfügung stellen, die ausreicht, um den Patienten wirksam zu behandeln.

Darüber hinaus finden die monoklonalen Antikörper als Target-spezifisches Trägermolekül Anwendung. Ein Antikörper kann an ein Toxin zur Bildung eines Immunotoxins oder an ein radioaktives Material oder Arzneiproduktmittel zur Bildung eines Radiopharmakon oder Arzneimittels gebunden sein. Methoden zur Herstellung von Immunotoxinen und Radiopharmaka sind bekannt (siehe beispielsweise Cancer Treatment Reports 68:317 (1984)).

Es ist auch möglich, daß Heteroaggregate aus den monoklonalen Antikörpern und Human-T-Zellaktivatoren, wie monoklonale Antikörper gegen das CD3-Antigen oder gegen den  $F_c\text{-}\gamma$ -Rezeptor an T-Zellen, Human-T-Zellen oder  $F_c\text{-}\gamma$ -aufweisende Zellen (wie K-Zellen oder Neutrophile) in die Lage versetzen, HIV-infizierte Zellen über eine Antikörper abhängige, zellvermittelte Cytolyse (ADCC) abzutöten. Derartige Heteroaggregate kann man beispielsweise bilden, indem man die Anti-HIV-Antikörper mit den Anti-CD3-Antikörpern unter Verwendung des heterobifunktionellen Reagens N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionat kovalent vernetzt, wie dies von Karpowsky et al., J. Exp. Med. 160:1686 (1984) beschrieben ist, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Die Mittel auf Basis der Peptide alleine können auch therapeutische Anwendung finden, wobei die Verabreichung zu einer Reduktion oder zur Eliminierung von HIV bei einem infizierten Wirt führt. Diese Mittel, wie Peptid 29, die blockierenden Peptide und Peptid 126, das in der US-PS 5 075 211 beschrieben ist, kann man in geeigneten physiologischen Trägern intravenös, subkutan, intramuskulär, intraperitoneal

usw. verabreichen. Verschiedene Träger sind geeignet, dazu zählen Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Kochsalzlösung, Wasser, Kaliumchlorid, Natriumlactat oder dergleichen. Die Peptidkonzentration kann in einem weiten Bereich in Abhängigkeit von der endgültigen Anwendung, Aktivität und Art der Verabreichung variieren. Vorzugsweise liegt bei den Peptiden eine Amidierung des COOH-Terminus, eine Formylierung des NH<sub>2</sub>-Terminus oder eine andere pharmazeutisch annehmbare Derivatisierung vor. Die Zugabe blockierender Peptide zu den Peptiden, die einen neutralisierenden HIV-Bereich nachahmen, und/oder die spezifisch reagierenden Antikörper führen zu einer signifikant erhöhten therapeutischen Wirksamkeit. Die Formulierungen können auch andere Anti-HIV-Mittel enthalten (die von den die Peptide bindenden monoklonalen Antikörper verschieden sind), wie beispielsweise 3'-Azido-3'-deoxythymidin, 2',3'-Dideoxycytidin, 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrocytidin etc.

#### Anwendung der monoklonalen Antikörper bei der Immunoaffinitätsreinigung

Die monoklonalen Antikörper, die spezifisch für Polypeptide sind, welche gp110 oder andere Antigen-Determinanten enthalten, insbesondere diejenigen Antigen-Determinanten, die von biologisch exprimierten rekombinanten Fusionsproteinen oder Lysaten oder Extrakten von kultivierten HIV erhalten wurden, lassen sich besonders vorteilhaft bei Reinigungsverfahren anwenden. Im allgemeinen haben die Antikörper Affinitätskonstanten (affinity association constants) im Bereich von 10<sup>8</sup> bis 10<sup>12</sup> M. Derartige Antikörper kann man verwenden zur Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen von dem Kulturmedium des rekombinanten Exprepressionssystems, wenn das exprimierte Protein sekretiert wird, oder von den Komponenten des zerstörten, biologischen Expressionssystems, wenn das Protein nicht sekretiert wird. Die monoklonalen Antikörper, die in der Lage sind, mit gp110 oder anderen Antigen-Determinanten zu reagieren, werden im allgemeinen an ein Substrat oder einen Träger gebunden oder daran immobilisiert. Die Lösung, die die HIV-Antigendeterminanten enthält, wird dann mit dem immobilisierten Antikörper unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die zur Bildung von Immunkomplexen zwischen dem Antikörper und den die gp110-Antigen-Determinanten enthaltenden Polypeptiden geeignet sind. Ungebundenes Material wird von den gebundenen Immunkomplexen abgetrennt, diese Komplexe oder die gp110-Antigenfragmente werden dann vom Träger abgetrennt.

Die monoklonalen Antikörper werden typischerweise bevor sie an den Träger gebunden werden, von Ascitesflüssigkeit oder Zellkulturüberständen grob gereinigt. Derartige Reinigungsverfahren sind dem Fachmann bekannt, dazu zählt die Fraktionierung mit Neutralsalzen bei hoher Konzentration. Weitere Methoden, wie DEAE-Chromatographie, Gelfiltrations-Chromatographie, präparative Gelelektrophorese oder Protein-Affinitäts-Chromatographie, kann man ebenfalls verwenden, um die monoklonalen Antikörper zu reinigen bevor sie als Immunoadsorbens Anwendung finden.

Der Träger, an dem die monoklonalen Antikörper immobilisiert werden, sollte die folgenden allgemeinen Eigenschaften besitzen:

- (a) im allgemeinen schwache Wechselwirkungen mit Proteinen, um eine nicht-spezifische Bindungen zu minimieren,
- (b) gute Fließeigenschaften, die einen Durchfluß von Materialien mit hohem Molekulargewicht erlauben,
- (c) Vorhandensein chemischer Gruppen, die aktiviert oder modifiziert werden können, um eine chemische Bindung des monoklonalen Antikörpers zu ermöglichen,
- (d) physikalische und chemische Stabilität unter den Bedingungen, die für die Bindung des monoklonalen Antikörpers Anwendung finden und
- (e) Stabilität gegenüber den Bedingungen und Konstituenten der Puffer, die für die Adsorption und Elution des Antigens erforderlich sind. Einige üblicherweise verwendete Träger sind Agarose, derivatisierte Polystyrole, Polysaccharide, Polyacrylamidperlen, aktivierte Cellulose, Glas und dergleichen. Es gibt verschiedene chemische Methoden, um die Antikörper an die Substratträger anzuknüpfen, siehe allgemein Cuatrecasas P., *Advances in Enzymology* 36:29 (1972). Die genannten Antikörper kann man direkt oder in alternativer Weise über ein Bindeglied oder Zwischenstück (linker, spacer) an dem Träger anknüpfen.

Die für die Immobilisierung monoklonaler Antikörper an chromatographischen Trägern erforderlichen allgemeinen Bedingungen sind bekannt, siehe beispielsweise P. Tijssen, 1985, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*, worauf hiermit Bezug genommen wird. Das tatsächlich verwendete Koppelungsverfahren ist in geringem Maße abhängig von der Eigenschaft und der Art des anzukoppelnden Antikörpers. Monoklonale Antikörper besitzen Eigenschaften, die üblicherweise von Charge zu Charge konsistent sind, so daß die erwähnten Bedingungen optimiert werden können. Die Verknüpfung erfolgt typischerweise über kovalente Bindungen.

Zu der Separationsmatrix gibt man dann eine Suspension von Extrakten oder Lysaten von HIV-Viren, den Überstand von einem kultivierten biologischen Expressionssystem oder eine Suspension der zerstörten Zellen. Man inkubiert die Mischung unter Bedingungen und während einer Zeitdauer, die zur Bildung des Immunkomplexes ausreichend ist, üblicherweise wenigstens 30 Min., zweckmäßiger 2 bis 24 h. Die Immunkomplexe, die Polypeptide mit antigenen Teilen von gp110 enthalten, trennt man aus der Reaktionsmischung ab. Man entfernt die Mischung beispielsweise durch Elution und wäscht die gebundenen Immunkomplexe extensiv mit Adsorptionspuffer. Die Immunkomplexe kann man dann von der Separationsmatrix eluieren, wobei man ein Eluierungsmittel verwendet, das mit dem zur Anwendung kommenden Träger verträglich ist. Derartige Eluierungsmittel sind dem Fachmann bekannt. Auch die Polypeptide, die gp110 oder andere antigene Teile enthalten, kann man selektiv entfernen. Beispielsweise kann man Peptide, die ein Epitop enthalten, das durch die Antikörper erkannt wird, dazu verwenden, um um die Antikörperbindungsstellen zu konkurrieren. Dies stellt ein alternatives Elutionsverfahren dar, das unter milden Elutionsbedingungen durchgeführt werden kann. Das selektiv adsorbierte Polypeptid, das das gp110-Antigen enthält, kann man von einem Antikörper-Affinitätsadsorbens eluieren, indem man den pH und/oder die Ionenstärke des Puffers ändert. Chaotrope Mittel finden ebenfalls Anwendung zur Entfernung des gebundenen Antigens. Die Wahl eines chaotropen Mittels, dessen Konzentration und der Eluierungsbedingungen hängen von den Charakteristika der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung ab, aber sobald sie festgelegt sind, sollten sie keinen Änderungen unterworfen werden, die üblicherweise bei polyklonalen Affinitäts-Separations-Systemen erforderlich sind.

Es kann erforderlich sein, den pH-Wert des eluierten Materials an den physiologischen pH-Wert anzupassen, wenn ein hoher oder niedriger pH-Wert oder Ionenstärkepuffer verwendet wurden, um die gebundenen gp110-Antigene von der Separationsmatrix abzutrennen. Auch eine Dialyse oder eine Gelfiltrations-Chromatographie kann zur Entfernung überschüssiger, im Eluierungsmittel verwendeter Salze erforderlich werden, um die Rekonstitution von gp110 oder von Polypeptiden, die Antigenfragmente von gp110 enthalten, zu nativen Konformationen zu ermöglichen.

Die erfindungsgemäßen Verfahren ergeben beispielsweise im wesentlichen reines gp110 oder im wesentlichen reine Polypeptide, die Antigenfragmente davon enthalten, hergestellt entweder auf natürliche Weise durch infizierte Zellkulturen oder rekombinante Expressionssysteme von Bakterien, Hefen oder in Kultur gehaltenen Insekten oder Säugetierzellen. gp110, die Fragmente davon oder andere gereinigte Proteine besitzen typischerweise eine Reinheit von mehr als 50 %, üblicherweise von wenigstens 75 % und häufig von mehr als 95 bis 99 %. Diese Produkte finden vielfältige Anwendung.

Die HIV-gp110-Proteine, die Polypeptide, die Antigenfragmente davon enthalten oder andere Proteine, die im wesentlichen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigt wurden, haben viele Anwendungsmöglichkeiten. Dazu zählen AIDS-Subunit-Vakzinformulierungen, bei denen das Immunogen eine wirksame Dosis an Antigen-Determinanten von beispielsweise gp110 oder einem neutralisierenden Bereich davon umfaßt. Zu weiteren Komponenten der Formulierung können diejenigen antigenen Teile von HIV-Proteinen oder -Glykoproteinen zählen, die die Produktion von Antikörpern (vorzugsweise neutralisierenden Antikörpern) in einem immunisierten Wirt stimulieren, wobei diese Antikörper in der Lage sind, eine Schutzwirkung gegen eine nachfolgende HIV-Infektion auszuüben.

#### Anwendung der monoklonalen Antikörper in der Diagnose

Die genannten monoklonalen Antikörper sind auch für Diagnosezwecke brauchbar. Sie können hierfür markiert oder unmarkiert zur Anwendung kommen. Typischerweise umfaßt ein Diagnose-Assay den Nachweis einer Komplexbildung durch die Bindung eines monoklonalen Antikörpers an ein HIV-Antigen. Unmarkierte Antikörper finden beispielsweise in Agglutinationsassays Anwendung. Darüber hinaus können unmarkierte Antikörper in Kombination mit anderen markierten Antikörpern (zweiten Antikörpern), die mit den monoklonalen Antikörpern reaktiv sind, wie beispielsweise Antikörper, die spezifisch für Immunglobulin sind, eingesetzt werden. In alternativer Weise können die monoklonalen Antikörper direkt markiert werden. Man kann eine Vielzahl von Markierungsmitteln einsetzen, beispielsweise Radionuklide, fluoreszierende Substanzen, Enzyme, Enzymsubstrate, Enzymkofaktoren, Enzyminhibitoren, Liganden (insbesondere Haptene) etc. Zahlreiche Arten von Immunoassays stehen zur Verfügung, dazu zählen beispielsweise diejenigen, die in den US-PSen 3 817 827, 3 850 752, 3 901 654, 3 935 074, 3 984 533, 3 996 345, 4 034 074 und 4 098 876 beschrieben sind, auf die hiermit Bezug genommen wird.

Üblicherweise verwendet man die neuen monoklonalen Antikörper und Peptide in Enzym-Immunoassays, wobei beispielsweise die neuen Antikörper oder die zweiten Antikörper einer anderen Spezies an ein Enzym konjugiert werden. Wenn man eine biologische Probe mit HIV-Antigenen, wie Humanblutserum, Speichel, Samen, Vaginalsekretionen oder eine Virus-infizierte Zellkultursuspension, mit den Antikörpern

kombiniert, erfolgt eine Bindung zwischen den Antikörpern und denjenigen Molekülen, die das gewünschte Epitop aufweisen. Man kann dann derartige Proteine oder Virusteilchen von den ungebundenen Reagentien abtrennen und einen zweiten Antikörper (mit einem Enzym markiert) zugeben. Anschließend wird die Anwesenheit des Antikörper-Enzykonjugats, das spezifisch an das Antigen gebunden ist, bestimmt. Man kann auch weitere herkömmliche, dem Fachmann bekannte Verfahren verwenden.

Zum Nachweis einer HIV-Infektion oder der Anwesenheit von HIV-Antigenen kann man auch Kits unter Anwendung der genannten Antikörper zur Verfügung stellen. Die monoklonalen Antikörperzusammensetzungen kann man, üblicherweise in lyophilisierter Form entweder allein oder zusammen mit weiteren Antikörpern, die spezifisch für andere HIV-Epitope sind, zur Verfügung stellen. Die Antikörper, die an ein Markierungsmittel konjugiert sein oder unkonjugiert vorliegen können, sind in den Kits zusammen mit Puffern, wie Tris-, Phosphat-, Carbonatpuffer etc., Stabilisierungsmitteln, Bioziden, inerten Proteinen, wie Rinderserumalbumin oder dergleichen enthalten. Im allgemeinen liegen diese Materialien in einer Menge von weniger als etwa 5 Gew.-%, bezogen auf die Menge an aktivem Antikörper und üblicherweise in einer Gesamtmenge von wenigstens etwa 0,001 Gew.-%, bezogen auf die Antikörperkonzentration, vor. Es ist häufig wünschenswert, einen inerten Extender oder Excipienten zur Verdünnung der aktiven Bestandteile zuzugeben, wobei der Excipient in einer Menge von etwa 1 bis 99 Gew.-% der Gesamtzusammensetzung vorliegen kann. Wenn ein zur Bindung an die monoklonalen Antikörper fähiger zweiter Antikörper eingesetzt wird, liegt dieser üblicherweise in einem separaten Vial vor. Der zweite Antikörper ist typischerweise an ein Label konjugiert und in analoger Weise wie die oben beschriebenen Antikörperformulierungen formuliert.

Der Nachweis von gp110- oder p25-Antigenen oder des Ganzvirus in biologischen Proben findet bei der Diagnose einer HIV-Virusinfektion Anwendung. Zu biologischen Proben zählen, ohne darauf begrenzt zu sein, Blutserum, Speichel, Samen, Gewebebiopsieproben (Gehirn, Haut, Lymphknoten, Milz etc.), Zellkulturüberstände, zerstörte eukaryontische und bakterielle Expressionssysteme und dergleichen. Auf die Anwesenheit des Virus testet man, indem man die monoklonalen Antikörper mit der biologischen Probe unter Bedingungen inkubiert, die zu einer Immunkomplexbildung führen und man anschließend die Komplexbildung nachweist. Gemäß einer Ausführungsform weist man die Komplexbildung durch die Anwendung eines zweiten Antikörpers nach, der in der Lage ist, an einen monoklonalen Antikörper zu binden, welcher typischerweise an ein Markierungsmittel konjugiert und in analoger Weise wie die oben beschriebenen Antikörperformulierungen formuliert ist. Gemäß einer anderen Ausführungsform wird der monoklonale Antikörper an einen Festphasenträger gebunden, der dann mit der biologischen Probe in Kontakt gebracht wird. Nach der Inkubierung wird der markierte monoklonale Antikörper zugegeben, um das gebundene Antigen nachzuweisen.

#### Herstellung und Anwendung synthetischer Peptide

Die erfindungsgemäß hergestellten neuen Peptide können unter anderem immunologisch die Proteinepitope nachahmen, die durch das HIV-Retrovirus codiert sind, insbesondere die Epitope, die innerhalb der env- oder gag-Bereiche des Virusgenoms codiert sind, welche für die gp110 oder p25 kodieren. Zur Anpassung an die unterschiedlichen Verhältnisse von Stamm zu Stamm bei den jeweiligen Isolaten kann man eine Anpassung bezüglich konservativer Substitutionen und eine Auswahl unter Alternativen mit nicht-konservativen Substitutionen vornehmen. Diese Peptide kann man, um die HIV-Antigenproduktion in vitro oder in vivo zu inhibieren oder eliminieren, als Immunogene für den Nachweis des Virus oder von Antikörpern gegen das Virus in einer physiologischen Probe einsetzen. In Abhängigkeit von der Art des Schemas kann man die Peptide an einen Träger oder an andere Verbindungen konjugieren, die markiert oder unmarkiert, an eine feste Oberfläche gebunden etc. vorliegen.

Gemäß einer Ausführungsform stammen die Peptide von dem gp110-Bereich des Virus. Von besonderem Interesse ist der Bereich innerhalb des env-open-Leserasters der sich etwa vom Basenpaar (bp) 6688 bis etwa bp6750 und etwa vom bp7246 bis etwa 7317 erstreckt. Die hier interessierenden Peptide, einschließlich blockierender Peptide, umfassen wenigstens 5, manchmal 6, manchmal 8, manchmal 12, manchmal 21, häufig weniger als etwa 50, insbesondere weniger als etwa 35 und vorzugsweise weniger als etwa 25 Aminosäuren in einer Sequenz, die durch ein HIV-Retrovirus codiert ist.

Wünschenswerterweise sind die Peptide so klein wie möglich, enthalten aber dennoch im wesentlichen die gesamte Immunoreaktivität oder antivirale Aktivität eines größeren Peptids. In einigen Fällen kann es wünschenswert sein, zwei oder mehrere nicht-überlappende Oligopeptide zu verbinden, um eine einzige Peptidstruktur zu bilden, oder sie als einzelne Peptide gleichzeitig zu verwenden, wobei diese Peptide separat oder zusammen eine äquivalente Sensibilität des Ausgangsmaterials besitzen.

Die Peptide kann man durch Einführen konservativer oder nicht-konservativer Substitutionen modifizieren, wobei im allgemeinen weniger als 20 %-Punkte, insbesondere weniger als 10 %-Punkte der Aminosäuren

ausgetauscht werden. Wenn polymorphe Bereiche vorliegen, kann es wünschenswert sein, eine oder mehrere bestimmte Aminosäuren zu ändern, um die unterschiedlichen Epitope der verschiedenen Retrovirusstämme wirksamer nachahmen zu können. Häufig wird man Methionin durch Norleucin (Nor) ersetzen, um eine chemische Stabilität zu erzielen.

5 Es ist darauf hinzuweisen, daß das erfindungsgemäß zur Anwendung kommende Peptid nicht mit einer bestimmten HIV-Polypeptidsequenz identisch sein muß, solange die in Rede stehende Verbindung in der Lage ist, eine immunologische Kompetition mit den Proteinen von wenigstens einem Stamm des HIV-Retrovirus herbeizuführen. Die in Rede stehenden Peptide können deshalb auf vielfältige Weise geändert werden, beispielsweise durch Insertionen, Deletionen und Substitutionen in konservativer oder nicht-  
10 konservativer Weise, wenn derartige Änderungen Anwendungsvorteile nach sich ziehen. Mit einer konservativen Substitution sind Substitutionen gemeint, innerhalb der Gruppen, wie gly, ala; val, ile leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; phe, tyr; und nor, met. Üblicherweise unterscheidet sich die Sequenz um nicht mehr als 20 % von der Sequenz wenigstens eines Stammes eines HIV-Retrovirus, außer wenn weitere Aminosäuren an den beiden Termini hinzugefügt werden können, um einen "Arm" zur Verfügung zu stellen, mit Hilfe  
15 dessen das Peptid in einfacher Weise immobilisiert werden kann. Die Arme sind üblicherweise wenigstens eine Aminosäure lang und können 50 oder mehr Aminosäuren, häufiger 1 bis 10 Aminosäuren, lang sein.

Das Peptid, dessen Aminosäuresequenz durch Substitution, Addition oder Deletion von Aminosäurere-  
20 sten modifiziert ist, sollte im wesentlichen die gesamte Immunoreaktivität oder antivirale Aktivität der unmodifizierten Peptide beibehalten. Dies kann auf einfache Weise anhand verschiedener, hier beschriebener Assays bestimmt werden. Gewünschtenfalls kann man das d-Isomer einer oder mehrerer Aminosäuren verwenden, um die biologischen Eigenschaften, wie die Aktivität, Abbaurate und dergleichen, zu modifizieren.

Darüber hinaus kann man eine, zwei oder mehrere Aminosäuren zur leichteren Verbindung der Peptide aneinander an die Termini eines Oligopeptids oder Peptids anfügen und zwar zur Kopplung an einen Träger  
25 oder ein größeres Peptid, aus den nachfolgend erläuterten Gründen, zur Modifizierung der physikalischen oder chemischen Eigenschaften des Peptids oder Oligopeptids oder dergleichen.

Aminosäuren, wie Tyrosin, Cystein, Lysin, Glutaminsäure oder Asparaginsäure oder dergleichen, kann man an C- oder N-Terminus des Peptids oder Oligopeptids einführen, um eine geeignete Funktionalität zur Verknüpfung zu schaffen. Cystein ist besonders bevorzugt zur Erleichterung einer kovalenten Bindung an  
30 andere Peptide oder zur Bildung von Polymeren durch Oxidation.

Darüber hinaus können sich die Peptid- oder Oligopeptidsequenzen von der natürlichen Sequenz durch eine Sequenz unterscheiden, die durch terminale NH<sub>2</sub>-Acylierung, beispielsweise Acetylierung oder Amidierung mit Thioglykolsäure, terminale Carboxyamidierung, beispielsweise mit Ammoniak oder Methylamin, modifiziert sind, um eine bessere Stabilität, erhöhte Hydrophobizität für eine Verbindung mit oder Bindung  
35 an einen Träger oder ein anderes Molekül oder für eine Polymerisation zu erzielen.

Eine bevorzugte Ausführungsform der oben beschriebenen Peptide I bis VIII und IX bis XV, wenn Y oder Y' vorhanden sind, liegt beispielsweise dann vor, wenn Y oder Y' einen oder mehrere Cysteinreste oder eine Kombination von einem oder mehreren Cysteinresten mit Spacer-Aminosäuren umfassen. Glycin ist ein besonders bevorzugter Spacer. Bevorzugte Peptide zur Anwendung bei der oxidativen Polymerisa-  
40 tion sind diejenigen, bei denen Y oder Y' wenigstens zwei Cysteinreste bedeuten. Wenn zwei Cysteinreste am gleichen Ende des Peptids vorhanden sind, liegt eine bevorzugte Ausführungsform dann vor, wenn die Cysteinreste durch 1 bis 3 Spacer-Aminosäurereste, vorzugsweise Glycin, getrennt sind. Die Anwesenheit von Cysteinresten kann die Bildung von Peptiddimeren ermöglichen und/oder die Hydrophobizität des erhaltenen Peptids erhöhen, was die Immobilisierung des Peptids an Festphasen- oder immobilisierten  
45 Assaysystemen erleichtert.

Von besonderem Interesse ist der Gebrauch der Mercaptangruppen der zur Acylierung der terminalen Aminogruppen verwendeten Cysteine oder Thioglykolsäuren oder dergleichen zur Verknüpfung von zwei Peptiden oder Oligopeptiden oder Kombinationen davon über eine Disulfidbrücke oder eine längere Brücke, um Polymere zu bilden, die eine Reihe von Epitopen enthalten. Derartige Polymere besitzen den Vorteil  
50 einer verstärkten immunologischen Reaktion. Wenn unterschiedliche Peptide zur Herstellung des Polymers verwendet werden, besitzen sie zusätzlich die Fähigkeit, Antikörper zu induzieren, die mit einigen Antigen-Determinanten verschiedener HIV-Isolate immuno-reagieren.

Für die Bildung antigener Polymere (synthetische Multimere) kann man Verbindungen mit bis-Haloacetylgruppen, Nitroarylhalogenide oder dergleichen einsetzen, wobei die Reagentien spezifisch für Thiogruppen sind. Die Verknüpfung zwischen zwei Mercaptogruppen von verschiedenen Peptiden oder Oligopeptiden kann somit eine Einfachbindung oder ein Bindeglied von wenigstens 2, üblicherweise wenigstens 4 und nicht mehr als etwa 16, üblicherweise nicht mehr als etwa 14 Kohlenstoffatome sein.

Die hier in Rede stehenden Peptide kann man gebunden an einen löslichen makromolekularen Träger (beispielsweise nicht weniger als 5 kDal) einsetzen. Zweckmäßigerweise ist der Träger eine natürlich vorkommende oder synthetische Poly(aminosäure) gegen die Antikörper im Humanserum unwahrscheinlich sind. Beispiele derartiger Träger sind Poly-L-Lysin, Keyhole-Limpet-Hemocyanin, Thyroglobulin, Albumine, wie Rinderserumalbumin, Tetanustoxoid etc.. Die Wahl des Trägers ist zur Hauptsache abhängig vom beabsichtigten Anwendungszweck für das Antigen und richtet sich nach der Zweckmäßigkeit und Verfügbarkeit des Trägers. Bei derartigen Konjugaten liegt wenigstens 1 Molekül wenigstens eines Peptids pro Makromolekül und nicht mehr als 1 pro 0,5 kDal, üblicherweise nicht mehr als etwa 1 pro 2 kDal des Makromoleküls, vor. Man kann 1 oder mehrere unterschiedliche Peptide an das gleiche Makromolekül binden.

Die Verbindung erfolgt in üblicher Weise unter Verwendung von Reagentien, wie p-Maleimidobenzoesäure, p-Methyldithiobenzoesäure Maleinsäureanhydrid, Bernsteinsäureanhydrid, Glutaraldehyd etc. Die Bindung kann am N-Terminus, C-Terminus oder zwischen den Enden des Moleküls erfolgen.

Das Peptid kann man durch Verknüpfung derivatisieren, kann während es an einem Träger gebunden ist, verknüpft werden oder dergleichen.

Um die Anwesenheit von Antikörpern gegen retrovirale Proteine oder von retroviralen Proteinen selbst nachzuweisen, kann man nach verschiedenen, dem Fachmann geläufigen Assay-Verfahren vorgehen. Von besonderem Interesse ist es, das Peptid als markiertes Reagens zu verwenden, wobei das Markierungsmittel ein nachweisbares Signal liefert, oder das Peptid direkt oder indirekt an eine Oberfläche zu binden, wobei der Antikörper gegen das Peptid in der Probe an das Peptid an der Oberfläche gebunden wird. Die Anwesenheit eines Human-Antikörpers, der an das Peptid gebunden ist, kann dann unter Verwendung eines xenogenen Antikörpers, der spezifisch für Humanimmunoglobulin, normalerweise sowohl Human-IgM als auch IgG, ist oder eines markierten Proteins erfolgen, das spezifisch für Immunkomplexe ist, beispielsweise der Rf-Faktor von *S. Aureus*-Protein-A.

Ein Beispiel für ein Assay-Verfahren ist die Verwendung eines Probenbehälters, beispielsweise die Vertiefungen von Mikrowellplatten, wobei das Polypeptid oder die Konjugate davon am Boden und/oder an den Wänden des Behälters kovalent oder nicht-kovalent adsorbiert sind. Die Probe, normalerweise Humanblut oder -serum, verdünnt mit einem geeigneten Puffermedium, gibt man in den Behälter und läßt ausreichend Zeit vergehen bis die Komplexbildung zwischen dem (den) Polypeptid(en) und einem entsprechenden Antikörper in der Probe erfolgt ist. Man entfernt den Überstand und wäscht den Behälter zur Entfernung von nicht-spezifisch gebundenen Proteinen. Zum Nachweis verwendet man ein markiertes spezifisch bindendes Protein, das spezifisch an den Komplex bindet, wie beispielsweise xenogenes Antiserum gegen Humanimmunoglobulin.

Das Peptid kann auf vielfältige Weise hergestellt werden. Das Peptid kann aufgrund seiner relativ geringen Länge in Lösung oder an einem festen Träger gemäß herkömmlichen Verfahren synthetisiert werden. Verschiedene automatische Synthetisiergeräte sind im Handel erhältlich und können in bekannter Weise angewendet werden, siehe beispielsweise Stewart und Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2. Aufl., Pierce Chemical Co., 1984; und Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1983) 105:6442.

In alternativer Weise kann man von der Hybrid-DNA-Technologie Gebrauch machen, bei der man ein synthetisches Gen unter Anwendung von Einzelsträngen, welche für das Polypeptid kodieren, oder von im wesentlichen Komplementärsträngen davon herstellt, wobei die Einzelstränge überlappen und in einem annealing - Medium zusammengebracht werden können, um zu hybridisieren. Die hybridisierten Stränge kann man dann zu einem vollständigen Gen ligieren und das Gen durch Wahl geeigneter Termini in heute leicht erhältlichen Expressionsvektoren insertieren, siehe beispielsweise Maniatis et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. CSH, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. Oder man kann den Bereich des viralen Genoms, der für das Peptid kodiert durch herkömmliche rekombinante DNA-Techniken klonieren und exprimieren (siehe oben Maniatis et al.).

DNA-Codesequenzen von LAV<sub>BRU</sub> und ARV 2-Isolaten von HIV, die zur Expression der Peptide verwendet werden können, umfassen die folgenden:

50

55

**LAV<sub>BRU</sub>**      **TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT**  
                   **ATC CGT ATC CAG AGG GGA CCA GGG AGA GCA TTT**  
 5                   **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**  
 10                   **ATC TAT ATA GGA CCA GGG AGA GLA TTT CAT ACA**  
                   **ACA GGA AGA ATA ATA GGA GAT ATA AGA AAA GCA**  
                   **CAT TGT**

15 Zur Expression von Peptidfragmenten kann man Fragmente einer Sequenz verwenden. Man kann konservative Basenänderungen, wobei der (die) modifizierte Kodon(s) für die gleiche Aminosäure(n) kodiert (kodieren), oder nicht konservative Basenänderungen in der Kodierungssequenz durchführen, wobei die erhaltene Aminosäure eine konservative oder nicht-konservative Änderung in der Aminosäuresequenz sein kann, was oben beschrieben wurde.

20 Die Codesequenz kann am 5'- oder 3'-Terminus oder an beiden verlängert werden, um das Peptid zu verlängern, jedoch unter Beibehaltung der epitopen Stelle(n). Die Verlängerung kann dazu dienen, einen Arm zur Anknüpfung beispielsweise an ein Markierungsprodukt, wie ein Enzym, zu schaffen, zwei oder alle Peptide zusammen in der gleichen Kette zu verbinden, Antigen-Aktivität und geeignete Restriktionsstellen zum Klonen zur Verfügung zu stellen oder dergleichen.

25 Die DNA-Sequenz selbst, die Fragmente davon oder größere Sequenzen, üblicherweise wenigstens 15 Basen, vorzugsweise wenigstens 18 Basen, kann man als Nukleotidsonden zum Nachweis von retroviraler RNA oder proviraler DNA oder zur Identifizierung homologer Regionen für das Klonieren oder Sequenzieren verwenden. Es sind zahlreiche Methoden beschrieben, wie die Grunstein-Hogness-Methode, Southern-Methode, Northern-Methode, Dot-blot, Verbesserungen davon sowie andere Methoden, wie diejenigen, die in der US-PS 4 358 535, worauf hiermit Bezug genommen wird, beschrieben sind.

30 Die neuen Peptide, einschließlich der blockierenden Peptide und ihre Analoga finden allein oder in Kombination in Vakzinen Anwendung. In ähnlicher Weise kann man in Vakzinen auch anti-idiotypen Antikörper verwenden, d.h. Antikörper, die mit dem Idiotypen der erfindungsgemäßen Antikörper reagieren und dabei Epitope enthalten, die die neutralisierenden HIV-Bereiche nachahmen. Die Peptide oder anti-idiotypen Antikörper kann man in herkömmlicher Weise formulieren, im allgemeinen in Konzentrationen im Bereich von 1 µg bis 20 mg/kg des Wirts. Physiologisch annehmbare Medien kann man als Träger verwenden, beispielsweise steriles Wasser, Kochsalzlösung, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung und dergleichen. Man kann Adjuvantien einsetzen, wie Aluminiumhydroxidgel, grenzflächenaktive Substanzen, wie Lysolecithin, Pluronicpolyole, Polyanionen, Peptide, Proteine (z.B. Diphtherie und Cholera-toxin) und Ölemulsionen. Die Peptide kann man zur Anwendung in Vakzinformulierungen auch Liposomen einverleiben oder an Polysaccharide, Polypeptide oder Polymere konjugieren. Die Verabreichung kann durch Injektion erfolgen, beispielsweise intramuskulär, peritoneal, subkutan, intravenös etc. Die Verabreichung einer immunogen wirksamen Dosis kann einmal oder mehrfach erfolgen, üblicherweise in Zeitabständen von 1 bis 4 Wochen. Eine "immunogen wirksame Dosis" ist diejenige Menge eines Vakzins, die geeignet ist, eine Immunantwort in einem Wirt auszulösen, wobei der Wirt eine gesteigerte Infektion zeigt.

45 Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne sie zu begrenzen.

Beispiel I

50 Erzeugung und Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Beispiel I beschreibt die Erzeugung von Hybridzelllinien, die monoklonale Antikörper produzieren, welche spezifisch für HIV-Hüllglykoproteine sind. Dieses Verfahren umfaßt die Anwendung von Lektin-gereinigten Extrakten von LAV<sub>BRU</sub>, das an lentile Lektinagarose als Immunogen gebunden ist. Die anschließend durch die Hybridzelllinien erzeugten monoklonalen Antikörper sind charakterisiert durch ihre Fähigkeit gp110 aus gereinigtem LAV zu immunoblotten und in einem Radioimmun-Assay zu präzipitieren sowie als biologisch exprimiertes rekombinantes Fusionsprotein. Die monoklonalen Antikörper, die an die Epitope an

gp110 binden, reagieren auch in ELISA's mit zerstörten ganzen Viren, Fusionsproteinen und synthetischen Peptiden und reagieren mit ganzen Viren in indirekten Fluoreszenz-Assays.

Die Erzeugung der monoklonale Antikörper produzierenden Hybridzelllinien und die Charakterisierung der Antikörper erfolgen folgendermaßen:

5 LAV-Viren, die von infizierten CEM-Zellen (ATCC Nr. CRL 8904) gereinigt waren, wurden in 50 mM Tris, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 1,0 % Aprotinin, 2,0 % Nonidet P-40<sup>(R)</sup> (NP-40) (Octylphenoxypolyethoxyethanol) zerstört. Der Extrakt wurde 2 x durch Zentrifugieren geklärt und auf 0,5 % NP-40 durch Zugabe von 3 Volumina Disruptionspuffer ohne NP-40 eingestellt. Lentile Lektinsepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.) wurde in Disruptionspuffer ohne NP-40 vorgewaschen und anschließend in Adsorptionspuffer (50 mM Tris, pH 7,4,  
10 0,15 M NaCl., 1,0 % Aprotinin, 0,5 % NP-40) äquibriert. Der geklärte Virusextrakt wurde mit lentiler Lektinsepharose 42 h bei 4 °C adsorbiert. Unadsorbiertes Material wurde durch Waschen mit überschüssigem Adsorptionspuffer entfernt. Die Eluierung des adsorbierten Materials erfolgte mit 0,2 M  $\alpha$ -Methylmannosid in Adsorptionspuffer. Das Eluat wurde gegen PBS zur Entfernung des Zuckers dialysiert und das Material wurde erneut an lentiler Lektinsepharose adsorbiert.

15 Der Glykoprotein-lentile Lektinsepharose-Komplex wurde dazu verwendet, BALB/c-Mäuse mittels drei intraperitonealen Injektionen ohne Adjuvans, die in Abständen von 2 bis 3 Wochen gegeben wurden, zu immunisieren. Die Milz der immunisierten Mäuse wurde entfernt. Es zeigen sich mittels Immunoblot-RIP und/oder ELISA zirkulierende Antikörper gegen Glykoproteine.

Zur Erzeugung von Zelllinien arbeitete man im allgemeinen nach den Vorschriften von Kohler und  
20 Milstein (Nature 256:495 (1985)) mit den Modifizierungen von L.C. Goldstein et al., (Infect. Immun. 38:273 (1982)). Die B-Lymphocyten der Milz aus den immunisierten Mäusen wurden mit NS-I-Myelomzellen unter Verwendung von 40 % (W/V) Polyethylenglykol fusioniert. Im Anschluß an die Fusionierung wurde die Zellmischung erneut in HAT-Medium (RPMI-1640 ergänzt mit 15 % fötalem Kälberserum,  $1 \times 10^{-4}$  M Hypoxanthin,  $4 \times 10^{-7}$  M Aminopterin und  $1,6 \times 10^{-5}$  M Thymidin) suspendiert, um für das Wachstum der  
25 Hybridzellen zu selektieren und anschließend auf 96-Well-Mikrokulturplatten bei einer Konzentration von 1 bis  $3 \times 10^6$  Zellen/ml gegeben und bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre, die 6 % CO<sub>2</sub> enthält, inkubiert. Die Kulturen wurden ernährt, indem die Hälfte des Überstandes durch frisches HAT-Medium ersetzt wurde. Die Vertiefungen (wells) wurden unter Verwendung eines Planktonmikroskops auf Anzeichen von Zellproliferation beobachtet und sobald die Zellen eine ausreichende Dichte besaßen, wurden die  
30 Überstände auf Anti-LAV-Antikörper getestet.

Diejenigen Wells, die Antikörper gegen LAV produzierende Hybridzellen enthalten, wurden durch ELISA's identifiziert, wobei die Bindung an gereinigte, zerstörte Ganzviren, oder biologisch exprimierte Fusionsproteine bestimmt wurde. Die ELISA-Assays unter Anwendung zerstörter Viren wurden an LAV EIA-Platten (Genetic Systems, Seattle, Washington) durchgeführt. Die Platten wurden mit Zellkulturflüssigkeit  
35 bei 37 °C 45 Min. inkubiert und anschließend 3 x mit 0,05 % Tween 20 in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-Tween) gewaschen.

Peroxidase-Ziege-Anti-Maus-IgG (1:2.000 Verdünnung in PBS-Tween; Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, California) wurde zugegeben (100  $\mu$ l pro Well) und die Platten wurden 45 Min. bei 37 °C inkubiert und wie oben gewaschen. Es wurde Substrat Zugegeben (0,025 M Zitronensäure, 0,05 M  
40 dibasisches Natriumphosphat, pH 5, enthaltend 14 mg o-Phenylendiamin und 10  $\mu$ l 30%-iges Wasserstoffperoxid pro 50 ml) und die Platten wurden 30 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 3 N schwefelsäure gestoppt und die kolorimetrischen Reaktionen wurden mit einem automatischen Mikroplattenlesegerät quantitativ bestimmt. Diejenigen Vertiefungen, die positive Ergebnisse erbrachten, wurden durch Grenzverdünnung subkloniert, erneut auf Spezifität getestet und anschließend expandiert.

45 Die von den daraus resultierenden Hybridzelllinien sekretierten monoklonalen Antikörper wurden weiterhin hinsichtlich Spezifität und Reaktivität mittels Immunoblotting, Immunopräzipitation und ELISA unter Anwendung zerstörter LAV-Viren, rekombinanter LAV-Fusionsproteine und synthetischer LAV-Peptide charakterisiert. Es zeigte sich, daß andere Antikörper vom IgG-Isotyp waren. Die Zelllinien HIV-gp110-1, HIV-gp110-2 und HIV-gp110-3 wurden bei der Amercian Type Culture Collection vor Einreichen dieser  
50 Anmeldung hinterlegt und haben die Hinterlegungs-Nrn. ATCC HB 9175, HB9176 und HB9177 erhalten.

Die auf ihre Reaktivität getesteten rekombinanten Fusionsproteine wurden als ENV2, ENV3, ENV4 und ENV5 bezeichnet. Das Protein ENV2 wird aus pENV2 (ATCC Nr. 53071) exprimiert und umfaßt den LAV-Bereich vom Basenpaar (bp) 6598 bis bp 7178 (Numerierung gemäß Wain-Hobson et al., Cell 44:9 (1985)). ENV3 wird aus pENV3 (ATCC Nr. 53072) exprimiert und umfaßt den LAV-Bereich von bp 7178 bis bp 7698.  
55 ENV4 wird aus pENV4 (ATCC Nr. 53073) exprimiert und umfaßt bp7698 bis bp 8572. ENV5 wird aus pENV5 (ATCC Nr. 53074) exprimiert und umfaßt den LAV-Bereich von bp 5889 bis bp 7698. Die Produktion der rekombinanten Fusionsproteine ist detailliert in der USSN 721 237 beschrieben, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Assembly synthetischer Peptide

Die Peptide I (29) und VIII (110-2-2) wurden an einem Benzhydrolaminharz (Polystyrol/Divinylbenzol (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California) zusammengebaut. Peptid V (177) wurde an einem t-Butyloxycarbonyl(Boc)-ethylbenzylcystein-phenylacetamidomethyl-(PAM)-polystyrol/divinylbenzolharz zu-

5 sammengebaut. Kopplungen mit symmetrischem Anhydrid wurden in einem Applied Biosystems 430A-Synthetisiergerät durchgeführt. Cystein wurde als erster Rest den beiden Peptiden zugegeben. Kopplungen mit Dicyclohexylcarbodiimid in Anwesenheit von Hydroxybenzotriazol wurden für Asparagin und Glutamin verwendet. Als Schutzgruppen kamen Seitenketten auf Benzylgruppenbasis und Boc- $\alpha$ -Aminogruppen zur Anwendung. Weitere routinemäßig eingesetzte Seitenkettenschutzgruppen waren Boc-

10 (Formyl)-tryptophan, Boc-Methioninsulfoxid, Boc(tosyl)-arginin, Boc(methylbenzyl)cystein, Boc(tosyl)-histidin, Boc(chlorbenzyloxycarbonyl)lysin und Boc(brombenzyloxycarbonyl)tyrosin. Die Radiomarkierung der Peptide erfolgte durch Acetylierung des Aminoterminus mit  $^3\text{H}$ -Essigsäure und einem Überschuß an Dicyclohexylcarbodiimid.

15 Entfernung der Schutzgruppen und Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte gemäß dem Tam "low-high" HF-Verfahren (Tam et al, siehe oben). Die Extraktion vom Harz wurde mit 5%-iger Essigsäure durchgeführt und der Extrakt wurde einer Gelfiltrations-Chromatographie in 5%-iger Essigsäure unterzogen.

Zu den synthetischen HIV-Peptiden, die auf Reaktivität mit den monoklonalen Antikörpern getestet wurden, zählten die Peptide 29, 36 und 39. Das Peptid 29 ist durch den LAV<sub>BRU</sub>-Genombereich von etwa bp 6688 bis bp 6750 kodiert; das Peptid 36 ist durch den Bereich von etwa bp 7246 bis bp 7317 kodiert; und das Peptid 39 ist durch den Bereich von etwa bp 7516 bis bp 7593 kodiert. Die Peptide 36 und 39 sind detailliert in der US-PS 4 629 783 beschrieben, auf die hiermit Bezug genommen wird.

Die blockierenden Peptide IX-XV wurden im wesentlichen wie oben beschrieben an einem Methylbenzhydrolaminharz (Polystyrol/Divinylbenzol) (Applied Biosystems, Inc. Foster City, California) zusammen-

25 gebaut. Kopplungen mit symmetrischem Anhydrid wurden an einem Applied Biosystems 430A-Synthetisiergerät durchgeführt. Für Asparagin wurden Kopplungen mit Dicyclohexylcarbodiimid in Anwesenheit von Hydroxybenzotriazol verwendet. Als Schutzgruppen wurden Seitenketten auf Benzylgruppenbasis und boc- $\alpha$ -Amin-Schutzgruppen verwendet, wohingegen Boc(brombenzyloxycarbonyl) spezifisch für Tyrosin-Seitenketten verwendet wurde. Eine Acetylierung erfolgte, soweit vorhanden, unter Anwendung von Acetanhydrid oder Eisessig und Dicyclohexylcarbodiimid. Die Entfernung der Schutzgruppen und die Abspaltung des

30 Peptids vom Harz erfolgte gemäß dem "high" HF-Standardverfahren (Stewart et al., siehe oben). Die Extraktion vom Harz erfolgte mit 50%-iger Essigsäure und der Extrakt wurde anschließend einer Gelfiltrations-Chromatographie in 20%-iger Essigsäure unterzogen. Gewünschtenfalls wurde eine Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie an einer Vydac-C18-Säule (Rainin Instrument Co., Emeryville, CA) unter Anwendung

35 eines 0,1% Trifluoressigsäure-Acetonitril-Gradienten durchgeführt.

Immunoblotting

Die Charakterisierung mittels Immunoblotting erfolgte an Clonüberständen oder Ascitesflüssigkeit unter

40 Anwendung gereinigter LAV-Viren und rekombinanter Fusionsproteine als Antigene. Die Antigene wurden zunächst mittels Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese (7,0 - 15,0 %) getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran (NCM) mittels 4-stündiger Elektrophorese bei 25 V in 25 mM Natriumphosphat (pH 7,0) transferiert. Nach der Übertragung wurde die NCM durch 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur in PBS-

45 Tween oder Blotto (5% fettarme Trockenmilch in PBS) blockiert, um nicht-spezifische Interaktionen zu verhindern. Die NCM wurde mit Zellkulturüberstand oder Ascitesflüssigkeit, verdünnt in PBS-Tween, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und 3 x mit PBS-Tween gespült. In der zweiten Stufe wurde die NCM mit Ziegenanti-Maus-IgG-Meerrettichperoxidase, verdünnt in PBS-Tween, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurde mit PBS-Tween gewaschen, gefolgt von 20-minütigem Eintauchen in Meerrettichperoxidase-Farbentwicklungslösung (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California). Die Reaktion

50 wurde durch Eintauchen in entsalztes Wasser gestoppt. Die monoklonale Antikörper-Aktivität wurde mit einem positiven Kontrollserum, das mit gereinigten zerstörten Viren oder exprimierten Fusionsproteinen reagiert, verglichen. Es zeigte sich, daß unter Anwendung zerstörter Viruspräparate alle Antikörper an gp110 oder dessen Prekursormolekül gp150 banden. Die Antikörper 110-1 und 110-2 erkannten auch das Fusionsprotein ENV3, wohingegen die Antikörper 110-3, 110-4, 110-5 und 110-6 ENV2 in einen Immuno-

55 komplex überführen.

Immunpräzipitation

Virusextrakte für die Radioimmun-Präzipitation wurden aus CEM-Zellen hergestellt, die mit LAV<sub>BRU</sub>-HIV-Isolat infiziert waren, das durch kontinuierliche Passage dem lytischen Wachstum angepaßt wurde. Sobald sich frühe cytopathische Effekte zeigten, wurden die Zellen auf markierende Medien übertragen, die <sup>35</sup>S-Methionin (0,05 mCi/ml) oder <sup>3</sup>[H]-Glucosamin (0,025 mCi/ml) enthielten, anschließend 24 h inkubiert, bis die meisten Zellen lysiert hatten und das Virus in den Kulturüberstand freisetzten. Die Viren wurden aus dem zellfreien Überstand pelletiert (1 h bei 100.000 xg) und Detergenzextrakte wurden in P-RIPA-Puffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, die 1,0 % Triton X-100, 1,0 % Deoxycholat, 0,1 % SDS und 1 % Aprotinin enthält) hergestellt. Ähnliche Extrakte wurden von den Überständen von uninfizierten CEM-Zellen hergestellt.

Immunopräzipitations-Assays wurden mit 100 µl Virusextrakt durchgeführt, der 1 h auf Eis mit 100 µl Kulturüberstand von den Hybridzelllinien inkubiert wurde. 4 µl Kaninchen-Anti-Maus-Ig (Zymed Laboratories, So. San Fransisco, California) wurden zu jeder Probe gegeben und 30 Min. inkubiert. Zu jeder Probe wurde Immuno-Präzipitin (100 µl; Bethesda Research Laboratory, Bethesda, Maryland), das in P-RIPA-Puffer resuspendiert wurde, welcher 1 % Ovalbumin enthält, gegeben und weitere 30 Min. inkubiert. Die gebundenen Komplexe wurden gewaschen und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (15,0 % Acrylamid: DATD-Gel) aufgetrennt. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Gele fixiert, in Enhance (New England Nuclear; Boston, MA) eingeweicht, getrocknet und mit einem Kodak XR-5-Film in Kontakt gebracht. Ein positives Referenzserum, das mit allen HIV-Virusproteinen ein Immunopräzipitat ergibt, wurde als positive und negative Kontrolle mit Virus-infizierten und schein-infizierten CEM-Zellüberständen zur Reaktion gebracht.

Die Ergebnisse zeigen, daß alle sechs monoklonalen Antikörper spezifisch gp110 und gp150 immuno-präzipitierten.

Enzym-Linked-Immunoabsorbant-Assay

Um die von den genannten monoklonalen Antikörpern erkannten gp110-Epitope zu kartieren, wurden die Kulturüberstände aus Hybridzelllinien oder Ascitesflüssigkeit weiter durch die Reaktivität in ELISA-Assays mit biologisch exprimierten Fusionsproteinen und synthetischen Peptiden charakterisiert. Die Verfahren waren die gleichen wie die oben beschriebenen, mit der Ausnahme, daß die Fusionsproteine oder synthetischen Peptide die gereinigten Viren als Antigene ersetzen, welche an die Oberfläche der Mikrotiterwells adsorbiert sind.

Bei der Verwendung von Peptiden als Antigen arbeitete man nach folgendem Verfahren. Die lyophilisierten Peptide wurden in 6 M Guanidin-HCl gelöst. Unmittelbar vor Plattieren in die 96-Well-Platten wurde die Guanidinlösung in 0,05 M Carbonat/Bicarbonat-Puffer (pH 9,6) auf eine Peptidkonzentration von bis zu 100 µg/ml verdünnt. 50 µl des verdünnten Peptids wurden in jede Mikrotiter-Vertiefung gegeben. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Überschüssige Peptidlösung wurde "ausgeschüttelt", die Platten wurden mit Blotto blockiert und der weitere ELISA-Assay erfolgte gemäß dem oben beschriebenen Verfahren. In ähnlicher Weise wurde rekombinantes Protein auf eine Endkonzentration von etwa 2 µg/ml in 0,05 M Carbonat/Bicarbonat-Puffer (pH 9,6) verdünnt und das gleiche Verfahren wiederholt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle II gezeigt. Die von den Zelllinien HIV-gp110-1 und HIV-gp110-2 produzierten monoklonalen Antikörper reagierten mit ENV3, ENV5, Peptid 36 und zerstörten Viren. Die Antikörper von den Zelllinien HIV-gp110-3, HIV-gp110-4, HIV-gp110-5 und HIV-gp110-6 reagierten mit ENV2 und Peptid 29 sowie mit zerstörten Viren.

50

55

TABELLE II

ELISA-Assays, die die Reaktivität der monoklonalen Antikörper mit rekombinanten Proteinen und synthetischen Peptiden zeigen

10

	Rekombinantes Fusionsprotein				Synthetische Peptide			LAV	CEM
	<u>ENV2</u>	<u>ENV3</u>	<u>ENV4</u>	<u>ENV5</u>	<u>29</u>	<u>36</u>	<u>39</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>Kontrolle</u>
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

25

Die in Tabelle II zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß die monoklonalen Antikörper 110-1 und 110-2 eine Antigen-Determinante erkennen, die durch die DNA-Sequenz im pENV3-Bereich codiert ist, insbesondere durch den Bereich des HIV-Genoms, der durch eine Sequenz von Aminosäuren im Peptid 36 definiert ist. D.h., daß die monoklonalen Antikörper gp110-1 und 110-2 an einen Peptidbereich von gp110 binden, der in bp 7246 bis 7317 codiert ist, wie durch die Bildung von Immunkomplexen mit Peptid 36 und ENV3 gezeigt wird. Dieser Bereich des HIV-Genoms wurde als konserviert identifiziert, d.h. mit nur geringen Veränderungen in der DNA-Sequenz in dem Bereich, der durch Peptid 36 bei verschiedenen Virusisolaten unterschiedlicher geographischer Herkunft codiert ist, siehe Starcich et al., Cell 46:637 (1986). Im Gegensatz dazu binden die monoklonalen Antikörper gp110-3, -4, -5 und -6 an HIV-Peptide, die durch den Bereich definiert sind, der durch Peptid 29 von bp6688 bis etwa bp 6750 codiert ist. Der Bereich in gp110, der durch Peptid 29 definiert ist, wurde als Bereich identifiziert, der mehrere Nukleotidsubstitutionen bei verschiedenen Virusisolaten enthält. Die monoklonalen Antikörper, die selektiv gp110-Polypeptide binden, welche konservierte Epitope enthalten, wie die Antikörper 110-1 und 110-2, können häufig besonders brauchbar sein, beispielsweise bei der Affinitäts-Chromatographie etc. Auch bei einem ELISA-Assay reagiert das Peptid 110-2 mit Sera von der Person, von der LAV-2 isoliert wurde.

30

35

40

Indirekter Immunfluoreszenz-Assay

Indirekte Immunfluoreszenz-Assays unter Anwendung monoklonaler Antikörper gegen das gp110-Antigen von HIV wurden an Aceton-fixierten und lebenden Zellen durchgeführt. Aceton-fixierte Objektträger, die aus LAV-infizierten CEM-Zellen bereitet wurden, wurden mit verdünntem Kulturüberstand oder Ascitesflüssigkeit 1 h bei 37°C inkubiert, wohingegen lebende Zellen mit Kulturüberstand oder Ascitesflüssigkeit 1 h bei 4°C inkubiert wurden, ehe die Zellen auf die Objektträger gegeben und mit Aceton fixiert wurden. Bei beiden Methoden wurde Fluorescein-Isothiocyanatmarkiertes-Anti-Maus-IgG verwendet, um diejenigen Zellen nachzuweisen, die das reaktive gp110-Antigen aufweisen. Die monoklonalen Antikörper HIV-gp110-1 ergaben positive Ergebnisse sowohl bei Anwendung lebender oder aceton-fixierter LAV-infizierter Zellen.

45

50

55

Beispiel IINeutralisierung der HIV-Infektivität durch Anti-gp110-monoklonale Antikörper

5 Dieses Beispiel beschreibt und charakterisiert die Neutralisierung von HIV-Infektivität unter Anwendung monoklonaler Antikörper, die an gp110 und Peptide innerhalb von gp110 binden. Die Ergebnisse zeigen, daß die Antikörper gp110-3, -4, -5 und -6 neutralisierende Aktivität besitzen und daß gp110-3 und -4 besonders hohe neutralisierende Aktivität besitzen.

10 Neutralisations-Assay

Ein sensitiver Neutralisations-Assay wurde entwickelt, um den Effekt der monoklonalen Antikörper auf die HIV-Infektivität quantitativ zu erfassen. Eine CD4<sup>+</sup>-Zelllinie, CEM, die besonders empfindlich gegen HIV-Infektionen ist, wurde als Target-Zelle für Infektivitätsvergleiche gewählt. Ascitesflüssigkeit, hergestellt wie im Beispiel I beschrieben, oder die IgG-Fraktion davon, die unter Anwendung einer Ammoniumsulfatfällung gereinigt wurde, wurde 30 Min. bei 56 °C inaktiviert, anschließend in dem erforderlichen Maße in RPMI-Medium, das 10 % fötales Kälberserum enthält, verdünnt. Eine Suspension des HIV-Stammes LAV<sub>BRU</sub> wurde von etwa 4 Tage alten CEM-Kulturen in der log-Wachstumsphase geerntet, durch einen 0,2 oder 0,45 Mikronfilter filtriert, in aliquote Teile aufgeteilt und bei -70 °C eingefroren. Ein aliquoter Teil wurde 20 aufgetaut, zur Bestimmung von TCID<sub>50</sub> titriert und anschließend wurden Assays mit frisch aufgetauten aliquoten Teilen durchgeführt, die im Verhältnis von 1:500 in Kulturmedium auf etwa die 10-fache Konzentration verdünnt wurden, die erforderlich ist, um 50 % der CEM-Zellen in der Kultur (10 TCID<sub>50</sub>) zu infizieren. Die Virussuspension wurde mit dem gleichen Volumen (250 µl) eines monoklonalen Antikörperpräparates in 5-fach Verdünnungen von 1:5 bis 1:9 765 625 vermischt. Die Virus/Antikörpermischung wurde 25 45 Min. bei 37 °C inkubiert und anschließend von 1:5 bis 1:9 765 625 dupliziert. Die Virus/Antikörpermischung wurde dann 45 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden duplizierte Proben von 200 µl dazu verwendet, Wells zu inokulieren, die 1 ml mit etwa 2 x 10<sup>5</sup>-CEM-Zellen pro Well enthielten. Die Kulturen wurden bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> 14 Tage inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, pelletisiert und mit 1 % Triton-X-100 in PBS etwa 10 Min. lysiert. Die Menge an Viren (oder Virusantigen), die in den lysierten Zellen vorhanden war, wurde unter Anwendung eines sensitiven HIV-Antigen-Capture-"Sandwich"-Enzymimmunoassays wie unten beschrieben quantitativ bestimmt. Der Titer an neutralisierender Aktivität, soweit vorhanden, wurde als reziproker Wert derjenigen Verdünnung der monoklonalen Antikörper bestimmt, welche um mehr als 50% die Antigenproduktion der Viruskontrollkulturen inhibiert, welche ohne Antikörper oder mit einem monoklonalen Antikörper des gleichen Isotyps inkubiert wurden, von dem vorher gezeigt wurde, daß er keine neutralisierende Aktivität besitzt.

Bei dem oben erwähnten HIV-Antigen-Capture-Assay wurden als Capture-Reagens zwei monoklonale Antikörper gegen p25-Antigene verwendet. Diese Hybridomzelllinien wurden anhand der oben beschriebenen Methoden mit geringfügigen Modifikationen erzeugt, einschließlich der Anwendung eines gereinigten gag-rekombinanten Fusionsprotein als Immunogen und der Charakterisierung der erhaltenen monoklonalen 40 Antikörper hinsichtlich Spezifität und Reaktivität unter Anwendung der als GAG-1, GAG-2 und GAG-3 bezeichneten rekombinanten Fusionsproteine und des synthetischen Peptids 141. Das Protein GAG-1 wird aus PGAG-1 (ATCC Nr. 53379) exprimiert, GAG-2 wird aus pGAG-2 (ATCC Nr. 53111) exprimiert und GAG-3 wird aus pGAG-3 (ATCC Nr. 53112) exprimiert. Die Produktion der rekombinanten Fusionsproteine ist detailliert in den USSN 764 460 und 828 828 beschrieben, auf die hiermit Bezug genommen wird. Das synthetische Peptid 141 wird durch den LAV<sub>BRU</sub>-Genombereich kodiert, der den Aminosäureresten 198 bis 242 entspricht. Die monoklonalen Antikörper, die durch die Hybridomzelllinien p25-2 und p25-3 produziert werden, reagieren mit den rekombinanten Fusionsproteinen GAG-1, GAG-2 und GAG-3. Auch die aus p25-3 gewonnenen monoklonalen Antikörper reagieren mit dem synthetischen Peptid 141.

Um den Antigen-Capture-Assay durchzuführen, wurden die Capture-Reagentien zuerst an einem festen 50 Träger adsorbiert. Ascitesflüssigkeit, die von den Hybridomzelllinien p25-2 und p25-3 stammte, wurde 1:5000 in 25 mM Tris-Puffer von pH 8,5 verdünnt. 200 µl wurden in die Vertiefungen von Mikrowellplatten gegeben. Die Vertiefungen wurden versiegelt und etwa 16 h bei 4 °C inkubiert. Die Lösung wurde von den Platten abgesaugt, ehe eine blockierende Lösung von 0,3 % Blotto in PBS zugegeben wurde. Das Blockieren erfolgte 15 Min. bei Raumtemperatur. Die blockierende Lösung wurde abgesaugt und die Probe wurde zugegeben. 200 µl der lysierten Zellsuspension und 5 µl Detektionskonjugat, hergestellt wie unten 55 beschrieben, wurden zu jeder Vertiefung gegeben. Die Wellstreifen oder -platten wurden 2 h bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde die Suspension abgesaugt und die Wells wurden 4 x mit Puffer gewaschen (0,05 % Tween 20 in PBS). Das Detektionskonjugat wurde folgendermaßen hergestellt. Die monoklonalen

Antikörper p25-6 und p26-7 wurden an Meerrettichperoxidase (HRP) in einem Molverhältnis von 3:1 (Ab:HRP) 3 h unter Anwendung des Periodatoxidationsverfahrens (Nakane et al., J. Histochem. Cytochem. 22:1084 (1974)) konjugiert. Die Konjugate wurden 1:1500 in 2,5 % (G/V) fettarmer Trockenmilch, 0,01 Thimerosal und 0,005 % Antifoam A in 20 mM Natriumzitat verdünnt. Der verbleibende Teil des ELISA-Assays wurde wie im Beispiel I beschrieben, durchgeführt.

Die Bestimmung der neutralisierenden Aktivität mit den Antikörpern gp110-3, -4, -5 und -6 erbrachte folgende Ergebnisse. Die höchsten Titer mit beibehaltener neutralisierender Aktivität waren: gp110-3 = 15 625; gp110-4 = 9 765 625; gp110-5 = 125; und gp110-6 = 625.

Aufgrund der vorausgesagten genetischen Variabilität des durch das Peptid 29 definierten Bereichs wurde die Fähigkeit des monoklonalen Antikörpers gp110-4, andere HIV-Isolate zu erkennen, untersucht. Die Immunofluoreszenz-Assays wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Der Antikörper gp110-4 konnte Antigen in Kulturen von wenigstens drei von 16 HIV-Isolaten detektieren.

Der Antikörper gp110-4 war in der Lage, Viren zu neutralisieren, die über einen Zeitraum von 15 Wochen von einem Schimpansen isoliert wurden, der bei einem AIDS-Impfversuch als Kontrolltier mit LAV<sub>BRU</sub> inokuliert wurde. Der monoklonale Antikörper war in der Lage, die Isolate zu neutralisieren, obwohl das Tier Serumantikörper aufwies, die HIV in vitro neutralisierten und obwohl das Tier eine messbare, zellvermittelte Immunantwort gegen HIV-Infektion ausgebildet hatte. Dies zeigt das Fehlen eines Antigen-Drifts in vivo für das Epitop, das durch den gp110-4 Antikörper erkannt wird.

### 20 Beispiel III

#### Neutralisierung der HIV-Infektivität durch einen Cocktail von Anti-gp110 und Anti-p25 monoklonalen Antikörpern

Dieses Beispiels beschreibt die Neutralisierung der HIV-Infektivität unter Anwendung von monoklonalen Antikörpern, die an gp110 und Peptide innerhalb von gp110 binden, in Kombination mit monoklonalen Antikörpern, welche an p25 und an Peptide innerhalb von p25 binden und welche alleine eine nur geringe oder keine neutralisierende Aktivität aufweisen. Die Ergebnisse zeigen, daß der monoklonale Antikörper gp110-2 in Kombination mit p25-6 oder p25-7 eine besonders große neutralisierende Aktivität aufweist.

Die Hybridomzelllinien p25-6 und p25-7 wurden nach den oben beschriebenen Methoden unter Anwendung der Modifikationen erzeugt, zu denen die Verwendung inaktivierter zerstörter Viren oder gereinigter gag rekombinanter Fusionsproteine, die in E. Coli als Immunogen exprimiert wurden, und die Charakterisierung der monoklonalen Antikörper bezüglich der Spezifität und der Reaktivität zählen, wobei die GAG-1, GAG-2 und GAG-3 bezeichneten rekombinanten Fusionsproteine und die synthetischen Peptide 15, 88, 150, 147 und 148 zur Anwendung kamen. Die synthetischen Peptide sind vom LAV<sub>BRU</sub>-Genombereich kodiert, der den folgenden Aminosäureresten entspricht: Peptid 15, Aminosäurereste 329 bis 350; Peptid 88, Aminosäurereste 315 bis 350; Peptid 150, Aminosäurereste 318 bis 363; Peptid 147, Aminosäurereste 278 bis 319; und Peptid 148, Aminosäurereste 290 bis 319. Die von den Hybridomzelllinien p25-6 und p25-7 produzierten monoklonalen Antikörper reagieren mit dem rekombinanten Fusionsprotein GAG-3; p25-6 reagiert mit den synthetischen Peptiden 147 und 148; und p25-7 mit den synthetischen Peptiden 15, 88 und 150.

Die Neutralisations-Assays wurden wie oben beschrieben durchgeführt, außer daß bei Anwendung von Cocktails die einzelnen monoklonalen Antikörper zuerst 1:5 in Kulturmedium verdünnt und anschließend in gleichen Verhältnissen vermischt wurden, um eine Endverdünnung von 1:10 zu ergeben. Der verbleibende Teil des Assays wurde wie oben durchgeführt.

Die monoklonalen Antikörper gp110-2 p25-6 und p26-7 zeigen weniger als 50 % neutralisierende Aktivität, wenn sie alleine verwendet werden. Bei Verwendung eines Cocktails, der die monoklonalen Antikörper gp110-2 zusammen mit p25-6 oder gp110-2 mit p25-7 in einer Verdünnung von 1:10 umfaßt, erfolgt vollständige Neutralisierung. Ein Cocktail, der die monoklonalen Antikörper p25-6 in Kombination mit p25-7 enthält, ergab eine neutralisierende Aktivität im Bereich von 60 bis 90 %.

### Beispiel IV

#### Immunwirksamkeit des Peptids 29 und der Homologen davon

Die Fähigkeit des Peptids 29 und der homologen Peptide, einschließlich dem Peptid 177, eine Immunantwort gegen HIV zu stimulieren, wurde an zwei Mäusestämmen untersucht. Die Herstellung der Peptidimmunogene, die Immunisierungsverfahren und die Charakterisierung der ausgelösten Immunantwort

ten werden nachfolgend beschrieben.

Das Peptid 29 wird zur Immunisierung durch Konjugation an ein gereinigtes Thyroglobulin hergestellt. Thyroglobulin kann zur Konjugation mit N-Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) gemäß den in der US-PS 4 629 783, Spalte 10, Zeilen 28-51 beschriebenen Verfahren derivatisiert werden. Als zweites Immunogen wird Thyroglobulin mit Glutaraldehyd folgendermaßen derivatisiert. 27 mg schweine thyroglobulin werden in 1 ml 0,1 M Natriumbicarbonat gelöst. Dazu trocknet man 8,3 µl einer 25%-igen Glutaraldehydlösung und rührt die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur. Man gibt 1 ml Natriumcarbonat/Bicarbonatpuffer von pH 9,3 zu der Lösung und dialysiert anschließend 8 h gegen 2 l des gleichen Puffers bei 4 °C, wobei ein vollständiger Austausch des Dialysats nach 4 h erfolgt. Das Peptid 29 gibt man dann zu dem derivatisierten Thyroglobulin in etwa 100-fachem molarem Überschuß und rührt die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur. Man blockiert unumgesetzten Glutaraldehyd mit 200 µl einer 0,2 M Lysinlösung und rührt die Mischung mehrere Stunden (oder über Nacht) bei Raumtemperatur. Das Peptid-Thyroglobulin-Konjugat wird dann extensiv gegen PBS bei 4 °C dialysiert.

Zwei Mäusestämme (C57 schwarz und BALB/c) inokuliert man mit den Peptiden, die durch das jeweilige Konjugationsverfahren hergestellt wurden. Alle Tiere waren im Zeitpunkt der Inokulation etwa 2 bis 4 Wochen alt. Die Inokulation kann in den Fußballen, durch Schwanzskarifikation, subkutan, intranasal oder intraperitoneal erfolgen. Das Inokulum besteht aus 25 µg des konjugierten Peptids, suspendiert in 0,5 ml kompletten Freund's-Adjuvans, wobei nach der 2., 3. und 5. Woche Booster-Inokulationen mit dem gleichen Immunogen, suspendiert in inkomplettem Freund's-Adjuvans, gegeben werden. Man sammelt Serumproben von den einzelnen Mäusen vor der Immunisierung, 4 Tage nach der Booster-Immunisierung nach der 3. Woche und 4 Tage nach der letzten Booster-Immunisierung nach 5 Wochen. Die Serumproben wurden auf Antikörper gegen homologe Peptide oder Ganzviren durch ein Screening in einem ELISA-Assay analysiert. Diejenigen Sera, die Antikörperaktivität gegen LAV zeigen, werden einem weiteren Screening auf neutralisierende Aktivität unterzogen. Im Anschluß daran erfolgt eine Analyse der Sera in Immunoblot-Assays gegen zerstörtes LAV-Antigen und in Radioimmunopräzipitations-Assays mit radio-markiertem gp110.

Die Ergebnisse der Immunisierungen zeigen, daß die mit Peptid 29 immunisierten Mäuse Antikörper entwickeln, die mit Peptid 29 und zerstörtem LAV-1-Viren in ELISA-Assays reagieren. Eine Konjugation des Peptid 29 durch Maleimid führt zur Bildung von Anti-Peptid-29-Antikörpern in einigen balb/c-Mäusen. Die Konjugation des Peptids 29 durch Glutaraldehyd ergibt im allgemeinen höhere Titer an Antikörpern gegen das Peptid 29 in balb/c-Mäusen. Mit Peptid 177 immunisierte Mäuse entwickeln Antikörper gegen das Peptid. Eine Konjugation des Peptids 177 durch Glutaraldehyd war bei der Auslösung einer Immunantwort besser. C57-Mäuse sprechen stärker auf die Immunstimulierung mit dem Peptid 177 an als balb/c-Mäuse. Mit dem LAV-2-Peptid 110-2-2 immunisierte Mäuse entwickeln Antikörper gegen 110-2-2 und LAV-2-Viren, wie mittels ELISA-Assays gezeigt werden konnte. Das durch Glutaraldehyd konjugierte Peptid 110-2-2 wirkt sowohl bei C57- als auch bei balb/c-Mäusen immunogen, wobei die Titer gegen das 110-2-2-Peptid bei balb/c-Mäusen im allgemeinen höher als bei C57-Mäusen sind, während die Titer gegen das LAV-2-Virus im allgemeinen bei C57-Mäusen höher sind als bei balb/c-Mäusen.

Diejenigen Serumproben von immunisierten Mäusen, die (i) Antikörper gegen Ganzviren zeigen; (ii) in der Lage sind, HIV zu neutralisieren, wie beispielsweise in den in Beispiel II beschriebenen Assays und (iii) mit Peptid 29 in ELISA-Assays reagieren, zeigen kumulativ die Wirksamkeit der Anwendung des Peptids 29 in einer Vakzinformulierung.

#### Beispiel V

##### 45 Immunoaffinitätstrennung von gp110 unter Anwendung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper gegen das gp110-HIV-Antigen kann man bei Immunoaffinitätstrennverfahren verwenden, um die bakteriell exprimierten rekombinanten Fusionsproteine zu reinigen. Wenn das exprimierte Protein von den Bakterien sekretiert wird, kann das Protein aus dem Kulturüberstand isoliert werden. Wenn das Protein nicht sekretiert wird, kann eine Zerstörung der Bakterienzellen erforderlich werden.

Die Konstruktion des Plasmids pENV-5 (ATCC Nr. 53074) ist in der US-PS 4 784 941 beschrieben. Das Plasmid pENV-5 codiert für den Hauptteil des Carboxylendes von gp110 und einen Teil des Aminoterminus von gp41 von LAV, das in den trp Expressionsvektor inseriert ist. Durch diesen Vektor transformierte E. Coli C600 exprimieren das gp110 Fusionsprotein, sekretieren es aber nicht.

E. Coli C600, die das Plasmid pENV-5 enthalten, läßt man über Nacht bei 37 °C unter Belüftung in einem Medium wachsen, das Tryptophan (20 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) enthält. Die Übernachtskulturen inokuliert man dann zu 1:100 in frisches Minimalmedium, das Ampicillin (100 µg/ml), nicht aber Tryptophan enthält. Diese Kulturen läßt man unter Belüftung bei 37 °C 2 bis 3 h wachsen (bis zur frühen

log-Phase). Der Induktor, 3-B-Indol-acrylsäure (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) wird aus einer frisch bereiteten Vorratslösung von 20 mg/ml in 95%-igem Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugegeben. Die induzierten Kulturen läßt man bei 37 °C unter Belüftung 4 bis 5 h wachsen, pelletisiert anschließend und friert gegebenenfalls ein. Die Proteinausbeuten von pENV-5 betragen typischerweise

5 weniger als 1 mg/l.

Die pelletisierten Bakterienzellen werden unter Verwendung von P-RIPA-Puffer (PBS, enthaltend 1 % Triton X-100, 1 % Deoxycholat, 0,1 % Natriumdodecylsulfat und 1 % Aprotinin) lysiert, der E. Coli-Zellen lysiert. Die Suspension wird zum Shearing von DNA und RNA einer Ultraschallbehandlung unterzogen und anschließend zur Entfernung von Teilchen zentrifugiert. Eine Verdünnung oder Konzentrierung kann zur

10 Standardisierung der Proteinkonzentration erforderlich sein.

Der monoklonale Antikörper HIV-gp110-1 wird ursprünglich ausgefällt aus Ascitesflüssigkeit oder Zellkulturüberständen bei Raumtemperatur oder in der Kälte mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  oder  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösungen, die bei pH 7,3 auf eine Endsättigung von 33 oder 18 % gepuffert sind. Die ausgefällten Proteine werden durch Zentrifugieren entfernt und erneut in PBS gelöst und ein zweites Mal mit 33 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  oder 12 bis 15

15 %  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gefällt. Falls erforderlich, kann diese Stufe wiederholt werden. Das Pellet wird erneut in PBS gelöst und die überschüssigen Salze werden durch Gelfiltration über eine entsalzende Matrix oder durch erschöpfende Dialyse gegen PBS entfernt.

Der gereinigte monoklonale Antikörper 110-1 kann dann an Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose gekoppelt werden. Die erforderliche Menge an Gel läßt man in  $10^{-3}$  M HCl-Lösung auf einem Glasfilter

20 quellen (1 g gefriergetrocknetes Material ergibt ein Gelendvolumen von etwa 3,5 ml), wäscht 15 Min. mit der gleichen Lösung und gibt den Antikörper unmittelbar danach zu. Im allgemeinen erfolgt die Kopplungsreaktion am wirksamsten in einem pH-Bereich von 8 bis 10, man kann jedoch auch bei einem niedrigeren pH-Wert arbeiten, wenn dies aus Gründen der Antikörperstabilität erforderlich ist. Der Antikörper soll in PBS oder in einem Carbonat/Bicarbonat- oder Boratpuffer von hoher Ionenstärke mit 150 mM NaCl gelöst sein.

25 Die aktivierte Sepharose und die Antikörpersuspension werden bei Raumtemperatur 2 bis 4 h oder über Nacht bei 4 °C leicht gerührt und anschließend auf einer groben Glasfilterfritte mit Kopplungspuffer gewaschen. Soweit aktive Gruppen verblieben sind, werden diese durch 2-stündige Behandlung mit 1,0 M Ethanolamin bei pH 8 blockiert. Das Antikörper-Sepharose-Endprodukt wird anschließend abwechselnd 4 oder 5 x mit Pufferlösungen mit hohem oder niedrigem pH-Wert gewaschen (Boratpuffer, 0,1 M, pH 8,5, 1

30 M NaCl und Acetatpuffer, 0,1 M, pH 4,0, 1 M NaCl). Durch das Waschen entfernt man Spuren von nicht-kovalent adsorbierten Materialien. Die fertige Immunoaffinitäts-Separationsmatrix lagert man unterhalb von 8 °C in Anwesenheit eines geeigneten bakteriostatischen Mittels, wie 0,01 %-iges Azid.

Die Zugabe der exprimierten Proteinsuspension zu der Immunoaffinitäts-Separationsmatrix führt zu der selektiven Entfernung des gp110-Antigens. Die Mischung läßt man 2 bis 24 h, vorzugsweise 12 bis 18 h,

35 unter leichtem Rühren oder Schütteln einwirken. Man kann auch so vorgehen, daß man die Immunoaffinitätsmatrix in eine Säule gibt, äquillibriert und die exprimierte Proteinsuspension langsam auf die Säule gibt. Nach Zugabe der Proteinsuspension sollte der Flow gestoppt werden, um die Bildung des Immunkomplexes auf beste Weise zu bewerkstelligen.

Ungebundenes Material wird durch extensives Waschen mit Adsorptionpuffer ausgewaschen oder

40 abgetrennt. Dazu kann man eine grobe Glasfilterfritte unter Anlegen eines Vakuums verwenden oder die Säule im Durchfluß behandeln. Das ungebundene Material wird dann unter Anwendung von Puffern mit niedrigem oder hohem pH-Wert (Acetatpuffer, pH 4,0 oder Boratpuffer, pH 8,56) oder eines chaotropen Agens eluiert.

#### 45 Beispiel VI

##### Immunoaffinitätsreinigung von rekombinantem gp110 aus einem Säugetier-Expressionssystem

Die neuen monoklonalen Antikörper finden bei der Immunoaffinitätsreinigung von rekombinantem, durch

50 Säugetierzellen exprimierten Fusions-gp110 Anwendung. Die Säugetierzellen infiziert man mit rekombinanten Vaccinia (Mackett et al., J. Virol. 49:857 (1984), worauf hiermit Bezug genommen wird), die Sequenzen enthalten, welche für wenigstens den Teil von gp110 kodieren, der antigen ist und die Bildung von neutralisierenden Antikörpern auslöst.

Die rekombinanten Vaccinia werden gemäß dem Verfahren konstruiert, das in der US-PS 4 834 976

55 beschrieben ist, auf die hiermit Bezug genommen wird. Die Sequenzen, die für das Hüllglykoprotein von HIV kodieren, werden in einem Plasmidvektor (pGS20) abwärts von einem Vaccinia-Transkriptionskontroll-element inseriert. Diese chimäre Gen wird flankiert von Sequenzen, die für das virale Thymidinkinase (TK)-Gen kodieren.

Die chimären Plasmidvektoren, die Vaccinia-Virus-Promotoren enthalten, welche an das LAV-Hüllgen ligiert sind, verwendet man zur Transformation des E. Coli-Stamms MC1000. Insertion der chimären LAV-env-Sequenzen in das Vaccinia-Virus-Genom erfolgte durch in vivo-Rekombination, was dadurch möglich wurde, daß die chimären Gene in den Plasmiden pv-env5 von Vaccinia-Virus-Sequenzen flankiert sind, die für das TK-Gen kodieren. Dieses Plasmid wird dann in die Zellen eingeführt, die vorher mit Vaccinia-Viren vom Wildtyp infiziert worden waren. Man ermöglicht dann eine Rekombination zwischen den TK-Sequenzen am Plasmid und den homologen Sequenzen in dem Vaccinia-Virus-Genom unter Insertion des chimären Gens. Afrikanische Green-Monkey-Nierenzellen (Stamm BSC-40, eine von BS-1-Zellen abstammende Zelllinie, ATCC Nr. CCL26) verwendet man als Wirt im Expressionssystem.

Konfluente BSC-40-Zellen infiziert man in einer Infektionsmultiplizität von 10 durch rekombinante Vaccinia-Viren. Die Infektion läßt man 12 h ablaufen, danach werden die Zellen geerntet, einmal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Die Zellpellets suspendiert man in Lysepuffer (1,0 % NP-40, 2,4 % Natriumdeoxycholat, 0,1 M NaCl, 0,01 M M Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA) und klärt das Lysat durch zentrifugieren. Die Immunoaffinitätstrennung des exprimierten rekombinanten Fusionsproteins führt man, wie oben für das bakterielle Expressionssystem beschrieben, unter Anwendung des monoklonalen Antikörpers gp110-1 durch. Die durch dieses Expressionssystem produzierten Proteine ähneln aufgrund der durch die Säugetierzellen erfolgten Behandlung und Glykosylierung stärker natürlich produziertem HIV-gp110.

### Beispiel VII

#### Inhibierung einer HIV-Infektion mit blockierenden Peptiden

Die Wirksamkeit von blockierenden Peptiden bei der Inhibierung der Infektion von Gewebekulturzellen durch den LAV<sub>BRU</sub>-HIV-Stamm wurde unter Anwendung einer Modifikation des Verfahrens für die Bewertung von Peptid T, das von Pert et al, siehe oben, publiziert wurde, untersucht. Die bevorzugten HIV-Inhibitions-Assays erfolgen, indem man gleiche Volumina blockierender Peptide und CEM-Zellen ( $2,5 \times 10^5$ ) in Medium (RPMI, 10 % FCS und 2 mg/ml Polybren) kombiniert und 45 Min. bei 37 °C inkubiert. Das Virus wird dann in unterschiedlichen Dosierungen (10, 50, 500 TCID<sub>50</sub>) zugegeben und die Mischung wird 14 Tage bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wird anschließend einem Assay auf die Produktion von Virusantigen (z.B. p25-Kernantigen) unterzogen.

Eine Preinkubation der CEM-Zellen mit den Peptiden vor der Viruszugabe zu den Kulturen verstärkt den inhibierenden Effekt in den Assays. Es hat sich gezeigt, daß die Inhibierung von der Virusdosierung abhängig ist, wobei eine große Aktivität bei niedrigen und mittleren Dosierungen, ein geringerer Effekt dagegen bei höchsten Virusdosierungen zu beobachten war.

Mit Peptid T war bei Experimenten mit niedrigen Virusdosierungen eine Inhibierung der Virusantigenproduktion von etwa 60 % bis 90 % zu erzielen. Weitere Experimente mit den Peptiden X bis XV, die typischerweise am COOH-Terminus amidiert und am NH<sub>2</sub>-Terminus acetyliert waren, ergaben ähnliche Ergebnisse, wobei das Peptid XI über einen breiten Dosisbereich besonders wirksam war. Es ist ersichtlich, daß auf Basis der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper und Peptide, einschließlich der blockierenden Peptide, eine bessere Methode zur Neutralisierung und/oder Inhibierung von HIV-Infektionen zur Verfügung steht. Dies ermöglicht die Schaffung prophylaktischer und therapeutischer Mittel, die gegen Infektionen durch die meisten, wenn nicht alle, HIV-Stämme wirksam sind. Darüber hinaus finden die neuen Materialien in Diagnose-Assays und anderen bekannten Verfahren Anwendung.

#### Hinterlegungsnummern der Mikroorganismen

Die nachfolgenden Mikroorganismen, die Teil der vorliegenden Erfindung sind, wurden bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, hinterlegt. Die Hinterlegungsdaten sind wie folgt:

50

55

Wissenschaftl. Bezeichnung	Bezeichnung des Hinterlegers	ATCC-Nr.	Hinterlegungsdaten
Mouse hybridoma (balb c/NS-1)	HIV-gp 110-1	HB 9175	August 15, 1986
"	HIV-gp 110-2	HB 9176	August 15, 1986
"	HIV-gp 110-3	HB 9177	August 15, 1986
"	HIV-gp 110-6	HB 9404	April 30, 1987
"	HIV-gp 110-4	HB 9405	April 30, 1987
"	HIV-gp 110-5	HB 9406	April 30, 1987
"	HIV-p 25-2	HB 9407	April 30, 1987
"	HIV-p 25-3	HB 9408	April 30, 1987
"	HIV-p 25-6	HB 9409	April 30, 1987
"	HIV-p 25-7	HB 9410	April 30, 1987

Die Hybridome HB9175, HB 9176 und HB 9177 wurden getestet und waren am 26. August 1986 lebensfähig. Die übrigen Hybridome wurden ebenfalls getestet und waren am 4. Mai 1987 lebensfähig.

### Patentansprüche

1. Immortalisierte Zelllinie, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der in der Lage ist, mit einer Hüllglykoprotein-gp110-Antigen-Determinante zu reagieren, die innerhalb des neutralisierenden Bereichs oder blockierenden Peptids des HIV enthalten ist, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie durch ein Verfahren herstellbar ist, das folgende Schritte umfaßt:
  - Verabreichen einer immunogen wirksamen Menge eines mit HIV-Proteinen angereicherten Antigenpräparates an einen Wirt;
  - Überwachen der Produktion der Antikörper, die mit gp110-Antigen-Determinanten reagieren, im immunisierten Wirt;
  - Gewinnung von Antikörper-produzierenden Zellen aus dem Wirt und Immortalisieren derselben;
  - Selektion der immortalisierten Zellen, die Antikörper gegen HIV gp110 produzieren; und
  - Klonierung der immortalisierten Zellen für die Produktion von Zelllinien.
2. Zelllinie nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man bei dem verfahren zu ihrer Herstellung als HIV-Proteine rekombinante Fusionsproteine verwendet, die von einem eukaryotischen oder bakteriellen Wirt exprimiert werden, oder HIV-Proteine, die aus einem HIV-Extrakt oder -Lysat erhältlich sind.
3. Zelllinien nach Anspruch 1 oder 2 mit der Bezeichnung HIV-gp110-1, HIV-gp110-2, HIV-gp110-3, HIV-gp110-4, HIV-gp110-5, HIV-gp110-6, HIV-p25-61 und HIV-p25-7.
4. Verfahren zur Erzeugung von Zelllinien nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es folgende Schritte umfaßt:
  - Verabreichen einer immunogen wirksamen Menge eines mit HIV-Proteinen angereicherten Antigenpräparates an einen Wirt;
  - Überwachen der Produktion der Antikörper, die mit gp110-Antigen-Determinanten reagieren, im immunisierten Wirt;
  - Gewinnung von Antikörper-produzierenden Zellen aus dem Wirt und Immortalisieren derselben;
  - Selektion der immortalisierten Zellen, die Antikörper gegen HIV gp110 produzieren; und
  - Klonierung der immortalisierten Zellen für die Produktion von Zelllinien.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als HIV-Proteine rekombinante Fusionsproteine verwendet, die von einem eukaryotischen oder bakteriellen Wirt exprimiert werden, oder HIV-Proteine, die aus einem HIV-Extrakt oder -Lysat erhältlich sind.
6. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die spezifisch mit einem oder mehreren neutralisierenden Bereichen von HIV reagieren, unter Verwendung einer Zelllinie nach Anspruch 1, **gekennzeichnet** durch folgende Verfahrensschritte:
  - Verabreichen einer immunogen wirksamen Menge eines mit HIV-Proteinen angereicherten Antigenpräparates an einen Wirt;
  - Überwachen der Produktion der Antikörper, die mit gp110-Antigen-Determinanten reagieren, im immunisierten Wirt;

- Gewinnung von Antikörper-produzierenden Zellen aus dem Wirt und Immortalisieren derselben;
  - Selektion der immortalisierten Zellen, die Antikörper gegen HIV gp110 produzieren;
  - Klonierung der immortalisierten Zellen für die Produktion von Zelllinien; und
  - Züchtung der Zelllinien, die in der Lage sind, Antikörper zu produzieren, die mit einem oder mehreren neutralisierenden HIV-Bereichen reagieren, und Gewinnung der Antikörper.
- 5
7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als HIV-Proteine rekombinante Fusionsproteine verwendet, die von einem eukaryotischen oder bakteriellen Wirt exprimiert werden, oder HIV-Proteine, die aus einem HIV-Extrakt oder -Lysat erhältlich sind.
- 10
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine immortalisierte Zelllinie verwendet, die monoklonale Antikörper produziert, die in der Lage sind, mit einer Hüllglykoprotein-gp110-Antigen-Determinante zu reagieren, die innerhalb des neutralisierenden Bereichs oder blockierenden Peptids des HIV enthalten ist.
- 15
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Antikörper erhält, die spezifisch mit einem neutralisierenden Bereich reagieren, der Epitope umfaßt, die in den env- oder gag-Bereichen des HIV-Genoms codiert sind.
- 20
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß man monoklonale Antikörper erhält, die spezifisch mit einem neutralisierenden Bereich reagieren, der Epitope umfaßt, die auf den LAV<sub>BRU</sub> HIV-Proteinen gp110 oder p25 lokalisiert sind.
- 25
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß man monoklonale Antikörper erhält, die spezifisch mit einem neutralisierenden Bereich reagieren, der die HIV-gp110-Aminosäuresequenz 301 bis 336 oder 308 bis 328 oder Homologe dieser Sequenzen umfaßt.
- 30
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß man monoklonale Antikörper erhält, die spezifisch mit einem neutralisierenden Bereich reagieren, der die HIV-p25-Aminosäuresequenz 278 bis 319 oder 315 bis 363 oder Homologe dieser Sequenzen umfaßt.
- 35
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine Zelllinie mit der Bezeichnung ATCC HB 9405 einsetzt.
- 40
14. Verfahren zur Herstellung von Peptiden, die in der Lage sind, immunologisch die neutralisierenden Bereiche von HIV-Proteinen nachzuahmen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
- die monoklonalen Antikörper, die nach einem der Ansprüche 6 bis 13 hergestellt sind, an ein Substrat oder einen Träger bindet oder daran immobilisiert;
  - die rekombinanten Fusionsproteine, die von einem eukaryontischen oder bakteriellen Wirt exprimiert werden, oder die HIV-Proteine aus einem HIV-Extrakt oder -Lysat mit den immobilisierten Antikörpern unter Bildung eines Immunkomplexes in Kontakt bringt;
  - die Immunkomplexe oder Antigenfragmente vom Träger abtrennt, und
  - die Peptide gewinnt.
- 45
15. Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Peptide erhält, die wenigstens 5 zusammenhängende Aminosäuren der folgenden HIV-gp110-Aminosäuresequenz oder der Homologen davon umfassen:

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.**

16. Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zusammenhängenden Aminosäuren wenigstens eine Antigen-Determinante definieren, die in der Lage ist, nach Immunisierung eines Wirts die Bildung von Antikörpern auszulösen, die eine Schutzwirkung gegen HIV-Infektionen besitzen.
- 5 17. Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Peptide erhält, die eine der folgenden HIV-gp110-Aminosäuresequenzen oder der Homologen davon umfassen:

I (29)

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

V (177)

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

VIII (110-2-2)

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

25 worin Y und Y', soweit vorhanden, jeweils eine Aminosäuresequenz von bis zu 20 Aminosäuren bedeuten.

- 30 18. Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Peptide der Sequenz I, V oder VIII erhält, in denen Y und/oder Y' einen bindenden Rest umfassen, der ausgewählt ist aus der Gruppe, die im wesentlichen besteht aus Glycin, Tyrosin, Cystein, Lysin, Glutaminsäure oder Asparagin.
19. Verwendung von wenigstens zwei Nucleinsäuresequenzen, die für die in Tabelle I der Beschreibung angegebenen Peptide codieren, für Diagnose-Hybridisierungs-Assays.
- 35 20. Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit von HIV in einer biologischen Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
- einen monoklonalen Antikörper, der in der Lage ist, mit HIV-gp110 der biologischen Probe zu reagieren, inkubiert;
  - 40 - und die Anwesenheit von Immunkomplexen aus dem monoklonalen Antikörper und der Antigen-Determinante in der biologischen Probe nachweist und daraus die Anwesenheit oder das Fehlen von HIV in der Probe bestimmt.
21. Verfahren nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß der monoklonale Antikörper in der Lage ist, mit einem neutralisierenden Bereich oder einem blockierenden Peptid von gp110 zu reagieren.
- 45 22. Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit von Antikörpern gegen HIV in einer biologischen Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
- ein Peptid aus einem neutralisierenden Bereich von HIV-gp110 oder p25 mit der biologischen Probe inkubiert; und
  - 50 - die Anwesenheit von Immunkomplexen aus dem Peptid und den Antikörpern in der Probe, die mit dem Peptid reagieren, nachweist und daraus die Anwesenheit oder das Fehlen von HIV in der Probe bestimmt.
- 55 23. Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit von HIV in einer biologischen Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
- ein Nucleinsäuresegment, das für wenigstens einen Teil eines neutralisierenden Bereichs von HIV codiert, mit einer Nucleinsäure in der biologischen Probe unter Hybridisierungsbedingungen

inkubiert; und

- die Anwesenheit von Hybridkomplexen aus dem Nucleinsäuresegment und der Nucleinsäure in der Probe nachweist und daraus die Anwesenheit oder das Fehlen von HIV in der Probe bestimmt.

5

24. Verfahren zur Bestimmung eines HIV-Stammes in einem infizierten Wirt, **dadurch gekennzeichnet**, daß man

- eine biologische Probe des Wirts mit einem Peptid eines neutralisierenden Bereichs von HIV inkubiert; und

10

- die Anwesenheit von Immunkomplexen aus dem Peptid und den Antikörpern in der Probe nachweist und daraus den HIV-Stamm bestimmt, mit dem der Wirt infiziert ist.

25. Mittel zur Diagnose von HIV-Infektionen in einer biologischen Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine wirksame Dosis von wenigstens einem monoklonalen Antikörper, hergestellt nach dem Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 13, und einen pharmazeutisch verwendbaren Träger enthält.

15

26. Mittel nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß es wenigstens einen monoklonalen Antikörper enthält, der spezifisch mit Epitopen reagiert, die in den env- oder gag-Bereichen des HIV-Genoms codiert sind.

20

27. Mittel nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß es wenigstens einen monoklonalen Antikörper enthält, der spezifisch mit Epitopen reagiert, die auf den HIV-Proteinen gp110 oder p25 lokalisiert sind.

25

28. Mittel nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß es einen monoklonalen Antikörper, der mit wenigstens einem Epitop der LAV<sub>BRU</sub>-p25-Aminosäuresequenz 278 bis 319 und/oder Homologen davon reagiert, und einen zweiten monoklonalen Antikörper, der mit wenigstens einem Epitop der LAV<sub>BRU</sub>-p25-Aminosäuresequenz 315 bis 363 und/oder Homologen davon reagiert, enthält.

30

29. Mittel nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß es einen monoklonalen Antikörper, der mit wenigstens einem Epitop von HIV-p25 reagiert, und einen zweiten monoklonalen Antikörper, der mit wenigstens einem Epitop von HIV-gp110 reagiert, enthält.

35

30. Mittel nach Anspruch 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß das p25-Epitop innerhalb der LAV<sub>BRU</sub>-Aminosäuresequenz 278 bis 319 oder 315 bis 363 oder von Homologen dieser Sequenzen lokalisiert ist.

40

31. Mittel nach Anspruch 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß das gp110-Epitop innerhalb der LAV<sub>BRU</sub>-Aminosäuresequenz 308 bis 328 oder von Homologen dieser Sequenzen lokalisiert ist.

45

50

55