



CH 675728 A5



SCHWEIZERISCHE Eidgenossenschaft  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 675728 A5

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: C 07 K 15/28  
A 61 K 39/42  
A 61 K 39/12  
G 01 N 33/68

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳ Gesuchsnummer: 3210/87

㉒ Anmeldungsdatum: 20.08.1987

③① Priorität(en): 20.08.1986 US 898273  
01.05.1987 US 045026  
29.06.1987 US 067996

㉔ Patent erteilt: 31.10.1990

④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 31.10.1990

⑦③ Inhaber:  
Genetic Systems Corporation, Seattle/WA (US)

⑦② Erfinder:  
Shriver, Mary Kathleen, Bellevue/WA (US)  
Thomas, Elaine K., Seattle/WA (US)  
Cosand, Westley L., Bothell/WA (US)  
Gosting, Larry H., Snohomish/WA (US)  
Dickinson, Edna S., Seattle/WA (US)  
McClure, Janela, City of Vashon Island/WA (US)  
Todaro, George J., Seattle/WA (US)  
Nowinski, Robert C., Seattle/WA (US)

⑦④ Vertreter:  
Bovard AG, Bern 25

⑤④ **Monoklonale Antikörper und Peptide, welche bei der Behandlung und Diagnose von HIV-Infektionen nützlich sind.**

⑤⑦ Monoklonale Antikörper, die mit einer oder mehreren neutralisierenden Regionen von HIV-Proteinen reaktiv sind, Peptide oder Homologe davon aus diesen Regionen und verwandte Nukleinsäuresegmente und Blockierungspeptide sind als Wirkstoffe für Zusammensetzungen zur Diagnose, Behandlung und Prävention von HIV-Infektionen nützlich. Die neutralisierenden Regionen der HIV-Proteine umfassen ausgewählte Teile der env- und gag-Gene von verschiedenen HIV-Isolaten. Zelllinien, welche monoklonale Antikörper ausscheiden, besitzen die ATCC Hinterlegungsnummern HB 9175, HB 9176, HB 9177, HB 9405, HB 9406, HB 9404, HB 9407, HB 9408, HB 9409 und HB 9410.

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Zusammensetzungen, welche für die Diagnose, Behandlung und Prävention von viralen Infektionen nützlich sind. Die Zusammensetzungen enthalten monoklonale Antikörper und Peptide, welche für die Diagnose, Neutralisierung und Impfung gegen humane Immunschwäche-Virus (HIV)-Infektionen nützlich sind.

Das infektiöse Agens, welches für das erworbene Immunschwäche-Syndrom (acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) und seine prodromalen Phasen, den AIDS-verwandten Komplex (ARC) und das Lymphadenopathische Syndrom (LAS) verantwortlich ist, ist ein neues lymphotropes Retrovirus. Das Virus ist verschieden von LAV, HTLV-III, ARV und kürzlich mit HIV bezeichnet worden.

Da die Verbreitung des HIV pandemische Ausmasse erreicht, ist die Behandlung von infizierten Individuen und die Prävention der Übertragung an uninfizierte Individuen, welche dem Risiko ausgesetzt werden, von äusserster Wichtigkeit. Eine Vielzahl von therapeutischen Strategien zielte auf verschiedene Stufen im Lebenszyklus des Virus und sind in Mitsuya und Broder, 1987, Nature, 325: 773, umschrieben. Ein Versuch umfasst die Verwendung von Antikörpern, welche das Virus binden und die virale Replikation entweder durch Verhinderung des viralen Eintrittes in Wirtszellen oder durch einige andere Mechanismen hemmen. Sind einmal die viralen Komponenten identifiziert, welche auf den Antikörper-Eingriff empfindlich sind, hofft man, dass für die Neutralisation der Infektiosität des Virus genügende Antikörper-Titer durch Impfung oder alternativ durch passive Verabreichung von Immunglobulinen oder monoklonalen Antikörpern der gewünschten Spezifität hervorgerufen werden könnten.

Es wird angenommen, dass die Hüllglykoproteine der meisten Retroviren mit Rezeptormolekülen auf der Oberfläche von empfindlichen Zellen reagieren, wobei die Virus-Infektiosität für gewisse Wirte bestimmt wird. Antikörper, die an die Glykoproteine gebunden sind, können die Wechselwirkung des Virus mit den Zellrezeptoren blockieren und die Infektiosität des Virus neutralisieren. Vergleiche im allgemeinen «The Molecular Biology of Tumor Viruses» 534 (J. Tooze, Herausgeber, 1973) und «RNA Tumor Viruses», 226, 236 (R. Weiss et al., Herausgeber, 1982), worauf ausdrücklich Bezug genommen wird. Vergleiche ebenfalls, Gonzales-Scarano et al., 1982 «Virology» 120: 42 (La Crosse Virus); Matsuno und Inouye, 1983, Infect. Immun. 39: 155 (neonatales Kälber-Diarrhöe-Virus); und Mathews et al., 1982, J. Immunol., 129: 2763 (Enzephalomyelitis-Virus).

Die allgemeine Struktur des HIV besteht darin, dass ein Ribonukleoproteinkern durch eine Lipid-enthaltene Hülle umgeben ist, welche während des Wachstums von der Membrane der infizierten Wirtszelle entsteht. Zwischen der Hülle und der hervorstehenden äusserlichen Form sind die viralcodierten Glykoproteine eingebettet. Die Hüllglykoproteine des HIV werden ursprünglich in der infizierten Zelle als Vorläufer-Molekül von 150'000 bis 160 000 Dalton (gp150 oder gp160) synthetisiert, welches dann in der Zelle in ein N-terminales Fragment von 110 000 bis 120 000 Dalton (gp110 oder gp120) umgewandelt wird, um das externe Glykoprotein und ein C-terminales Fragment von 41 000 bis 46 000 Daltons (gp41) zu bilden, welches ein membran-durchdringendes Hüllglykoprotein darstellt.

Aus den oben diskutierten Gründen war das gp110-Glykoprotein des HIV Gegenstand von vielen Forschungsarbeiten als potentiell Ziel für den Unterbruch des Lebenszyklus des Virus. Seren von HIV-infizierten Individuen konnten das HIV in vitro neutralisieren und Antikörper, welche sich an das gereinigte gp110 binden, sind im Serum vorhanden. Robert-Guroff et al., 1985, Nature 316: 72, Weiss et al., 1985, Nature 316: 69; und Mathews et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 9709. Gereinigtes und rekombinantes gp110 stimulierte die Produktion von neutralisierenden Serum-Antikörpern, wenn sie zur Immunisierung von Tieren verwendet wurden, Robey et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 7023; Lasky et al., 1986, Science 233: 209; und eines menschlichen Individuums, Zagury et al., 1986, Nature 326: 249. Die Bindung des gp110-Moleküls am CD4 (T4)-Rezeptor wurde ebenfalls nachgewiesen und die monoklonalen Antikörper, welche gewisse Epitope des CD4-Rezeptors erkennen, blockieren die HIV-Bindung, die Syncytia-Bildung und Infektiosität. McDougal et al., 1986, Science 231: 382. Putney et al., (1986, Science 234: 1392) erwirkten neutralisierende Serum-Antikörper nach ihrer Immunisierung mit einem rekombinanten Fusionsprotein, welches die Carboxy-terminale Hälfte des gp110-Moleküls enthielt, und es wurde im weiteren gezeigt, dass die Glykosylierung des Hüllproteins für eine neutralisierende Antikörperreaktion unnötig ist.

Ein Untereinheitsimpfstoff für AIDS, welcher das HIV-gp110-Molekül oder Teile davon verwendet, kann demzufolge wünschenswert sein. Untereinheitsimpfstoffe sind eine Alternative zu Impfstoffen, welche aus inaktivierten oder geschwächten Viren hergestellt sind. Inaktivierte Impfstoffe sind lästig, da es möglich ist, dass nicht alle viralen Partikel abgetötet sind, und abgeschwächte Viren können die Fähigkeit der Mutation besitzen und wiederum ihre krankheitsbewirkende Fähigkeit erwerben. Mit Untereinheitsimpfstoffen werden nur diejenigen Teile des Virus, welche Antigene oder Epitope enthalten, welche Immunantworten hervorrufen können, d.h. Antikörper, ADCC und cytotoxische T-Zellantworten neutralisieren können, zur Immunisierung von Wirten verwendet. Ein Hauptvorteil von Untereinheitsimpfstoffen besteht darin, dass das irrelevante, virale Material ausgeschlossen ist.

Virale Untereinheiten für die Verwendung in Impfstoffen können auf verschiedene Weise gebildet werden. Beispielsweise kann das Hüllglykoprotein aus einem bakteriellen Wirt exprimiert und gereinigt werden, obschon diesem Molekül die meisten nach-translationalen Änderungen (wie die Glykosylierung oder andere Verfahren) fehlen. Solche Änderungen können unter Verwendung von eukaryontischen

Expressionssystemen erzielt werden, wie durch Hefe oder kultivierte Säugetierzellen. Virale Gene wurden in Säugetierzellen unter Verwendung eines Vaccinia-Virus als Vektor eingeführt. Vergleiche beispielsweise, Mackett, M. et al., 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79: 7415; Panicali, D. und Paoletti, E., 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79: 4927. Der rekombinante Vaccinia-Virus kann gemäss den in den folgenden Publikationen beschriebenen Verfahren konstruiert werden: Hu et al., Nature 320: 537 (1986) oder Chakrabarti et al., Nature 320: 535 (1986), auf welche ausdrücklich Bezug genommen wird. In diesen Systemen werden virale Glykoproteine, welche durch Zellen produziert sind, die mit rekombinantem Vaccinia infiziert sind, zweckmässigerweise glykosiliert und können zum Auspressen und zur abschliessenden Isolierung an die Zelloberfläche transportiert werden.

Ein wichtiger Schritt bei der Herstellung eines Untereinheitsimpfstoffes ist eine zweckmässige Reinigung des gewünschten Glykoproteins aus der komplexen Mischung des Expressionssystems. Es können verschiedene Verfahren zur Durchführung der Reinigung angewendet werden. Diese umfassen beispielsweise Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Gelpermeationschromatographie und verschiedene Chromatographie-Methoden (z.B. Ionenaustausch, Umkehrphase, Immunoaffinität, hydrophobe Wechselwirkung) und andere. Die meisten dieser Verfahren werden in verschiedenen Kombinationen eingesetzt, um im wesentlichen reine Präparate zu erhalten (Kleid, D.G., et al., 1981, Science 214: 1125; Cabradilla, C.D., et al., 1986, Biotechnology 4: 128; Dowbenko, D.J., 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 7748), auf welche ausdrücklich Bezug genommen wird.

Es besteht ein Bedürfnis nach Verfahren, welche die Anzahl der erforderlichen Schritte reduzieren, um eine maximale Reinigung eines besonderen viralen Antigens aus einer komplexen Expressionsmischung, um Untereinheitsimpfstoffe herzustellen. Die wirkungsvolle Trennung der Antigene von fremden Komponenten könnte unter Verwendung von Immunoaffinitätschromatographie durchgeführt werden. Diese Technik, welche ebenfalls als Immunoadsorption bekannt ist, besteht im Prinzip aus der selektiven Adsorption eines Antigens auf einen festen Träger, auf welchem ein spezifischer Antikörper kovalent gebunden ist. Die selektiv adsorbierten Antigene werden dann von einem solchen Antikörper-Affinitätsadsorbens durch Änderung, beispielsweise des pH-Wertes und/oder der Ionenstärke des Puffers eluiert.

Polyklonale Antikörper, die von mit dem gewünschten Antigen immunisierten Tieren oder aus natürlich infizierten Individuen erhalten werden (siehe beispielsweise Lasky et al., supra) sind häufig als Immunoadsorbensien verwendet worden, im allgemeinen besitzen diese Reagenzien wesentliche Nachteile, wie (I) nicht alle der an den unlöslichen Träger gebundenen Antikörper spezifisch für das interessierende Moleküle sind und zusätzliche Reinigungen erforderlich sind; (II) die Ausbeuten des gewünschten Antigens häufig niedrig sind und (III) die Antikörper-Affinitäten häufig von einer Herstellung zur anderen variieren, wobei Modifikationen in den Elutionsverfahren erforderlich sind. Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch auf das gewünschte virale Antigen sind, in den Untereinheitswirkstoff-Zubereitungen, könnte im Gegensatz zu den polyklonalen Antikörpern diese Schwierigkeiten umgehen.

Monoklonale Mäuseantikörper, welche HIV-Antigene binden, sind beschrieben worden. Verschiedene Forschergruppen haben monoklonale Antikörper beschrieben, welche für das Kernprotein p25 spezifisch sind (siehe z.B. die Marzo Veronese, et al., 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 5199 und Chasagne, J., et al., 1986, J. Immunol. 136: 1442). Die monoklonalen Antikörper, die spezifisch für das Membran-Glykoprotein gp41 sind ebenfalls beschrieben worden (vgl. z.B. di Marzo Veronese, et al., 1985, Science 229: 1402).

Auf dem Fachgebiet besteht demzufolge weiterhin ein Bedarf nach monoklonalen Antikörpern, die spezifisch auf Epitope in wohl definierten Regionen des Haupthüllglykoproteins gp110 sind. Monoklonale Antikörper, welche diese Regionen binden und eine Reduktion oder Elimination der Replikation und Übertragungsfähigkeit des HIV bewirken, würden eine bedeutende therapeutische und prophylaktische Nützlichkeit besitzen. Zusätzlich könnten die monoklonalen Antikörper ebenfalls zur Reinigung der gewünschten Region von gp110 aus zertrümmerten Viren oder rekombinanten Expressionssystemen verwendet werden, beispielsweise für die Verwendung in Impfstoffen. Zusätzlich könnte die Region, welche eins oder mehrere Epitope enthält, die durch den monoklonalen Antikörper erkannt werden, chemisch synthetisiert werden, wobei die bei der Reinigung und Verabreichung von grösseren Fragmenten von gp110-Molekülen auftretenden Schwierigkeiten vermieden werden können. Die vorliegende Erfindung füllt diese oder ähnliche Bedürfnisse.

Zur Verfügung gestellt werden Peptide, die fähig sind, neutralisierte Epitope von HIV-Proteinen immunologisch nachzuahmen, Nukleinsäure-Proben, welche solche Peptide codieren und monoklonale Antikörper, welche mit solchen Peptiden reaktiv sind und ebenso andere Peptide, welche mit der HIV-Infektiosität in Wechselwirkung treten. Diese neuen Materialien finden z.B. in diagnostischen Tests für den Nachweis von HIV-Infektionen und in therapeutischen Präparaten für die Behandlung oder Impfstoffe gegen solche Infektionen Anwendung.

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Zusammensetzungen gemäss der Definition im Anspruch 1 für die Neutralisierung von HIV-Infektionen, d.h. für die Prävention oder eine wesentliche Hemmung der Bildung oder der cellulären Transmission von infektiösen HIV in einem Wirt. Sie betrifft auch die Peptide gemäss Anspruch 19, welche eine neutralisierende Region des HIV nachahmen und monoklonale Antikörper, welche mit einer solchen Region reaktiv sind und für die Diagnose, Behandlung und Impfung gegen

HIV-Infektionen verwendet werden können. Im Hinblick darauf bedeutet der Ausdruck «neutralisierende Region» diejenigen Teile des HIV, insbesondere HIV-Proteine, welche Aminosäuresegmente enthalten, welche eines oder mehrere Epitope definieren, welche mit Antikörpern reagieren, die fähig sind, entweder individuell oder in Kombination mit anderen erfindungsgemässen Antikörpern HIV-Infektionen zu neutralisieren. Zweckmässige Tests für die Neutralisation sind wohlbekannt und umfassen beispielsweise die Reduktion von HIV-Infektionen in T-Zelllinien, die Reduktion von plaquebildenden Einheiten in VSV (HIV)-Pseudotypen, welche das Hüllglykoprotein des HIV aufweisen, syncytiale Hemmungstests und Virion-Rezeptor-Bindungstests. Wie gewünscht kann die neutralisierende Aktivität mit der Antikörperaktivität in immunochemischen Tests, wie Immunofluoreszenz, Immunoblotting und Radioimmunopräzipitationstest verglichen werden. In einem Aspekt enthalten die neuen Peptide, die typischerweise weniger als etwa 50 Aminosäuren aufweisen, fünf oder mehr nebeneinanderliegende Aminosäuren, die Epitope bilden, die im wesentlichen ähnlich sind, wie Epitope in den neutralisierenden Regionen von HIV-gp110 oder p25 vorhanden sind, welche durch die *env*- bzw. *gag*-Gebiete des HIV-Genoms codiert werden. Von besonderem Interesse sind die Regionen, welche sich ungefähr vom Aminosäurerest 301 bis etwa 336 von gp110 und von etwa 278 bis etwa 319 und von etwa 315 bis etwa 363 von p25 ausdehnen, welche alle vom HIV-Stamm mit der Bezeichnung LAV<sub>BRU</sub> stammen. Die Aminosäurerestebezeichnungen stammen von der Los Alamos Data Bank (AIDS Virus sequence database, Los Alamos National Laboratory, Theoretical Division, Los Alamos, NM 87545, USA).

Der Fachmann wird bemerken, dass zusätzliche analoge Gebiete (Homologe) von anderen HIV-Isolaten identifiziert werden können auf Basis ihrer Lokalisation in verwandten Proteinen von verschiedenen Isolaten. In der Praxis können solche Homologe, bezogen auf die LAV<sub>BRU</sub>-Sequenzdaten folgendermassen identifiziert werden:

a) die Aminosäuresequenzen von HIV-Isolaten und LAV<sub>BRU</sub> können so angeordnet werden, um eine maximale Homologie zwischen den beiden Sequenzen zu erhalten;

b) die Peptide, welche Aminosäuresequenzen von HIV-Isolaten enthalten, welche der Lage von LAV<sub>BRU</sub>-Peptiden entspricht, dass immunologisch nachgeahmte LAV<sub>BRU</sub>-Proteine identifiziert werden können. Die so identifizierten Peptide, welche HIV-Isolataminosäuresequenzen enthalten, sind typischerweise immunologisch klinisch zu entsprechenden HIV-Isolatproteinen.

Dieses Verfahren kann auf HIV-Stämme angewendet werden, welche noch nicht entdeckt sind. Beispielsweise können bei der Entdeckung von neuen HIV-Stämmen die Aminosäuresequenzen ihrer Hülle und ihres Kerns mit derjenigen von LAV<sub>BRU</sub> so angeordnet werden, um eine maximale Homologie zu erhalten. Die Verfahren zur Aufreihung der Sequenzen sind dem Fachmann bekannt. Bei der Anordnung der Sequenzen ist es wünschenswert, soviel Homologie wie möglich zwischen den Cysteinresten zu erhalten. Die Aminosäuresequenz von neuen HIV-Stämmen oder Arten welche den Stellen der Peptide entsprechen, die hier spezifisch offenbart sind, können synthetisiert und gemäss der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

Ein anderes Verfahren für die Bestimmung von Sequenzen einer homologen Region in anderen HIV-Stämmen ist durch Scharf et al., beschrieben, *Science* (1986) 233: 1076. Es verwendet zwei Oligonukleidprimer, welche sich an zwei konservierte Sequenzen ausserhalb der interessierenden Sequenzregion binden und enthält verschiedene restriktive Stellen in jedem Primer. Die DNA aus HIV-Stämmen kann dann anschliessend *in vitro* verstärkt werden, wobei die erhaltenen Oligonukleotide in Vektoren für die Sequenzanalyse geklont werden können und einem Impfstoff einverleibt werden können als Kasette, welche ein besonderes Epitop des HIV-Stammes darstellt.

Es ist in der vorliegenden Erfindung nicht erforderlich, dass die in solchen Sequenzen enthaltenen Epitope mit Antikörpern von allen HIV-Stämmen oder Arten kreuzreaktiv sind. Peptide, welche immunologische Epitope umfassen, welche eine Art oder Serogruppe voneinander unterscheiden können, finden Verwendung bei der Identifikation von besonderen Spezies oder Serogruppen und können als Hilfe zur Identifikation von Individuen verwendet werden, welche mit einer oder mehreren HIV-Arten oder Serogruppen infiziert sind. Sie können ebenfalls nützlich sein zur Kombination mit anderen Peptiden, entweder von einer homologen Region oder einer anderen neutralisierenden Region für die Herstellung von therapeutischen Zusammensetzungen.

Die interessierenden Peptide können ebenfalls vom gp110-Gebiet des Virus abgeleitet sein. Von besonderem Interesse in dieser Region sind Peptide, welche innerhalb des offenen Leserahmens (reading frame) *env* codiert werden, welcher sich vom Basenpaar (bp) 6667 bis etwa 6774 auf dem LAV<sub>BRU</sub>-Isolat ausdehnt. Demzufolge umfassen verschiedene homologe Regionen von anderen HIV-Isolaten die homologen Sequenzen, welche von der Los Alamos Datenbank erhalten werden (Ausnahme LAV2), wie in Tabelle I aufgelistet.

Andere zweckmässige Peptide für die Bildung oder das Screening von monoklonalen Antikörpern umfassen diejenigen, welche im offenen Leserahmen (reading frame) *env* von etwa bp 7246 bis etwa 7317 von LAV<sub>BRU</sub> codiert werden. Solche Antikörper und reaktive Peptide sind insbesondere nützlich für Immunoassays.

Tabelle I

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
15	WMJ2	-----Tyr---Val---ArgSer-----LeuSer---	306
	RFENV	-----Ser-----ThrLys	322
	Z6	-----TyrLys-----GlnSer-----ThrPro---	311
	Z3	-----GlySerAspLysLysIle-----GlnSer---	306
20	NY5	-----Lys---Gly-----Ala---	304
	CDC42	-----His-----ValThrLeu.....	320
	LAV2	-----Gly---Lys---Val---Gln-----MetLeu	302
25	HXB2	CAGAGA.....GGACCAGGGAGAGCATTGTGTTACAATAGGAAAAATAGGAAATATG	
		GlnArg...:.....GlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIleGlyAsnMet	326
	BH102	-----	326
	BH8	-----	326
	HXB3	-----	326
30	H9M	-----	326
	BRU	-----	331
	MAL	.....Gln---LeuTyr---Thr---IleVal---AspIle	329
	ELI	GlyLeu-----...GlnSerLeuTyrThr---Arg---IleValSerArgSer	323
35	ARV2	.....His---Thr---Arg---IleGlyAsp	327
	WMJ2	.....Arg---ArgGlu...---IleGlyIle	320
	RFENV	.....ValIleTyrAlaThr---Gln---IleGlyAsp	337
	Z6	GlyLeu-----...GlnAlaLeuTyrThr---Arg---ArgThrLysIleIle	327
40	Z3	ArgIle-----LysVal---TyrAlaLys---Gly.....	319
	NY5	GlyPro-----...---ThrLeuTyrAlaArgGlu-----AspIle	320
	CDC42	.....ValTrpTyr---Thr---Glu---LeuGlyAsn	335
	LAV2	MetSer-----HisVal---HisSerHisTyrGlnProIle---Lys	323
45	HXB2	...AGA...CAAGCACATTGT	
		...Arg...GlnAlaHisCys	331
	BH102	-----	331
	BH8	-----	331
50	HXB3	-----	331
	H9M	-----	331
	BRU	-----	336
	MAL	-----Arg---Tyr---	334
55	ELI	IleIleGly-----	330
	ARV2	Ile---Lys...-----	333
	WMJ2	Ile-----	326
	RFENV	Ile---Lys...-----	343
60	Z6	Gly...-----	334
	Z3	IleThrGly-----	326
	NY5	-----	325
	CDC42	Ile-----	341
65	LAV2	ArgProArg-----Met---	330

In der gag-Region des LAV<sub>BRU</sub>-Isolates sind die p15-Aminosäuresequenzen von etwa 278 bis 319 und 315 bis 363 zusätzliche neutralisierende Regionen des HIV. Der Fachmann erkennt, dass zusätzliche neutralisierende Regionen des HIV auf Basis der vorliegenden Lehren identifiziert werden können – besonders Kombinationen von monoklonalen Antikörpern, welche mit verschiedenen unterschiedlichen HIV-Epitopen reaktiv sind, zeigen eine neutralisierende Aktivität.

Das Peptid I, ebenfalls bezeichnet als Peptid 29 wird im offenen Leserahmen env von etwa Aminosäurerest Nr. 308 bis etwa 328 codiert und besitzt die folgende Aminosäuresequenz, wobei Oligopeptide, welche innerhalb der folgenden Sequenz eingeschlossen sind, ebenfalls lineare Epitope innerhalb einer solchen Sequenz einschliessen:

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'

worin Y und Y', wenn vorhanden, je Sequenzen von etwa 20 Aminosäuren darstellen. Wenn Y und/oder Y' vorhanden sind, können diese beispielsweise eine oder mehrere Aminosäuren von den Sequenzen enthalten, welche die Aminosäurereste 308 bis 328 der HIV-Hüllsequenz flankieren oder irgendein Teil dieser flankierenden Sequenzen. Beispielsweise kann Y alle oder Teile der LAV<sub>BRU</sub> Hüllaminosäuresequenz von etwa Rest Nr. 301 bis 307 enthalten und Y' kann alle oder Teile der LAV<sub>BRU</sub>-Hüllaminosäuresequenz von etwa Rest Nr. 329 bis 336, welche nachstehend dargestellt ist, enthalten:

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.

Alternativ können verstümmelte Sequenzen von Peptiden der vorliegenden Erfindung hergestellt werden. In diesem Hinblick können folgende Sequenzen aus dem Peptid 29 besonders nützlich sein:

III (29b)

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

worin Y und/oder Y', falls vorhanden, je Sequenzen bis zu 20 Aminosäurereste darstellen.

IV (29c)

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

worin Y und Y', falls vorhanden, je Sequenzen bis zu 20 Aminosäurereste darstellen.

In einer weiteren Ausführungsform werden homologe Regionen des ARV-2-Isolates von besonderem Interesse in dem offenen Leserahmen von etwa Aminosäureresten 306 bis etwa 323 codiert und besit-

## CH 675 728 A5

zen typischerweise die folgende Aminosäuresequenz, wo Oligopeptide, welche in der folgenden Aminosäuresequenz umfasst sind, lineare Epitope einer solchen Sequenz einschliessen:

5 V (177)

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

worin Y und Y', falls vorhanden, je eine solche bis zu etwa 20 oder mehr Aminosäurereste darstellen. Wenn Y und/oder Y' vorhanden sind, können diese eine oder mehrere Aminosäurereste von Sequenzen darstellen, welche die Aminosäurereste 306 bis 323 der ARV-2-Hüllsequenz flankieren oder irgendein Teil dieser flankierenden Sequenzen. Insbesondere kann Y alle oder Teile der HIV-Hüllamino-  
15 sequenz der Restnummern von etwa 299 bis 306 umfassen; Y' kann alle oder Teile der HIV-Hüllamino-  
sequenz von etwa Rest Nr. 324 bis 333 enthalten.

Alternativ können verstümmelte Sequenzen des Peptides V hergestellt werden. In dieser Hinsicht  
20 können die folgenden Sequenzen besonders nützlich sein:

VI (177a)

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

30 VII

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

40 worin Y und/oder Y', falls vorhanden, je Sequenzen bis zu 20 oder mehr Aminosäurereste darstellen.

Ein weiteres Beispiel umfasst homologe Regionen des LAV2-Isolat, so wie es im offenen env-Leserah-  
men von etwa den Aminosäureresten der Nummern 311 bis 330 codiert wird und besitzt typischerweise  
folgende Sequenz:

45 VIII (110-2-2)

50 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', falls vorhanden, je Sequenzen von 20 oder mehr Aminosäuren darstellen (siehe  
55 Nature 326: 662 (1987), auf welche ausdrücklich Bezug genommen wird).

Gemäss einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden neue Zelllinien, welche fähig sind,  
monoklonale Antikörper zu erkennen und Zusammensetzungen, welche solche Antikörper enthalten, zur  
Verfügung gestellt, wobei die Antikörper fähig sind, selektiv extrem hohe Titer (von  $10^2$  bis  $10^4$  bis etwa  
 $10^7$  oder mehr) neutralisierende Regionen, welche innerhalb einer vorbestimmten Sequenz des Hüllglyko-  
60 proteins gp110 oder p25 enthalten sind, ihre Proteinvorläufer, biologisch exprimierte, rekombinante Fu-  
sionsproteine und synthetische Peptide, welche in oder mehrere Epitope innerhalb der vorbestimmten  
Sequenzregion von gp110 oder p25 enthalten, zu bestimmen. Die hauptsächlichen Hybridzellen besitzen  
ein identifizierbares Chromosom, worin die Keimlinien-DNA so umgelagert ist, dass ein Antikörper co-  
diert wird, welcher ein Bindungszentrum für ein Epitop auf gp110 oder p25 aufweist, welches gemeinsam  
für einige oder sämtliche klinische HIV-Isolate ist. Diese monoklonalen Antikörper können in einer wei-  
65 ten Vielfalt von Verfahren einschliesslich Diagnose und Therapie verwendet werden und ebenso zur

## CH 675 728 A5

Identifikation von anderen kreuzreaktiven Antikörpern, wie blockierenden Antikörpern. Peptide oder Polypeptide, welche eines oder mehrere Epitope enthalten, mit welchen sie reagieren, können gesondert als Immunogene für Impfstoffe oder als therapeutische Wirkstoffe verwendet werden.

### 5 Blockierungspeptide

In erster Linie für die Verwendung in Konjugation mit den vorbeschriebenen Peptiden oder den neutralisierenden monoklonalen Antikörpern, umfasst die vorliegende Erfindung als Ausführungsform zusätzliche Peptide oder Antikörper, welche mit der HIV-Bindung an Rezeptoren in Wechselwirkung treten, um zusätzlich die HIV-Infektiosität zu mildern. Vorzugsweise können sogenannte «Blockierungspeptide», welche fähig sind, die Virusproliferation zu hemmen, ebenso wie monoklonale Antikörper, welche auf Epitope, die innerhalb solcher Blockierungspeptide vorhanden sind, nützlich zur Erhöhung der Wirksamkeit von Behandlungen gegen HIV-Infektionen verwendet werden. HIV-blockierende Peptide entsprechen typischerweise Aminosäuresequenzen des HIV, von welchen angenommen wird, dass sie essentiell für die Virusbindung an die Wirtszelle sind, wie die env-codierten Aminosäurereste der Nummern von etwa 190 bis etwa 197 des LAVBRU und etwa 185 bis etwa 192 des ARV2 und HTLVIII (BH-10). Diese umfassen das Peptid T-Octapeptid (Ala-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr) und seine zahlreichen Derivate (z.B. das nachstehende IX) und analoge (z.B. das nachstehende XI) beschrieben durch Pert et al., (1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 83: 9254–9258, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird) die im Hüllglykoprotein (gp110 oder 120) vorhanden sind.

Beispielsweise sind Blockierungspeptide, welche die folgenden Sequenzen besitzen von besonderem Interesse, vorzugsweise mit einem acetylierten NH<sub>2</sub>-Terminus und einem amidierten COOH-Terminus:

25

IX (173D)

Y-<sub>d</sub>Ala-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y' ;

30

X (186)

Y-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y' ;

XI(187)

35

Y-Thr-Thr-Ser-Tyr-Thr-Y' ;

XII (188)

40

Y-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y' ;

XIII (189)

45

Y-Asn-Thr-Ser-Tyr-Gly-Y' ;

XIV (190)

Y-Asp-Thr-Asn-Tyr-Ser-Y' ;

XV (191)

50

Y-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y' ;

55

worin für jedes Peptid Y und Y', falls vorhanden, je eine Aminosäuresequenz bis zu etwa 20 Aminosäuren umfasst. Epitope oder antigenische Determinanten innerhalb dieser Peptide sind typischerweise durch mindestens etwa fünf aufeinanderfolgende Aminosäuren definiert und finden beispielsweise Anwendung bei der Nachahmung von natürlich vorkommenden antigenischen HIV-Stellen, für die Herstellung von HIV-reaktiven Antikörpern und Impfstoffen.

### Bildung von monoklonalen Antikörpern

60

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern kann durchgeführt werden, indem die Expression von Nukleinsäuresequenzen, welche Antikörper codiert, die für HIV spezifisch sind, immortalisiert werden, durch Einführung solcher Sequenzen, typischerweise cDNA, welche den Antikörper codieren, in einen Wirt welcher fähig ist, in einer Kultur kultiviert zu werden. Die immortalisierte Zelllinie kann eine Säugertierzelllinie sein, welche durch Oncogenese, Transvektion, Mutation oder dergleichen umgeformt worden ist. Solche Zellen umfassen Myelomlinien Lymphomlinien oder andere Zelllinien, welche fähig sind, die Ex-

65

pression und Sekretion des Antikörpers *in vitro* zu unterstützen. Der Antikörper kann ein natürlich vorkommendes Immunglobulin eines Säugetiers sein, welches durch Transformation eines Lymphocyten, insbesondere eines Splenocyten mittels eines Virus oder durch Fusion des Lymphocyten mit einer neoplastischen Zelle, z.B. einem Myelom, produziert worden ist, um eine Hybridzelllinie zu erhalten. Typischerweise wird der Splenocyt erhalten aus einem Tier, das gegen den HIV-Virus oder ein Fragment davon, welches eine epitopische Stelle enthält, immunisiert worden ist.

Die Immunisierungsprotokolle sind wohlbekannt und können beträchtlich variiert werden und bleiben dennoch wirksam. Vergleiche Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 2nd edition (1986), worauf ausdrücklich Bezug genommen wird. Zertrümmerte Viren, synthetische Peptide und bakterielle Fusionsproteine, die antigenische Fragmente von gp110- oder p25-Moleküle enthalten, können als Immunogene verwendet werden. Vorzugsweise wird das Immunogen des zertrümmerten Virus, des Peptides oder des rekombinanten Proteins an Proteinen oder Fragmenten davon, welche die Epitope, gegen welche die antikörper-produzierenden B-Zellen oder Splenocyten gewünscht werden, angereichert. Insbesondere Lösungen, die zertrümmerte Viruslysate oder Extrakte oder Überstände von biologisch exprimierten rekombinanten Proteinen oder zertrümmerten Expressionsvektoren enthalten, können mit Glykoproteinen angereichert werden, wobei gewünschtenfalls Reinigungsmethoden, wie beispielsweise die Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet werden. Die Lectinaffinitätsreinigung ist eine bevorzugte und übliche Methode für die Reinigung von gp110 und anderen Glykoproteinen, z.B. die Affinitätsreinigung unter Verwendung von Linsenlectin. Das Ausmass, in welchem die Glykoproteine aus den Lösungen für die Verwendung als Immunogen gereinigt werden, kann in einem weiteren Bereich variieren, z.B. von weniger als 50% wie gewöhnlich oder wie gewünscht mindestens 75 bis 95% und vorzugsweise 95 bis 99% bis zu absoluter Homogenität.

Sind einmal die Proteine im gewünschten Ausmass gereinigt, können sie in einem zweckmässigen physiologischen Träger suspendiert oder verdünnt werden für die Immunisierung oder sie können an ein Adjuvans gekoppelt werden. Eine bevorzugte Technik umfasst beispielsweise die Adsorption des Proteins und seine Fragmente an Linsenlectin-Agarose oder an andere makromolekulare Träger für die Injektion. Die Immunogene von antigenischen Präparaten, welche an HIV-Proteinen einschliesslich gp110-Glykoprotein und p25-Kernprotein oder antigenischen Teilen davon angereichert sind, werden injiziert im allgemeinen in Konzentration im Bereich von 1 µg bis 20 mg/kg des Wirts. Die Verabreichung kann durch Injektion, z.B. intramuskulär, peritoneal, subkutan, intravenös etc. erfolgen. Die Verabreichung kann ein oder mehrere Male durchgeführt werden, normalerweise in Intervallen von 1 bis 4 Wochen. Die immunisierten Tiere werden auf die Produktion des Antikörpers gegen das gewünschte Antigen getestet, dann wird die Milz entfernt und die B-Lymphocyten der Milz isoliert und mit einer Myelomzelllinie fusioniert oder transformiert. Die Transformation oder Fusion kann in üblicher Weise durchgeführt werden, die Fusionstechnik ist in einer grossen Anzahl von Patenten beschrieben, z.B. in den US-A 4 172 124, US-A 4 350 683, US-A 4 363 799, US-A 4 381 292 und US-A 4 423 147. Vergleiche ebenfalls Kennett et al., Monoclonal Antibodies (1980) und die darin angegebenen Referenzen, auf welche hier ausdrücklich Bezug genommen wird und Goding, supra.

Die immortalisierten Zelllinien können geklont werden und gemäss üblichen Techniken einem Screening unterworfen werden und die in den Zellüberständen nachgewiesenen Antikörper sind fähig, die gewünschten gp110 oder p25 viralen HIV-Proteine, rekombinante Fusionsproteine oder synthetische Peptide, welche die gewünschte epitopische Region enthalten, zu binden. Die zweckmässigen immortalisierten Zelllinien können dann *in vitro* gezüchtet werden oder in die Bauchhöhle eines zweckmässigen Wirts injiziert werden für die Herstellung von Ascites-Flüssigkeit. Durch den Besitz einiger erfindungsgemässer Antikörper, von welchen bekannt ist, dass sie spezifisch auf enthaltene Epitope sind, beispielsweise in den Regionen, welche durch die LAVBRU-genomische Region von bp6688 bis bp6750 codiert werden (codierendes Peptid 29) oder vom bp7246 bis bp7317 codiert werden (codierendes Peptid 36) (bp-Numerierung gemäss Wain-Hobson et al., Cell 44: 9, 1985, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird), können die Überstände in Konkurrenz mit den erfindungsgemässen monoklonalen Antikörpern in einem Konkurrenztest einem Screening unterworfen werden. Demnach können zusätzliche immortalisierte Hybridzelllinien mit den gewünschten Bindungscharakteristiken leicht auf Basis der Zugänglichkeit der vorliegenden Antikörper, welche für ein besonderes Antigen spezifisch sind aus einer Vielzahl von Quellen produziert werden. Alternativ können diese Zelllinien mit anderen neoplastischen B-Zellen fusioniert werden, falls andere solche B-Zellen als Präzipienten für genomische DNA dienen können, welche den Antikörper codieren.

Während neoplastische B-Zellen von Nagetieren, insbesondere von Mäusen bevorzugt sind, können andere Säugetierarten verwendet werden, wie beispielsweise Hasen, Rinder, Pferde, Schweine oder Vögel. Die Immunisierung von diesen Tieren kann leicht durchgeführt werden und ihre Lymphocyten, insbesondere Splenocyten können für Fusionen gewonnen werden.

Die durch die transformierten oder hybridisierten Zelllinien ausgeschiedenen monoklonalen Antikörper können von jeder Klasse oder Unterklasse von Immunglobulinen sein, wie IgM, IgD, IgA, IgG<sub>1-4</sub>, oder IgE. Da IgG den gewöhnlichsten Isotyp darstellt, welcher in diagnostischen Tests verwendet wird, wird dieser oft bevorzugt. Die monoklonalen Antikörper können intakt oder als Fragmente, wie als Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub> verwendet werden, jedoch üblicherweise intakt.

Zur Umgehung einer möglichen Antigenizität eines monoklonalen Antikörpers, welcher von einem vom Menschen verschiedenen Tier abgeleitet ist, in einem humanen Wirt, können chimerische Antikörper konstruiert werden, worin das Antigen-Bindungsfragment eines Immunoglobulinmoleküls (variable Region) mit einer Peptidbindung mindestens an einen Teil eines anderen Proteins gebunden ist, welches vom Menschen nicht als fremdes Protein erkannt wird, wie der ausgestossene Teil eines humanen Immunoglobulinmoleküls. Dies kann bewerkstelligt werden, indem die variable Region eines Exons eines Tieres mit der Kappa oder Gamma konstanten Region eines Exons eines Menschen fusioniert wird. Dem Fachmann sind verschiedene Techniken bekannt, wie diejenigen, welche im PCT 86/01 533, EP 17 1496 und EP 173 494 beschrieben sind, auf welche ausdrücklich Bezug genommen wird.

#### Pharmazeutische Formulierungen und Verwendung

Die erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper, welche eine neutralisierende Aktivität aufweisen, wie diejenigen, welche mit einer epitopischen Stelle auf gp110 oder p25 reagieren, können ebenfalls als Komponenten von pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Abschwächung von HIV-Infektionen verwendet werden. Die Zusammensetzungen sollten eine therapeutische oder prophylaktische Menge mindestens eines der erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper mit einem pharmazeutisch wirksamen Träger enthalten. Ein pharmazeutischer Träger sollte irgendeine kompatible, nicht-toxische Substanz sein, welche zweckmässig ist, um den monoklonalen Antikörper dem Patienten zu verabreichen. Steriles Wasser, Alkohol, Fette, Wachse und inerte Feststoffe können als Träger verwendet werden. Pharmazeutisch annehmbare Adjuvanzen (Pufferungsmittel, Dispergiermittel) können der pharmazeutischen Zusammensetzung ebenfalls zugesetzt werden. Solche Zusammensetzungen können einen einzelnen monoklonalen Antikörper enthalten, wie beispielsweise ein solcher, welcher spezifisch für die Stämme des HIV mit Hüllglykoproteinen ist, welche eine epitopische Stelle innerhalb einer Region, welche durch bp6688 bis bp6750 codiert wird, enthalten. Alternativ kann eine pharmazeutische Zusammensetzung einen oder mehrere monoklonale Antikörper zur Bildung eines «Cocktails» enthalten. Ein Cocktail, welches monoklonale Antikörper gegen verschiedene HIV-Stämme enthalten würde, wäre beispielsweise ein universelles Produkt mit therapeutischer oder prophylaktischer Aktivität gegen die grosse Mehrheit der klinischen HIV-Isolate. Das Cocktail kann monoklonale Antikörper enthalten, die Proteine oder Glykoproteine des HIV binden, welche verschieden von gp110 oder p25 sind, wie beispielsweise an das gp41-Glykoprotein oder die p34-Nuklease/Integrase. Das Molverhältnis der verschiedenen monoklonalen Antikörperkomponenten unterscheidet sich normalerweise nicht durch mehr als einen Faktor 10, üblicherweise durch nicht mehr als den Faktor 5 und normalerweise sind sie in einem Molverhältnis von 1:1-2 bezogen auf die anderen Antikörper-Komponenten vorhanden.

Die erfindungsgemässen Antikörper können als separat verabreichte Zusammensetzungen verwendet werden, welche im Zusammenspiel mit anderen anti-retroviralen Mitteln, beispielsweise Blockierungspeptiden verabreicht werden. Der geläufige Stand der Entwicklung der anti-retroviralen Mittel und der Anti-HIV-Mittel im besonderen ist in Mitsuya et al., Nature 325: 773-778, 1987 beschrieben, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird.

Die erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper, Peptide und pharmazeutischen Zusammensetzungen sind insbesondere nützlich für die orale oder parenterale Verabreichung. Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen parenteral verabreicht, d.h. subkutan, intramuskulär oder intravenös.

Demzufolge stellt die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen für die parenterale Verabreichung zur Verfügung, welche eine Lösung des monoklonalen Antikörpers, eines Peptides oder eines Cocktails davon, aufgelöst in einem zweckmässigen Träger, vorzugsweise in einem wässrigen Träger umfasst. Es kann eine Vielzahl von wässrigen Trägern verwendet werden, z.B. Wasser, gepuffertes Wasser, 0,4% Kochsalzlösung, 0,3% Glycin und dergleichen. Diese Lösungen sind steril und im allgemeinen frei von partikelförmigem Material. Diese Zusammensetzungen können durch übliche, wohlbekanntete Sterilisationstechniken sterilisiert werden. Die Zusammensetzungen können pharmazeutisch annehmbare Hilfssubstanzen enthalten, wie sie zur Erzielung von ungefähr physiologischen Bedingungen erforderlich sind, wie pH-Einstell- und Pufferungsmittel, Toxizitätseinstellungsmittel und dergleichen, wie beispielsweise Natriumacetat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Kalziumchlorid, Natriumlactat usw. Die Antikörperkonzentration dieser Formulierungen kann in einem weiten Bereich variieren. Beispielsweise von weniger als etwa 0,5%, üblicherweise bei oder bei mindestens etwa 1% bis zu 15 oder 20 Gew.-% und kann in erster Linie auf Basis des Flüssigkeitsvolumens, der Viskositäten usw. ausgewählt werden, welche vorzugsweise für die besondere Art der Verabreichung ausgewählt wird.

Demzufolge könnte eine typische pharmazeutische Zusammensetzung für die intramuskuläre Injektion bis zu 1 ml steriles gepuffertes Wasser und 50 mg monoklonaler Antikörper enthalten. Eine typische Zusammensetzung für die intravenöse Infusion kann 250 ml sterile Ringer-Lösung und 150 mg monoklonaler Antikörper enthalten. Gegenwärtige Verfahren für die Herstellung von parenteral verabreichbaren Zusammensetzungen sind bekannt oder für den Fachmann offensichtlich und sind in einzelnen beispielsweise in Remington's Pharmaceutical Science, 15. Auflage, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) beschrieben, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird.

Die erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper und erfindungsgemässen Peptide können für die

Lagerung lyophilisiert werden und vor dem Gebrauch in einem zweckmässigen Träger rekonstituiert werden. Diese Technik hat sich bei konventionellen Immunglobulinen als wirksam erwiesen und es können die auf dem Fachgebiet bekannten Lyophilisations- und Rekonstitutionstechniken verwendet werden. Es ist allgemein bekannt, dass die Lyophilisierung und Rekonstitution zu verschiedenen Graden von Antikörperaktivitätsverlust führen können (z.B. mit konventionellen Immunglobulinen, IgM-Antikörper neigen zu grösseren Aktivitätsverlusten, als IgG-Antikörper) und dass die eingesetzten Mengen entsprechend kompensiert werden müssen.

Die Zusammensetzungen, welche erfindungsgemässe monoklonale Antikörper, Peptide oder Cocktails davon enthalten, können für prophylaktische und/oder therapeutische Behandlungen von HIV-Infektionen verwendet werden. Bei der Anwendung in der Therapie werden die Zusammensetzungen in genügender Menge einem schon mit HIV infizierten Patienten verabreicht, um die Infektion und ihre Komplikationen zu kurieren oder mindestens teilweise zum Stillstand zu bringen. Eine zweckmässige Menge zur Erreichung dieses Zieles wird als «therapeutisch wirksame Dosis» definiert. Mengen, welche für diesen Zweck wirksam sind, hängen von der Ernsthaftigkeit der Infektion und dem allgemeinen Zustand des Immunsystems des Patienten ab, variieren jedoch im allgemeinen von 1 bis 200 mg Antikörper pro kg Körpergewicht mit Dosen von 5 bis 25 mg/kg, wobei Dosen von 5 bis 25 mg/kg üblicherweise zu verwenden sind. Es muss in Erinnerung behalten werden, dass erfindungsgemässe Materialien im allgemeinen bei ernsthaften Zuständen zu verwenden sind, d.h. bei lebensbedrohenden oder potentiell lebensbedrohenden Situationen. In solchen Fällen ist es möglich und kann vom behandelnden Arzt als wünschenswert erachtet werden, einen wesentlichen Überschuss dieser Antikörper zu verabreichen.

Bei prophylaktischen Anwendungen können Zusammensetzungen, welche die vorliegenden Peptide enthalten, Antikörper oder ein Cocktail davon einem Patienten verabreicht werden, welcher noch nicht durch HIV infiziert ist, welcher sich jedoch kurz vorher einem Risiko ausgesetzt hat oder angenommen werden muss, dass ein Risiko der Virus-Aussetzung bestand. Dadurch wird die Widerstandsfähigkeit des Patienten durch eine solche potentielle Infektion erhöht oder er wird gegen das Virus geimpft. Eine solche Menge wird als «prophylaktisch wirksame Dosis» bezeichnet. Bei dieser Verwendung hängen die genauen Mengen wiederum vom Gesundheitszustand des Patienten und von der allgemeinen Stufe der Immunität ab, variieren jedoch im allgemeinen von 0,1 bis 25 mg/kg, insbesondere 0,5 bis 2,5 mg/kg.

Einfache und mehrfache Verabreichungen der Zusammensetzungen können mit Dosismengen und nach Mustern gemäss Auswahl des behandelnden Arztes durchgeführt werden. In jedem Fall sollten die pharmazeutischen Formulierungen eine genügende Menge erfindungsgemässer Antikörper zur Verfügung stellen, um eine wirksame Behandlung des Patienten zu ermöglichen.

Zusätzlich können die erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper ebenfalls Verwendung als ziel-spezifisches Trägermolekül finden. Ein Antikörper kann ein Toxin gebunden werden, um ein Immunotoxin oder radioaktives Material oder ein Medikament zu bilden, welche radiopharmazeutische oder pharmazeutische Mittel darstellen. Verfahren zur Herstellung von Immunotoxinen und radiopharmazeutischen Mitteln sind bekannt (vgl. beispielsweise *Cancer Treatment Reports* 68:317 (1984)).

Es ist ebenfalls möglich, dass Heteroaggregate von monoklonalen, erfindungsgemässen Antikörpern und humanen T-Zellaktivatoren, wie monoklonalen Antikörpern gegen das CD3-Antigen oder gegen den Fc-Gammerezeptor von T-Zellen, können humanen T-Zellen oder Fc-Gamma-tragenden Zellen (wie K-Zellen oder Neutrophilen) die Fähigkeit verleihen, HIV-infizierte Zellen über antikörper-abhängige, zell-vermittelte Cytolyse (ADCC) abzutöten. Solche Heteroaggregate können beispielsweise durch kovalente Vernetzung der Anti-HIV-Antikörper mit Anti-CD3-Antikörpern zusammengefügt werden, wobei das Hetero-bifunktionelle Reagens N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)-propionat verwendet wird, wie durch Karpowsky et al., in *J. Exp. Med.* 160: 1686 (1984) beschrieben, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird.

Die erfindungsgemässen Peptidzusammensetzungen selbst können ebenfalls eine therapeutische Anwendung finden, wenn ihre Verabreichung zu einer Reduktion oder Eliminierung von HIV in einem infizierten Wirt führt. Diese Zusammensetzungen, wie das Peptid 29, die Blockierungspeptide und das Peptid 126 können in einem zweckmässigen physiologischen Träger intravenös, subkutan, intramuskulär, intraperitoneal usw. verabreicht werden. Das Peptid 126 ist in der US-Anmeldung SN 930 785 offenbart. Verschiedene Träger umfassen Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Kochsalzlösung, Wasser, Kaliumchlorid, Natriumlactat oder dergleichen. Die Konzentration der Peptide kann in weitem Bereich variieren, je nach ihrer Zielverwendung, Aktivität und Art der Verabreichung. Vorzugsweise weisen die Peptide einen amidierten COH-Terminus, einen formylierten NH<sub>2</sub>-Terminus oder andere pharmazeutisch annehmbare Abwandlungen auf. Die Zugabe von blockierenden Peptiden zu den Peptiden, welche eine neutralisierende HIV-Region nachahmen, oder zu den spezifisch reaktiven, erfindungsgemässen Antikörpern, führt zu einer erheblich erhöhten therapeutischen Wirksamkeit. Andere Anti-HIV-Mittel können ebenfalls in die Formulierungen einverleibt werden (andere als monoklonale Antikörper, welche die Peptide binden), wie 3'-Azido-3'-desoxythymidin, 2',3'-Didesoxycytidin, 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrocytidin usw.

Verwendung von monoklonalen Antikörpern bei der Immunoaffinitätsreinigung

Monoklonale Antikörper, welche für Polypeptide, welche gp119 enthalten oder antigenische Determinanten spezifisch sind, insbesondere diejenigen antigenischen Determinanten, welche von biologisch exprimierten, rekombinanten Fusionsproteinen, Lysaten oder Extrakten von kultivierten HIV erhalten werden, sind besonders vorteilhaft für die Verwendung bei Reinigungsverfahren. Im allgemeinen besitzen die Antikörper Affinitätsvereinigungskonstanten in der Grössenordnung von  $10^8$  bis  $10^{12}$  M. Solche Antikörper können zur Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen aus dem Kulturmedium des rekombinanten Expressionssystems verwendet werden, wenn das exprimierte Protein ausgeschieden wurde, oder von Komponenten von zertrümmerten, biologischen Expressionssystemen, wenn das exprimierte Protein nicht sekretiert wurde. Im allgemeinen sind die monoklonalen Antikörper, welche fähig sind, mit gp110 oder anderen antigenischen Determinanten zu reagieren, an Substrate oder Träger gebunden oder immobilisiert. Die Lösung, welche die antigenischen HIV-Determinanten enthält, wird dann mit dem immobilisierten Antikörper unter Bedingungen, welche zweckmässig sind, für die Bildung des Immunkomplexes zwischen dem Antikörper und den Polypeptiden, welche die antigenischen Determinanten von gp110 enthalten, in Kontakt gebracht. Nicht-gebundenes Material wird von den gebundenen Immunkomplexen abgetrennt, wobei Komplexe oder antigenische gp110-Fragmente vom Träger abgetrennt werden.

Typischerweise werden die monoklonalen Antikörper einer Grobreinigung von Ascites-Flüssigkeit oder Kulturüberständen unterworfen, bevor sie an den Träger gebunden werden. Solche Verfahren sind dem Fachmann wohlbekannt und können eine Fraktionierung mit neutralen Salzen bei hoher Konzentration umfassen. Andere Methoden, wie die DEAE-Chromatographie, Gelfiltrationschromatographie, präparative Gelelektrophorese oder Affinitätschromatographie mit Protein A-Affinitätschromatographie, können ebenfalls zur Reinigung der monoklonalen Antikörper vor ihrer Verwendung als Immunoadsorbens verwendet werden.

Die Träger, mit welchen die monoklonalen Antikörper immobilisiert werden, sollten folgende allgemeine Charakteristiken haben: a) schwache Wechselwirkungen mit Proteinen, im allgemeinen, um nicht-spezifische Bindungen zu minimalisieren, b) gute Fließcharakteristika, welche den Fluss durch ein Material von hohem Molekulargewicht erlauben, c) der Träger sollte chemische Gruppen besitzen, welche aktiviert oder modifiziert werden können, um chemische Bindungen mit dem monoklonalen Antikörper zu ermöglichen, d) physikalische und chemische Stabilität unter den Bedingungen für die Bindung des monoklonalen Antikörpers und e) Stabilität gegenüber den Bedingungen und Bestandteilen des Puffers, welcher für die Adsorption und Elution des Antigens erforderlich ist. Einige allgemein verwendete Träger sind Agarose, derivierte Polystyrole, Polysaccharide, Polyacrylamidkügelchen, aktivierte Cellulose, Glas und dergleichen. Es existieren verschiedene chemische Verfahren für die Bindung von Antikörpern an Substrate. Vergleiche im allgemeinen, Cuatrecasas, P., *Advances in Enzymology* 36: 29 (1972). Die erfindungsgemässen Antikörper können direkt an den Träger oder alternativ über einen «Linker» oder Distanzarm verbunden werden.

Die allgemeinen Bedingungen, die für die Immobilisierung von monoklonalen Antikörpern als Chromatographieträger erforderlich sind, sind im Fachgebiet bekannt. Siehe beispielsweise Tijssen, P., 1985, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*, auf welche Publikation ausdrücklich Bezug genommen wird. Moderne Kupplungsverfahren sind geringfügig von den Charakteristiken und dem Typ des zu kupplenden Antikörpers abhängig. Monoklonale Antikörper besitzen Charakteristiken, welche im allgemeinen von Batch zu Batch konstant sind, wobei es möglich ist, die Bedingungen zu optimieren. Die Bindung erfolgt typischerweise durch kovalente Bindungen.

Eine Suspension von Extrakten oder Lysaten des HIV-Virus des Überstandes eines kultivierten biologischen Expressionssystems oder einer Suspension von zertrümmerten Zellen wird dann zur Trennungsmatrix gegeben. Die Mischung wird unter Bedingungen und genügend Zeit für die Bildung des Immunkomplexes inkubiert, wobei üblicherweise mindestens 30 Min. und in der Regel 2 bis 24 Std. erforderlich sind. Die Immunkomplexe, welche die Polypeptide mit den antigenischen Teilen von gp110 aufweisen, werden dann von der Mischung abgetrennt. Typischerweise wird die Mischung entfernt, z.B. durch Elution und die gebundenen Immunkomplexe werden gründlich Adsorptionspuffer gewaschen. Die Immunkomplexe können dann von der Trennungsmatrix ausgewaschen werden, wobei ein Elutionsmittel eingesetzt wird, welches mit den verwendeten Trägern verträglich ist; die Elutionsmittel sind dem Fachmann wohlbekannt. Es können ebenfalls die Polypeptide, welche die gp110 oder andere antigenische Teile enthalten, selektiv entfernt werden. Beispielsweise können Peptide, welche ein Epitop enthalten, das durch die Antikörper erkannt wird, in Konkurrenz zum Antikörper-Bindungszentrum verwendet werden, was eine alternative Elutionstechnik darstellt, welche unter milden Elutionsbedingungen durchgeführt werden kann. Die selektiv adsorbierten Polypeptide, welche das gp110-Antigen enthalten, können von Antikörperaffinitätsadsorbens durch Änderung des pH-Wertes und/oder der Ionenstärke des Puffers eluiert werden. Chaotrope Mittel können ebenfalls Verwendung bei der Entfernung der gebundenen Antigene finden. Die Auswahl des chaotropen Mittels, seine Konzentration und andere Elutionsbedingungen sind von den Charakteristiken der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung abhängig, wenn sie jedoch einmal bestimmt sind, müssen sie keinen Änderungen unterworfen werden, wie sie üblicherweise bei polyklonalen Affinitätstrennsystemen erforderlich sind.

Das eluierte Material kann eine Einstellung auf einem physiologischen pH-Wert erfordern, wenn Puffer von niederem oder hohem pH-Wert oder Ionenstärke zur Abtrennung der gebundenen gp110-Antigene von der Trennungsmatrix verwendet werden. Es kann eine Dialyse oder Gelfiltrationschromatographie erforderlich sein, um überschüssige Salze in dem Elutionsmittel zu entfernen, um eine Rekonstitution des gp110 oder der polypeptid-enhaltenden antigenischen Fragmente von gp110 in ihre natürliche Struktur zu ermöglichen.

gp110 oder polypeptid-enhaltende antigenische Fragmente davon können in wesentlich reiner Form entweder natürlich durch infizierte Zellkulturen oder durch rekombinante Expressionssysteme von Bakterien, Hefen oder kultivierten Insekten- oder Säugetierzellen produziert werden. gp110 und Fragmente oder andere gereinigte Proteine können typischerweise eine Reinheit von mehr als 50% aufweisen, meistens mindestens 75% und am häufigsten zwischen 95 und 99%. Diese Moleküle finden anschliessend Anwendung in einem weiten Bereich.

Die HIV-gp110-Proteine, Polypeptide, welche antigenische Fragmente davon enthalten oder andere Proteine, können in einem weiten Bereich Anwendung finden, einschliesslich in AIDS-Untereinheitimpfstoff-Formulierungen, worin das Immunogen eine effektive Dosis einer antigenischen Determinante, wie beispielsweise gp110 oder eine neutralisierende Region davon, enthält. Andere Komponenten für Formulierungen können diese antigenischen Teile von HIV-Proteinen oder Glykoproteinen enthalten, welche die Produktion von Antikörpern (vorzugsweise neutralisierenden Antikörpern) in einem immunisierten Wirt bewirken, wobei die Antikörper fähig sind, gegen eine anschliessende Infektion durch HIV zu schützen.

#### Diagnostische Verwendungen der monoklonalen Antikörper

Die erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper sind nützlich für diagnostische Zwecke. Für diese Zwecke können sie entweder markiert oder unmarkiert sein. Typischerweise haben diagnostische Tests den Nachweis der Bildung eines Komplexes durch Bindung des monoklonalen Antikörpers an das HIV-Antigen zur Folge. In unmarkiertem Zustand finden die Antikörper beispielsweise in Agglutinationstests Verwendung. Zusätzlich können die unmarkierten Antikörper in Kombination mit anderen markierten Antikörpern (zweite Antikörper), welche mit den monoklonalen Antikörpern, wie Antikörper, welche für Immunoglobulin spezifisch sind, verwendet werden. Alternativ können die monoklonalen Antikörper direkt markiert werden. Es kann eine Vielzahl von Labels verwendet werden, wie beispielsweise Radionuklide, Fluorescer, Enzyme, Enzymsubstrate, Enzymkofaktoren, Enzyminhibitoren, Liganden (insbesondere Haptene) usw. Es sind zahlreiche Typen von Immunoassays zugänglich und beispielsweise sind einige beschrieben in den US-Patenten der Nummern 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, auf welche Patentschriften ausdrücklich Bezug genommen wird.

Gewöhnlich werden die erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper und Peptide in Enzymimmunoassays verwendet, worin beispielsweise die Hauptantikörper oder die zweiten Antikörper von verschiedener Art mit einem Enzym konjugiert sind. Wenn eine biologische Probe, welche HIV-Antigene enthält, wie humanes Blutserum, Speichel, Samen, vaginale Sekrete oder viral infizierte Zellkultursuspensionen mit den erfindungsgemässen Antikörpern kombiniert wird, erfolgt eine Bindung zwischen den Antikörpern und denjenigen Molekülen, welche das gewünschte Epitop aufweisen. Solche Proteine oder virale Partikel können dann von den ungebundenen Reagenzien abgetrennt werden, und es kann ein zweiter Antikörper (enzymmarkiert) zugegeben werden. Anschliessend wird die Gegenwart des Antikörper-Enzymkonjugates, das spezifisch an das Antigen gebunden ist, bestimmt. Andere konventionelle Techniken, welche dem Fachmann bekannt sind, können ebenfalls verwendet werden.

Es können ebenfalls Ausrüstungen zur Verfügung gestellt werden für die Verwendung der erfindungsgemässen Antikörper für den Nachweis von HIV-Infektionen oder der Gegenwart von HIV-Antigenen. Es werden demzufolge erfindungsgemässe Antikörperzusammensetzungen zur Verfügung gestellt, normalerweise in lyophilisierter Form, die entweder allein oder in Konjugation mit Antikörpern, die spezifisch für andere Epitope von HIV sind, vorliegen. Die Antikörper, welche mit einem Label konjugiert oder unkonjugiert sein können, sind in den Ausrüstungen zusammen mit Puffern, wie Tris, Phosphat oder Carbonat, Stabilisatoren, Bioziden, inerten Proteinen, wie bovinem Serumalbumin oder ähnlichem, vorhanden. Im allgemeinen sind diese Materialien in einem Anteil von weniger als 5 Gew.-% auf Basis des aktiven Antikörpers vorhanden und üblicherweise in einem totalen Anteil von mindestens etwa 0,001 Gew.-% auf Basis der Antikörper-Konzentration vorhanden. Häufig ist es erwünscht, ein inertes Streckmittel oder einen Exzipienten zur Verdünnung der Wirkstoffe zuzusetzen, wobei der Exzipient in einem Anteil von 1–99 Gew.-% der gesamten Zusammensetzung vorhanden sein kann. Falls ein zweiter Antikörper verwendet wird, welcher fähig ist, den monoklonalen Antikörper zu binden, ist dieser üblicherweise in einer separaten Ampulle vorhanden. Der zweite Antikörper ist typischerweise mit einem Label konjugiert und in analoger Weise formuliert, wie die oben beschriebenen Antikörper-Formulierungen. Der Nachweis von gp110- oder p25-Antigenen oder des gesamten Virus in verschiedenen biologischen Proben, kann Anwendung finden bei der Diagnose einer laufenden Infektion durch das HIV-Virus. Biologische Proben können beispielsweise Blutserum, Speichel, Samen, Gewebebiopsieproben (Hirn, Haut, Lymphknoten, Milz usw.), Überstände von Zellkulturen, zertrümmerte, eukaryontische und bakterielle Expressionssysteme und dergleichen. Die Gegenwart des Virus wird getestet, indem der mo-

noklonale Antikörper mit der biologischen Probe unter Bedingungen für die Immunkomplexbildung inkubiert wird und anschliessend die Komplexbildung nachgewiesen wird. In einer Ausführungsform wird die Komplexbildung durch Verwendung eines zweiten Antikörpers nachgewiesen, welcher fähig ist, den monoklonalen Antikörper zu binden, welcher typischerweise mit einem Label konjugiert und in analoger Weise, wie die oben beschriebenen Antikörperformulierungen, formuliert ist. In einer weiteren Ausführungsform ist der monoklonale Antikörper an einen Festphasenträger gebunden, welcher dann mit der biologischen Probe in Kontakt gebracht wird. Im Anschluss an den Inkubationsschritt wird ein markierter, monoklonaler Antikörper zum Nachweis des gebundenen Antigens zugegeben.

#### 10 Herstellung und Verwendung von synthetischen Peptiden

Die vorliegende Erfindung stellt neue Peptide zur Verfügung, welche unter anderem immunologisch gemischte Proteinepitope sind, welche durch das HIV-Retrovirus codiert werden, insbesondere Epitope, welche innerhalb der *env*- oder *gag*-Regionen des viralischen Genoms codiert werden, welches die gp110 bzw. p25 codiert. Zur Stamm-zu-Stamm-Variantenakkomodation unter verschiedenen Isolaten können Einstellungen für konservative Substitutionen und Selektionen unter den Alternativen, worin nicht-konservative Substitutionen involviert sind, gemacht werden. Diese Peptide können als Immunogene um *in vitro* oder *in vivo* die HIV-Antigenproduktion zu hemmen oder zu eliminieren, für den Nachweis des Virus oder vom Antikörper zum Virus in einer physiologischen Probe verwendet werden. Je nach der Natur der Versuchsanordnung können die Peptide zu einem Träger oder zu anderen Verbindungen konjugiert, markiert oder unmarkiert oder an eine feste Oberfläche gebunden sein.

In einer Ausführungsform können die Peptide, welche von Interesse sind, von der gp110-Region des Virus abgeleitet werden. Von besonderem Interesse ist die Region, worin sich der offene *env*-Leserahmen von etwa Basenpaar (bp) 6688 bis etwa bp 6750 ausdehnt und von etwa bp7247 bis etwa 7317.

Die Peptide von Interesse, einschliesslich die blockierenden Peptide schliessen mindestens fünf, manchmal sechs, manchmal acht, manchmal zwölf, manchmal 21 und üblicherweise weniger als 50 und am üblichsten weniger als 35 und bevorzugt weniger als 25 Aminosäuren ein, innerhalb einer Sequenz, welche dafür durch ein HIV-Retrovirus codiert wird. Es ist erwünscht, dass das Peptid so klein wie möglich ist und immer noch die gesamte Immunoreaktivität oder die anti-virale Aktivität des grösseren Peptides aufweist. In einigen Fällen ist es wünschenswert zwei oder mehr Oligopeptide zuzusetzen, welche nicht überlappend sind, um eine einzige Peptidstruktur zu bilden oder um sie als individuelle Peptide gleichzeitig zu verwenden, wobei sie separat oder zusammen eine äquivalente Empfindlichkeit bewirken, wie das ursprüngliche Peptid.

Die Peptide können durch Einführung von konservativen oder nicht-konservativen Substitutionen im Peptid modifiziert werden, üblicherweise sind weniger als 20 Nummern-Prozent und in der Regel weniger als 10 Nummern-Prozent der Aminosäuren unverändert. In diesen Situationen, worin sich Regionen als polymorph herausstellten, ist es wünschenswert, eine oder mehrere besondere Aminosäuren zu variieren, um eine wirksamere Nachahmung der unterschiedlichen Epitope der verschiedenen retro-viralen Stämme zu erreichen. In vielen Fällen kann zur Erzielung von chemischer Stabilität des Methionin durch Norleucin (Nor) ersetzt werden.

Es wird darauf hingewiesen, dass das Peptid, welches den Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellt, nicht identisch mit einer besonderen HIV-Polypeptidsequenz sein muss, solange die erfindungsgemässe Verbindung fähig ist, eine immunologische Konkurrenz mit Proteinen einzugehen, wovon mindestens eines vom Stamm des HIV-Retrovirus ist. Demzufolge können im erfindungsgemässen Peptid zahlreiche Änderungen vorgenommen werden, wie Insertionen, Deletionen und Substitutionen, entweder konservative oder nicht-konservative, worin solche Änderungen bei der Verwendung gewisse Vorteile bringen können. Unter konservativen Substitutionen werden Substitutionen innerhalb beispielsweise der nachstehenden Gruppen verstanden: gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; phe, tyr; und nor, met. Üblicherweise unterscheidet sich die Sequenz durch nicht mehr als 20% von der Sequenz mindestens eines HIV-Retrovirusstammes, mit der Ausnahme, wo zusätzliche Aminosäuren an einem der Termini angesetzt werden, um einen «Arm» zur Verfügung zu stellen, durch welchen das erfindungsgemässe Peptid in konventioneller Weise immobilisiert werden kann. Die Arme bestehen normalerweise aus mindestens einer Aminosäure und können bis zu 50 oder mehr Aminosäuren umfassen, meistens weisen sie jedoch die Länge von 1 bis 10 Aminosäuren auf.

Die Peptide, worin die Aminosäuresequenz durch Substitution, Addition oder Deletion von Aminosäureresten modifiziert wird, sollte im wesentlichen die gesamte Immunoreaktivität oder antivirale Aktivität des unmodifizierten Peptides aufweisen, was durch verschiedene Assay-Techniken, welche hier offenbart sind, in konventioneller Weise gemessen werden kann. Die *d*-Isomerform einer oder mehrerer Aminosäuren kann gewünschtenfalls verwendet werden, um biologische Eigenschaften zu modifizieren, wie beispielsweise die Aktivität oder den Grad des Abbaus.

Zusätzlich können eine, zwei oder drei Aminosäuren an die Termini eines Oligopeptides oder Peptides angefügt werden, damit die Peptide miteinander leichter verbunden werden können zur Kupplung an einen Träger oder ein grösseres Peptid, aus Gründen, welche nachstehend diskutiert werden, für die Änderung von physikalischen oder chemischen Eigenschaften des Peptides oder Oligopeptides oder dergleichen.

Aminosäuren, wie Tyrosin, Cystein, Lysin, Glutamin- oder Asparaginsäure oder dergleichen, können am C- oder N-Terminus des Peptides oder Oligopeptides gekoppelt werden, um eine nützliche Funktionalität für eine Verbindung zur Verfügung zu stellen. Cystein wird besonders bevorzugt, um die kovalente Kupplung mit anderen Peptiden zu erleichtern, oder zur Bildung von Polymeren durch Oxidation.

5 Zusätzlich können die Peptid- oder Oligopeptidsequenzen von der natürlichen Sequenz verschieden sein, indem die Sequenz durch terminale NH<sub>2</sub>-Acylierung, beispielsweise durch Acetylierung oder Thio- glykolsäureamidierung, terminale Carboxyamidierung, z.B. mit Ammoniak oder Methylamin, zur Verlei- hung von Stabilität, erhöhte Hydrophobie für die Verbindung oder die Bindung an einen Träger oder an ein anderes Molekül oder für die Polymerisation modifiziert werden.

10 Wenn beispielsweise in den oben offenbarten Peptiden I-VIII und IX-XV Y oder Y' vorhanden sind, ist eine bevorzugte Ausführungsform vorhanden, wenn Y oder Y' einen oder mehrere Cysteinreste oder eine Kombination eines oder mehrerer Cysteinreste mit Spacer-Aminosäuren enthalten. Glycin ist ein besonders bevorzugter Spacer. Bevorzugte Peptide für die Verwendung bei der oxidativen Polyme- risation, sind diejenigen, worin Y oder Y' mindestens zwei Cysteinreste bedeuten. Wenn zwei Cystein- reste am gleichen Ende des Peptides vorhanden sind, existiert eine bevorzugte Ausführungsform, wenn die Cysteinreste voneinander durch einen bis drei Spacer-Aminosäurereste, vorzugsweise Glycin, ge- trennt sind. Die Gegenwart von Cysteinresten kann die Bildung von Dimeren des Peptides ermöglichen und/oder die Hydrophobie des resultierenden Peptides erhöhen, was die Immobilisierung des Peptides in fester Phase oder immobilisierten Assay-Systemen ermöglicht.

20 Von besonderem Interesse ist die Verwendung der Mercaptangruppe von Cysteinen oder Thioglykol- säuren, welche für die Acylierung von terminalen Aminogruppen oder dergleichen verwendet werden, für die Verbindung von zwei Peptiden, Oligopeptiden oder Kombinationen davon, durch eine Disulfidbin- dung oder eine längere Bindung zur Bildung von Polymeren, welche eine Anzahl von Epitopen enthalten. Solche Polymere besitzen den Vorteil einer verbesserten, immunologischen Reaktion. Falls verschiede- ne Peptide für die Zusammensetzung des Polymers verwendet werden, besitzen sie die zusätzliche Fä- higkeit, Antikörper zu induzieren, die mit verschiedenen antigenischen Determinanten von verschiede- nen HIV-Isolaten eine Immunoreaktion eingehen.

25 Zur Herstellung von antigenischen Polymeren (synthetischen Multimeren) können Verbindungen ver- wendet werden, welche bis-Halogenacetylgruppen, Nitroarylhalogenide oder dergleichen besitzen, falls die Reagenzien spezifisch mit Thiogruppen reagieren. Die Bindung zwischen den zwei Mercaptogruppen von verschiedenen Peptiden oder Oligopeptiden kann demzufolge eine einfache Bindung oder eine Bin- dungsgruppe von mindestens zwei, üblicherweise mindestens vier und nicht mehr als sechzehn, norma- lerweise nicht mehr als vierzehn Kohlenstoffatomen sein.

30 Die erfindungsgemässen Peptide können an einen löslichen Macro-molekularen (z.B. von nicht mehr als 5 kDal) Träger gebunden sein. Üblicherweise kann der Träger eine Poly(aminosäure), natürlichen oder synthetischen Ursprungs, sein, welchen Antikörper in humanem Serum höchstwahrscheinlich nicht ausgesetzt sind. Beispiele von solchen Trägern sind Poly-L-Lysin, Schlüssellochketten-Hemocyanin, Thyroglobulin, Albumine, wie bovines Serumalbumin, Tetanustoxoid, usw. Die Auswahl des Trägers ist in erster Linie von der beabsichtigten Verwendung des Antigens und ebenfalls von der Bequemlichkeit und Erhältlichkeit abhängig.

40 Bei solchen Konjugaten ist mindestens ein Molekül von mindestens einem erfindungsgemässen Peptid pro Macromolekül vorhanden und nicht mehr als etwa 1 pro 0,5 kDal, normalerweise nicht mehr als 1 pro 2 kDal des Macromoleküls vorhanden. Ein oder mehrere verschiedene Peptide können an das gleiche Macromolekül gebunden sein.

45 Die Art der Bindung ist konventionell; dabei werden Reagenzien, wie p-Maleinimidobenzoesäure, p- Methylthiobenzoesäure, Apfelsäureanhydrid, Bernsteinsäureanhydrid, Glutarsäureanhydrid usw. verwendet. Die Verbindung kann am N-, am C-Terminus oder an einer Stelle innerhalb des Moleküls er- folgen. Die erfindungsgemässen Peptide können durch Verbindung deriviert werden, können verbun- den werden, während sie an einen Träger gebunden sind oder dergleichen.

50 Dem Fachmann sind verschiedene Versuchsanordnungen geläufig, welche zu dem Nachweis der Ge- genwart von Antikörpern gegen retrovirale Proteine oder für retrovirale Proteine selbst verwendet werden können. Von besonderem Interesse ist die Verwendung des Peptides als markiertes Reagenz, wobei das Markierungsmittel als nachweisbares Signal dient oder die direkte oder indirekte Bindung des Peptides an eine Oberfläche, wobei der Antikörper zum Peptid in der Probe durch das Peptid an die Oberfläche gebunden wird. Die Gegenwart von humanen Antikörpern, welche an das Peptid gebunden sind, kann durch Verwendung eines xenogenen Antikörpers, welcher für humane Immunoglobuline spezi- fisch ist, normalerweise IgM und IgG oder durch ein markiertes Protein, welches spezifisch auf Immuno- komplexe ist, z.B. den Rf-Faktor von *S. aureus*-Protein A nachgewiesen werden.

60 Illustrativ für eine Assay-Technik ist die Verwendung eines Probenbehälters, z.B. die Löcher von Mi- krolochplatten, worin das erfindungsgemässe Polypeptid oder Konjugate davon auf dem Behälterboden und/oder an den Wänden entweder kovalent oder nicht-kovalent gebunden sind. Die Probe, normaler- weise menschliches Blut oder Serum, das durch zweckmässig gepuffertes Medium verdünnt ist, wird in den Behälter gegeben und während genügender Zeit zur Komplexbildung zwischen den Polypeptiden und irgendwelchen verwandten Antikörpern in der Probe stengelassen. Der Überstand wird entfernt und der Behälter gewaschen, um nicht spezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Ein markiertes spezifi-

5 sches Bindungsprotein, welches spezifisch an den Komplex gebunden wird, wie ein xenogenes Antiserum gegen humanes Immunglobulin, wird für den Nachweis verwendet. Das Peptid kann auf verschiedene Weisen hergestellt werden. Wegen seiner verhältnismässig kurzen Grösse, kann das Peptid in einer Lösung oder auf einem festen Träger nach üblichen Herstellungsverfahren synthetisiert werden. Heute sind im Handel verschiedene automatische Synthesegeräte erhältlich und können gemäss bekannten Versuchsanordnungen verwendet werden. Vergleiche z.B. Stewart und Young, Solid Phase Peptid Synthesis, 2. Auflage, Pierce Chemical Co., 1984; und Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1983) 105: 6442.

10 Alternativ kann eine Hybrid-DNA-Technologie verwendet werden, wenn ein synthetisches Gen unter Verwendung von einzelnen Strängen, welche das Polypeptid oder im wesentlichen komplementäre Stränge dazu synthetisieren, verwendet werden, falls die einzelnen Stränge überlappen und diese in einem getemperten Medium zur Hybridisierung vereinigt werden können. Die hybridisierten Stränge können dann zur Bildung des vollständigen Gens vereinigt werden und durch Wahl von zweckmässigen Termini kann das Gen in Expressionsvektoren, welche heutzutage leicht erhältlich sind, inseriert werden. Vergleiche beispielsweise Maniatis et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, CSH, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. Oder die Region des viralen Genoms, welche das Peptid codiert, kann durch konventionelle rekombinante DNA-Techniken geklont und exprimiert werden (vgl. Maniatis, supra).

15 DNA-codierende Sequenzen von LAV<sub>BRU</sub> und ARV2 von HIV-Isolaten, welche für die Exprimierung der Peptide verwendet werden können, umfassen folgende:

20	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
		GTT	ACA	ATA	GGA	AAA	ATA	GGA	AAT	ATG	AGA	CAA
		GCA	CAT	TGT								
25	ARV-2	TGT	ACA	AGA	CCC	AAC	AAC	AAT	ACA	AGA	AAA	AGT
		ATC	TAT	ATA	GGA	CCA	GGG	AGA	GLA	TTT	CAT	ACA
		ACA	GGA	AGA	ATA	ATA	GGA	GAT	ATA	AGA	AAA	GCA
30		CAT	TGT									

35 Sequenzfragmente können für die Expression von Peptid-Fragmenten verwendet werden, wobei konservative Basenänderungen durchgeführt werden können, wenn die modifizierten Codons die gleichen Aminosäuren codieren oder dabei können auch nicht-konservative Änderungen in der Codierungssequenz gemacht werden, wenn die resultierende Aminosäure eine konservative oder nicht-konservative Änderung in der Aminosäuresequenz darstellt, wie vorher diskutiert. Die codierende Sequenz kann entweder auf dem 5'- oder 3'-Terminus verlängert werden oder das Peptid kann an beiden Enden verlängert werden, wobei seine epitopischen Zentren erhalten bleiben. Die Verlängerung kann als Arm für eine Verbindung dienen, beispielsweise für ein Label, wie ein Enzym für die Verbindung von zwei oder allen Peptiden zusammen in der gleichen Kette zur Verleihung von antigenischer Aktivität, üblichen Restriktionsstellen für die Klonierung oder dergleichen. Die DNA-Sequenz selbst, Fragmente davon oder grössere Sequenzen mit üblicherweise mindestens 15 Basen, vorzugsweise mindestens 18 Basen, können als Nukleotidsonden für den Nachweis von retroviralen RNA oder proviralen DNA oder für die Identifikation von homologen Regionen für die Clonierung oder die Sequenzierung verwendet werden. Es sind zahlreiche Techniken beschrieben worden, wie beispielsweise die Grunstein-Hogness-Technik, die Southern-Technik, die Northern-Technik, das Dot-Blot und Verbesserung davon, wie andere Methoden, wie sie in der US-A 4 358 535 beschrieben sind, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird.

50 Die erfindungsgemässen Peptide, einschliesslich die Blockierungspeptide und ihre Analogen finden selbst oder in Kombination Verwendung in Impfstoffen. In ähnlicher Weise können ebenfalls Anti-Idiotyp-Antikörper, d.h. reaktive Antikörper, welche mit den Idiotypen des Antikörpers der vorliegenden Erfindung reaktiv sind und dabei Epitope enthalten, welche die neutralisierenden Regionen des HIV nachahmen, in Impfstoffen verwendet werden. Die Peptide oder die Anti-Idiotyp-Antikörper können ebenfalls in konventioneller Weise formuliert werden, im allgemeinen in Konzentrationen im Bereich von 55 1 g bis 20 mg/kg des Wirts. Es können physiologisch annehmbare Medien als Träger verwendet werden, wie steriles Wasser, Kochsalzlösung, phosphat-gepufferte Kochsalzlösung und dergleichen. Es können Adjuvanzen verwendet werden, wie Aluminiumhydroxygel, oberflächen-aktive Substanzen, wie Lysolecithin, Pluronpolyole, Polyanione, Peptide, Proteine (z.B. Diphtherie oder Choleratoxide) und Ölemulsionen. Die Peptide können ebenfalls in Liposome einverleibt werden oder mit Polysacchariden, Polypeptiden oder Polymeren für die Verwendung in Impfstoffformulierungen konjugiert werden. Sie können durch Injektion, z.B. durch intramuskuläre, peritoneale, subkutane, intravenöse usw. verabreicht werden. Die Verabreichung einer immunogenisch wirksamen Dosis kann auf einmal oder durch mehrere Male, üblicherweise mit Intervallen von 1 bis 4 Wochen, erfolgen. Eine «immunogenisch» wirksame Dosis ist diejenige Menge eines Impfstoffes, welche zweckmässig ist, um eine Immunantwort in einem Wirt her- 60 vorzurufen, wobei der Wirt eine zunehmende Infektion zeigt.

Andere Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung gehen aus den folgenden Versuchsbeispielen hervor, welche die Erfindung mittels Beispielen beschreiben. Die Beispiele dienen der Erläuterung und nicht der Einschränkung der Erfindung.

## 5 Beispiel I

### Bildung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern

10 Beispiel I beschreibt die Bildung von hybriden Zelllinien, die monoklonale Antikörper produzieren, die spezifisch auf Hüllglykoproteine von HIV sind. Dieses Verfahren schliesst die Verwendung von lectin-  
gereinigten Extrakten von LAV<sub>BURU</sub> ein, welche am Linsenlectin-Agarose als Immunogen gebunden sind. Die monoklonalen Antikörper, die anschliessend durch hybride Zelllinien gebildet werden, werden durch  
15 ihre Fähigkeit von gp110 aus gereinigtem LAV und als biologisch exprimiertes rekombinantes Fusionsprotein Immunoblots und Radioimmunopräzipitate zu bilden. Die monoklonalen Antikörper, welche an Epitope  
an gp110 gebunden werden, sind ebenfalls in ELISAs mit gesamten zertrümmerten Viren, Fusionsproteinen und synthetischen Peptiden reaktiv und reagieren mit dem ganzen Virus in indirekten Fluoreszenz-  
Assays.

Die Arbeitsvorschriften für die Bildung von hybriden Zelllinien, welche monoklonale Antikörper produzieren und die Charakterisierung der Antikörper sind folgendermassen:

20 Gereinigter LAV-Virus aus infizierten CEM-Zellen (ATCC-Nr. CRL8904) wurden in 50 mM Tris, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 1,0% Aprotinin, 2,0% Nonidet p-40® (NP-40) (Octylphenoxypolyethoxyethanol) zertrümmert. Der Extrakt wurde zweimal durch Zentrifugation geklärt und auf 0,5 NP-40 durch Zugabe von  
3 Volumenteil Zentrümmerungspuffer ohne NP-40. Linsenlectinsepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.) wurde in Zentrümmerungspuffer ohne NP-40 vorgewaschen und dann in Adsorptionspuffer  
25 (50 mM Tris, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 1,0% Aprotinin, 0,5% NP-40) equilibriert. Der geklärte, virale Extrakt wurde mit Linsenlectinsepharose während 42 Std. bei 4°C adsorbiert. Das unadsorbierte Material wurde entfernt, indem mit einem Überschuss an Adsorptionspuffer gewaschen wurde. Die Elution des adsorbierten Materials wurde in 0,2 M Alphamethylmannosid in Adsorptionspuffer durchgeführt. Das Eluat wurde gegen PBS dialysiert, um den Zucker zu entfernen, und das Material wurde an die Linsenlectinsepharose readsorbiert.

30 Der Glykoprotein-Linsenlectinsepharose-Komplex wurde zur Immunisierung von BALB/c-Mäusen verwendet, indem drei intraperitoneale Injektionen ohne Adjuvantien im Abstand von zwei bis drei Wochen verabreicht wurden. Die Milzzellen wurden von den immunisierten Mäusen entfernt, wobei der zirkulierende Antikörper gegen die Glykoproteine des HIV durch Immunoblot, RIP und/oder ELISA nachgewiesen wurden.

Die für die Bildung der Zelllinien verwendeten Arbeitsvorschriften waren im wesentlichen diejenigen von Köhler und Milstein (Nature 256: 495 (1985) mit den Modifikationen von Goldstein, L.C., et al., (Infect. Immun. 38:273 (1982)). Milz-B-Lymphocyten von immunisierten Mäusen wurden mit NS-1-Myelomzellen unter Verwendung von 40% (w/v) Polyethylenglykol fusioniert. Anschliessend wurde die Fusion der Zellmischung in HAT-Medium (RPMI - 1640-Medium unter Zusatz von 15% fötalem Kälberserum,  $1 \times 10^{-4}$  M Hypoxanthin,  $4 \times 10^{-7}$  M Aminopterin und  $1,6 \times 10^{-5}$  M Thymidin) resuspendiert, zur Auswahl für das Wachstum von Hybridzellen und dann auf 96-Loch-Mikrokulturschalen mit einer Konzentration mit 1 bis  $3 \times 10^6$  Zellen/ml dispersiert und bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre, welche 6% CO<sub>2</sub> enthielt, befeuchtet. Die Kulturen wurden genährt durch Ersatz der Hälfte des Überstandes mit frischem HAT-Medium. Die Löcher auf Zeichen von Zellproliferation unter Verwendung eines Inversionsmikroskops beobachtet, und wenn die Zellen eine genügende Dichte aufwiesen, wurden die Überstände auf Anti-LAV-Antikörper getestet.

45 Löcher, die Hybridzellen enthielten, welche Antikörper gegen LAV produzierten, wurden durch ELISAs identifiziert, wobei die Bindung an dem gesamten gereinigten, zertrümmerten Virus oder an den biologisch exprimierten Fusionsproteinen gemessen wurde. Die ELISAs unter Verwendung von zertrümmerten Viren wurden an LAV-EIA-Platten (Genetic Systems, Seattle, Washington) durchgeführt. Die Platten wurden mit Zellkulturfluiden bei 37°C während 45 Min. durchgeführt und dann dreimal mit 0,05% Tween 10 in phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS-Tween) gewaschen.

50 Peroxidase-Geissen-Antimaus-IgG (1:2000, verdünnt in PBS-Tween; Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, California) wurde (100 µl pro Loch) zugegeben und die Platten wurden während 45 Min. bei 37°C inkubiert und wie oben gewaschen. Das Substrat (0,025 M Zitronensäure, 0,05 M zweibasches Natriumphosphat, pH 5,0, welches 14 mg o-Phenylendiamin und 10 µl 30% Wasserstoffperoxid pro 50 ml) wurde zugegeben und die Platten wurden während 30 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurden mit 3 N Schwefelsäure gestoppt, und die colorimetrischen Reaktionen wurden mit einem automatischen Mikroplattenleser quantifiziert. Löcher, welche positive Resultate ergaben, wurden durch begrenzte Verdünnung subklont, wiederum auf Spezifität getestet und dann expandiert.

60 Die monoklonalen Antikörper, welche durch die resultierenden Hybridzelllinien sekretiert, wurden im weiteren bezüglich Spezifität und Reaktivität mit Immunoblotting, Immunopräzipitation und ELISA charakterisiert, wobei zertrümmertes LAV-Virus rekombinante LAV-Fusionsproteine und synthetische LAV-

65

Peptide verwendet wurden. Alle Antikörper wurden als IgG<sub>1</sub>-Isotypen bestimmt. Die Zelllinien HIV-gp110-1, HIV-gp110-2 und HIV-gp110-3 wurden bei der American Type Culture Collection vor der Einreichung der prioritätsbegründenden Anmeldung hinterlegt und erhielten die Hinterlegungsnummern ATCC HB 9175, HB 9176 bzw. HB 9177.

5 Die rekombinanten Fusionsproteine, welche auf Reaktivität getestet wurden, wurden vorher mit ENV2, ENV3, ENV4 und ENV 5 bezeichnet. Das Protein ENV2 wird von pENV2 (ATCC Nr. 53071) exprimiert, welches eine Region des LAV vom Basenpaar (bp) 6598 bis bp 7178 darstellt (die Numerierung wurde gemäss Wain-Hobson et al., vorgenommen, Cell 44: 9 (1985)), ENV3 wird von pENV3 (ATCC Nr. 53072) exprimiert und enthält die LAV-Region von bp 7178 bis bp 7698; ENV4 wird von pENV4 (ATCC Nr. 53073) exprimiert und enthält bp 7698 bis bp8572; und ENV5 wird von pENV5 (ATCC Nr. 53074) exprimiert und enthält die LAV-Region von bp5889 bis bp 7698. Die Produktion der rekombinanten Fusionsproteine ist im einzelnen in der U.S. Patentanmeldung Serial No. 721 237 beschrieben, auf welche ausdrücklich Bezug genommen wird.

#### 15 Das Zusammenfügen von synthetischen Peptiden

Die Peptide I (29) und VIII (110-2-2) wurden auf einem Benzhydrylamin (Polystyrol/Divinylbenzol) Harz (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California) zusammengesetzt. Das Peptid V (177) wurde auf einem t-Butyloxycarbonyl(Boc)-ethylbenzylcystein-phenylacetamidomethyl (PAM)-Polystyrol/Divinylkettensharz zusammengesetzt. Die symmetrischen Anhydridkupplungen wurden auf einem Applied Biosystems 430A-Synthesizer durchgeführt. Das Cystein wurde als erster Rest in beiden Peptiden zugefügt.

25 Es wurden Dicyclohexylcarbodiimid-Kupplungen in Gegenwart von Hydroxybenzotriazol für Asparagin und Glutamin verwendet. Weiter wurde der Seitenkettenschutz auf Basis von Benzyl und der Alphaamin-Schutz mit Boc verwendet. Andere Seitenketten wurden routinemässig unter Verwendung von Boc(formyl)-tryptophan, Boc-Methioninsulfoxid, Boc(tosyl)-arginin, Boc(methylbenzyl)-cystein Boc(tosyl)histidin, Boc(chlorobenzyloxycarbonyl)lysin und Boc(brombenzyloxycarbonyl)tyrosin verwendet.

Falls die Peptide radiomarkiert wurden, geschah dies durch Acetylierung des Aminoterminus mit <sup>3</sup>H-Essigsäure und einem Überschuss von Dicyclohexylcarbodiimid.

30 Die Deblockierung und Spaltung der Peptide vom Harz wurde nach der Tam «nieder-hoch» HF-Arbeitsvorschrift (Tam et al., supra) durchgeführt. Die Extraktion vom Harz geschah mit 5% Essigsäure und der Extrakt wurde einer Gelfiltrationschromatographie in 5% Essigsäure unterworfen.

Die synthetischen HIV-Peptide wurden mit monoklonalen Antikörpern, welche die Peptide 29, 36 und 39 enthielten, auf Reaktivität getestet. Das Peptid 29 wird durch die LABBRU-genomische Region von etwa bp 6688 bis bp 6750 codiert; das Peptid 36 wird durch die Region von etwa bp 7246 bis bp 7317 codiert; und das Peptid 39 wird durch die Region von etwa bp 7516 bis bp 7593 codiert. Die Peptide 36 und 39 sind im einzelnen im U.S.Patent 4 629 783 beschrieben, auf welches ausdrücklich Bezug genommen wird.

40 Die blockierenden Peptide IX-XV wurden im wesentlichen, wie oben beschrieben, auf einem Methyl-Benzhydrylamin (Polystyrol/Divinylbenzol)harz (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California) zusammengesetzt. Die symmetrischen Anhydrid-Kupplungen wurden auf einem Applied Biosystem 430A-Synthesizer durchgeführt. Die Dicyclohexylcarbodiimid-Kupplungen in Gegenwart von Hydroxybenzotriazol wurden für Asparagin verwendet. Für den Schutz wurden Seitenketten auf Benzyl-Basis und der Boc Alpha-Aminschutz verwendet, während Boc(brombenzyloxycarbonyl) spezifisch für Tyrosin-Seitenketten verwendet wurde.

45 Die Acetylierung wurde, falls erforderlich, unter Verwendung von Essigsäureanhydrid oder Eisessig und Dicyclohexylcarbodiimid durchgeführt. Die Deblockierung und Abspaltung des Peptides vom Harz wurde nach der Standard-«hoch»-HF-Arbeitsvorschrift (Stewart et al., supra) durchgeführt. Die Extraktion vom Harz wurde mit 50% Essigsäure durchgeführt und der Extrakt wurde anschliessend einer Gelfiltrationschromatographie in 20%iger Essigsäure unterworfen. Wie gewünscht, wurde die Flüssigchromatographie auf einer Vydac C18-Säule (Rainin Instrument Co., Emeryville, CA) durchgeführt, wobei ein 0,1% Trifluoressigsäure-Acetonitrilgradient verwendet wurde.

#### 55 Immunoblotting

Die Charakterisierung durch Immunoblotting wurde auf Klonüberständen oder Ascites-Flüssigkeit unter Verwendung von gereinigtem LAV-Virus und rekombinanten Fusionsproteinen als Antigene durchgeführt. Die Antigene wurden zuerst durch eine Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese (7,0-15,0%) aufgetrennt und dann auf eine Nitrocellulosemembrane (NCM) mittels Elektrophorese transformiert, während 4 Std. bei 25 V in 25 mM Natriumphosphat (pH 7,0). Nach dem Transfer wurde die NCM blockiert, um nicht spezifische Wechselwirkungen zu vermeiden, durch Inkubation in PBS-Tween oder Blotto (5% fettfreie Trockenmilch in PBS) während 1 Std. bei Zimmertemperatur. Die NCM wurde mit Zellkulturüberstand oder Ascites-Flüssigkeit, welche mit PBS-Tween verdünnt war, während 1 Std. bei Zimmertemperatur inkubiert und wurde dreimal mit PBS-Tween gespült. Im zweiten Schritt wurde die NCM mit Geissen-Antimäus-IgG-Meerrettichperoxidase, verdünnt in PBS-Tween, während 1 Std. bei Zimmertem-

peratur inkubiert. Dieser Inkubation folgte eine Waschung mit PBS-Tween und dann ein Tauchen in Meerrettichperoxidase-Farbwirkungslösung (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California) während 20 Min. Die Reaktion wurde durch Eintauchen in deionisiertes Wasser unterbrochen. Die Reaktivität des monoklonalen Antikörpers wurde mit einem positiven Kontrollserum verglichen, welches mit gereinigtem, zertrümmertem Virus oder exprimiertem Fusionsprotein reaktiv war. Die Resultate zeigten, dass alle Antikörper an gp110 und sein Vorläufermolekül gp150 gebunden waren, wenn zertrümmerte Viruspräparate verwendet wurden. Die Antikörper 110-1 und 110-2 erkannten ebenfalls das Fusionsprotein ENV3, während die Antikörper 110-3, 110-4, 110-5 und 110-6 einen Immunokomplex mit ENV2 bildeten.

#### 10 Immunopräzipitation

Es wurden virale Extrakte für die Radioimmunopräzipitation aus CEM-Zellen hergestellt, welche mit dem LAV<sub>BRU</sub>-Isolat von HIV, welches an das lytische Wachstum durch kontinuierliche Passagierung angepasst wurde. Wenn frühe cytopathische Effekte offensichtlich waren, wurden die Zellen in ein Markierungsmedium transferiert, welches <sup>35</sup>(S)-Methionin (0,05 mCi/ml) oder <sup>3</sup>(H)-Glucosamin (0,025 mCi/ml) enthielt und dann während 24 Std. inkubiert bis die meisten der Zellen lysiert waren und das Virus im Kulturüberstand freisetzen. Das Virus wurde aus dem zellfreien Überstand tablettiert (1 Std. bei 100 000 g) und es wurden Detergenzien-Extrakte in P-RIPA-Puffer (phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, die 1,0% Triton X-100, 1,0% Deoxycholat, 0,1% SDS und 1% Aprotinin) enthielt, hergestellt. Ähnliche Extrakte wurden aus den Überständen von nicht infizierten CEM-Zellen hergestellt.

Die Immunopräzipitationsassays wurden mit 100 µl Virusextrakt, welches mit 100 µl Kulturüberstand aus der Hybridzelllinie während 1 Std. auf Eis inkubiert wurde, durchgeführt. 4 µl Kaninchen-Antimaus-Ig (Zymed Laboratories, So. San Francisco, California) wurde zu jeder Probe gegeben und während 30 Min. inkubiert. Immunopräzipitin (100 µl, Bethesda Research Laboratory, Bethesda, Maryland), welches in P-RIPA-Puffer, welcher 1,0% Ovalbumin enthielt, resuspendiert war, wurde zu jeder Probe gegeben und während zusätzlichen 30 Min. inkubiert. Die gebundenen Komplexe wurden gewaschen und durch SDS-Polyacrylgelelektrophorese (15,0% Acrylamid: DATD-Gel) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele fixiert, in Enhance gespült (New England Nuclear, Boston, MA), getrocknet und einem Kodak XR-5-Film ausgesetzt. Ein positives Referenzserum, worin alle HIV viralen Proteine immunopräzipitiert waren, wurde mit viral-infizierten CEM-Zellüberständen als positive und negative Kontrollen zur Reaktion gebracht.

Die Resultate zeigten, dass alle sechs monoklonalen Antikörper gp110 und gp150 spezifisch immunopräzipitierten.

#### 35 Enzym-gebundener Immunoabsorbens-Test (ELISA)

Zur Kartierung der gp110-Epitope, die durch die erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper erkannt werden, werden Kulturüberstände von Hybridzelllinien oder Ascites-Flüssigkeiten weiter durch ihre Reaktivität in ELISA mit biologisch exprimierten Fusionsproteinen und synthetischen Peptiden charakterisiert. Die Verfahren waren die gleichen, wie die oben beschriebenen, mit der Ausnahme, dass als Antigen, welches an die Oberfläche der Mikrotiterlöcher adsorbiert war, Fusionsproteine oder synthetische Peptide, das gereinigte Virus ersetzen.

Bei Verwendung von Peptiden als Antigen war die Vorschrift für die Auftragung die folgende: lyophilisiertes Peptid wurde in 6M Guanidin HCl aufgelöst. Unmittelbar vor der Auftragung auf die 96-Lochplatten wurde die Guanidinlösung in 0,05 M Carbonat/Bicarbonatpuffer (pH 9,6) verdünnt, auf eine finale Peptidkonzentration von bis zu 100 µg/ml. ein 50 µl Volumen von verdünnten Peptiden wurde auf jede Mikrotiterplatte aufgetragen und die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Die überschüssige Peptidlösung wurde «ausgeschüttelt», die Platten wurden mit Blotto blockiert und das oben beschriebene Verfahren folgte für den Rest des ELISAs. In einiger Weise wurde rekombinantes Protein auf eine finale Konzentration von etwa 2 µg/ml in 0,05 M Carbonat/Bicarbonatpuffer (pH 9,6) verdünnt, bevor das gleiche Verfahren folgte.

Die Resultate sind in Tabelle II dargestellt. Die monoklonalen Antikörper, welche durch die Zelllinien HIV gp110-1 und HIV gp110-2 produziert wurden, reagierten mit ENV3, ENV5, dem Peptid 36 und zertrümmertem Virus. Die Antikörper von den Zelllinien HIV gp110-3, HIV gp110-4, HIV gp110-5 und HIV gp110-6 reagierten mit ENV2 und dem Peptid 29, ebenso wie mit dem zertrümmerten Virus.

60

65

Tabelle II

ELISA, welcher die Reaktivität der monoklonalen Antikörper mit rekombinanten Proteinen und synthetischen Peptiden zeigt

5	Rekombinantes Fusionsprotein				Synthetisches Peptid			LAV		CEM
	ENV2	ENV3	ENV4	ENV5	29	36	39	Kontr	Kon	
	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
10	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
15	110-6	3.000	0.033	ND	ND	1.937	ND	0.017	0.486	0.032

Die Resultate in Tabelle II demonstrierten, dass die monoklonalen Antikörper 110-1 und 110-2, welche eine antigenische Determinante erkannten, die durch eine DNA-Sequenz innerhalb der pENV3-Region codiert wurde, insbesondere die Region des HIV-Genoms, welches durch die Aminosäuresequenz des Peptides 36 definiert ist, d.h. dass die monoklonalen Antikörper gp110-1 und 110-2 sich an eine Peptid-Region von gp110 binden, welche innerhalb von bp 7246 bis bp 7317 codiert wird, wie dies durch die Bildung eines Immunokomplexes mit Peptid 36 und ENV3 nachgewiesen wird. Diese Region des HIV-Genoms wurde früher als konserviert nachgewiesen, d.h. kleine Änderungen in der DNA-Sequenz in der Region, welche durch Peptid 36 codiert wird, innerhalb verschiedener viraler Isolate von verschiedenen geographischen Gebieten. Vergleiche Starcich et al., *Cell* 46: 637 (1986). Im Gegensatz dazu binden die monoklonalen Antikörper gp110-3, -4, -5 und -6 Peptide von HIV, welche durch Region des Peptides 29 von bp 6688 bis etwa bp 6750 codiert werden. Die Region in gp110, welche durch das Peptid 29 definiert wird, wurde als solches nachgewiesen, das verschiedene nukleotide Substitutionen bei verschiedenen viralen Isolaten besitzt. Monoklonale Antikörper, welche selektiv gp110-Polypeptide, welche konservierte Epitope enthalten, binden, wie die Antikörper 110-1 und 110-2, können eine verbesserte Nützlichkeit in einer Vielzahl von Umständen besitzen, beispielsweise bei der Affinitätschromatographie usw. Ebenfalls bei ELISA-Assays reagierte das Peptid 110-2-2 mit Seren von Individuen, von welchen LAV-2 isoliert wurde.

### 35 Indirekter Immunofluoreszenz-Assay

Indirekte Immunofluoreszenz-Assays, worin monoklonale Antikörper verwendet werden, welche gegen das gp110-Antigen von HIV gerichtet sind, wurden auf Aceton-fixierten und lebenden Zellen durchgeführt. Es wurden Aceton-fixierte Objektträger, welche mit LAV-infizierten CEM-Zellen hergestellt wurden, mit verdünnten Kulturüberständen oder Ascites-Flüssigkeiten während 1 Std. bei 37°C inkubiert, während die lebenden Zellen mit Kulturüberständen oder Ascites-Flüssigkeiten während 1 Std. bei 4°C inkubiert wurden, bevor die Zellen auf die Objektträger gebracht und Aceton-fixiert wurden. In beiden Verfahren wurde Fluorescein-Isothiocyanat-markiertes Antimäus-IgG verwendet, um Zellen nachzuweisen, welche das reaktive gp110-Antigen trugen. Der monoklonale Antikörper HIV-gp110-1 ergab positive Resultate, wobei entweder lebende oder Aceton-fixierte LAV-infizierte Zellen verwendet wurden.

### 50 Beispiel II

#### Neutralisation von HIV-Infektivität durch Anti-gp110-monoklonale Antikörper

Dieses Beispiel beschreibt und charakterisiert die Neutralisation von HIV-Infektivität unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern, welche gp110 und Peptide, welche gp110 enthalten, binden. Die Resultate zeigen an, dass die monoklonalen Antikörper gp110-3, -4, -5 und -6 eine neutralisierende Aktivität besitzen und dass gp110-3 und gp110-4 insbesondere hohe Anteile von neutralisierender Aktivität besitzen.

### 60 Neutralisierungstest

Es wurde ein empfindlicher Neutralisierungstest entwickelt um den Effekt der monoklonalen Antikörper auf die HIV-Infektiosität quantitativ zu erfassen. Es wurde eine A CD4+-Zelllinie von hoher Anfälligkeit gegen die HIV-Infektion, CEM als Zielzelle für Infektiositätsvergleiche verwendet. Ascites-Flüssigkeit, welche gemäss dem Beispiel I hergestellt wurde oder die IgG-Fraktion davon, welche unter Verwendung der Ammonsulfatausfällung gereinigt wurde, wurde bei 56°C während 30 Min. durch Hitze

inaktiviert und dann, wie erforderlich in RPMI-Medium, welches 10% fötales Kälberserum enthielt, verdünnt. Es wurde eine Suspension des HIV-Stammes LAV<sub>BRU</sub> aus etwa 4 Tage-Kulturen mit CEM in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, durch 0,2 oder 0,45 Micronfilter filtriert, in aliquote Anteile aufgeteilt und bei -70°C eingefroren. Ein Aliquot wurde aufgetaut, zur Bestimmung des TCID<sub>50</sub> titriert und anschliessend wurden die Tests durchgeführt mit frisch aufgetauten Aliquoten, welche 1:500 mit Kulturmedium auf eine Konzentration verdünnt, welche etwa zehnmal der Menge entsprach, welche erforderlich ist, um 50% der CEM-Zellen in der Kultur (10 TCID<sub>50</sub>) zu infizieren. Die Virus-Suspension wurde mit einem gleichen Volumen (250 µl) des monoklonalen Antikörper-Präparates in fünffachen Verdünnungen 1:5 bis 1:9 765 625. Die Virus/Antikörper-Mischung wurde während 45 Min. bei 37°C inkubiert und dann wurden zweifache Proben von 200 l zur Inokulation von Löchern verwendet, welche 1,0 ml von etwa 2 × 10<sup>5</sup> CEM-Zellen pro Loch enthielten. Die Kulturen wurden bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit einem Gehalt von 5% CO<sub>2</sub> während 14 Tagen inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, tabletiert und mit 1% Triton X-100 in PBS während ca. 10 Min. lysiert. Der Anteil des Virus (oder des viralen Antigens), welches in den lysierten Zellen vorhanden war, wurde durch Verwendung eines empfindlichen HIV-Antigenfang-«Sandwich»-Enzymimmunoassays, wie oben beschrieben, quantitativ erfasst. Der Titer der neutralisierenden Aktivität, falls vorhanden, wurde als reziproker Wert der Verdünnung des monoklonalen Antikörpers, welcher die Antigenproduktion mehr als 50% der Kontrollvirkulturen, welche ohne Antikörper inkubiert wurden, hemmte oder mit einem monoklonalen Antikörper des gleichen Isotyps, von welchem vorher nachgewiesen wurde, dass er keine neutralisierende Aktivität zeigt.

Der HIV-antigenische Fangtest bezieht sich auf die oben verwendeten zwei monoklonalen Antikörper, welche gegen die p25-Antigene als Fangmittel gerichtet sind. Diese Hybridomzelllinien wurden durch die oben beschriebenen Verfahren mit kleineren Änderungen gebildet, einschliesslich der Verwendung eines rekombinanten gag-Fusionsprotein als Immunogen und der Charakterisierung der resultierenden monoklonalen Antikörper bezüglich Spezifität und Reaktivität unter Verwendung von rekombinanten Fusionsproteinen, welche vorläufig als GAG-1, GAG-2 und GAG-3 bezeichnet wurden und des synthetischen Peptides 141. Das Protein GAG-1 wird von pGAG-1 (ATCC Nr. 53 379) exprimiert, GAG-2 wird von pGAG-2 (ATCC Nr. 53 111) exprimiert und GAG-3 wird von pGAG-3 (ATCC Nr. 53 112) exprimiert. Die Produktion der rekombinanten Fusionsproteine ist im einzelnen in den hängigen US-Patentanmeldungen der Serial numbers 764 460 und 828 828 beschrieben, auf welche ausdrücklich Bezug genommen wird. Das synthetische Peptid 141 wird durch die genomische Region LAV<sub>BRU</sub> in Übereinstimmung mit den Aminosäureresten 198 bis 242 codiert. Die monoklonalen Antikörper, welche durch die Hybridomzelllinien p25-2 und p25-3 produziert werden, haben sich als reaktiv mit den rekombinanten Fusionsproteinen GAG-1, GAG-2 und GAG-3 erwiesen und der monoklonale von p25-3 ist ebenfalls mit dem synthetischen Peptid 141 reaktiv.

Zur Durchführung des Antikörperfangtests wurden die Fangreagenzien zuerst auf einen festen Träger adsorbiert. Die von den Hybridomzelllinien p25-2 und p25-3 abgeleitete Ascites-Flüssigkeit wurde 1:5000 mit 25 mM Tris-Puffer, pH 8,5, verdünnt und 200 µl wurden in die Löcher von Mikrolochplatten gegeben. Die Löcher wurden verschlossen und während etwa 16 Std. bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde aus den Löchern durch Absaugen entfernt, bevor eine Blockierungslösung aus 0,3% Blotto in PBS zugegeben wurde. Die Blockierung wurde während 15 Min. bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Blockierungslösung wurde abgesaugt und die Proben wurden zugegeben. 200 Mikroliter lysierte Zellsuspension und 5,0 µl des Nachweiskonjugates, hergestellt wie oben beschrieben, wurden in jedes Loch gegeben. Die Lochstreifen oder -platten wurden 2 Std. bei 37°C inkubiert, wonach die Suspension abgesaugt und die Löcher viermal mit Puffer (0,05% Tween in 20% PBS) gewaschen wurden. Das Nachweiskonjugat wurde folgendermassen hergestellt: Die monoklonalen Antikörper p25-6 und p25-7 wurden mit Meerrettichperoxidase (HRP) in einem Molverhältnis von 3:1 (Ab: HRP) während 3 Std. unter Verwendung eines Periodat-Oxidationsverfahren konjugiert (Nakane, et al., *J. Histochem. Cytochem* 22: 1084 (1974)). Die Konjugate wurden 1:1500 in 2,5% (w/v) in entfetteter Trockenmilch, 0,02% Thimerosal und 0,005% Antischaum-A in 20 mM Natriumcitrat verdünnt. Der Rest des ELISA-Verfahrens wurde wie in Beispiel I beschrieben durchgeführt.

Die Resultate des Neutralisierungsaktivitätstests mit den Antikörpern gp110-3, -4, -5 und -6 sind folgende. Die höchsten Titer, in welchen zurückgebliebene Neutralisationsaktivität nachgewiesen wurde, waren: gp110-3 = 15 625; gp110-4 = 9 765 625; gp110-5 = 125 und gp110-6 = 625.

Wegen der vorausgesagten genetischen Variierbarkeit der Region, welche durch das Peptid 29 definiert wird, wurde die Fähigkeit des monoklonalen Antikörper gp110-4 geprüft, andere Isolate von HIV zu erkennen. Die Immunofluoreszenz-Tests wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Der Antikörper gp110-4 liess Antigen in Kulturen von mindestens drei der sechzehn getesteten HIV-Isolate nach.

Der Antikörper gp110-4 war fähig, Viren zu neutralisieren, welche von einem Schimpansen isoliert wurden, 15 Wochen nach dem dieser in einem Tierkontrollversuch bei einem AIDS-Impfstofftest mit LAV<sub>BRU</sub> inokuliert wurde. Der monoklonale Antikörper war fähig, die Isolate zu neutralisieren, obschon das Tier Serum-Antikörper aufwies, welche den HIV *in vitro* neutralisierten und eine netzbare, zervermittelte Immunantwort gegen die HIV-Infektion entwickelt wurde. Dies zeigt einen Mangel des antigenischen Triebes *in vivo* für das Epitop, welches durch den gp110-4-Antikörper erkannt wird.

Beispiel IIINeutralisation der HIV-Infektiosität durch einen Cocktail aus den monoklonalen Antikörpern Anti-gp110 und Anti-p25

5 Dieses Beispiel beschreibt die Neutralisation der HIV-Infektiosität unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern, welche sich an gp110 und Peptide innerhalb von gp110 binden in Kombination mit monoklonalen Antikörpern, welche sich an p25 und Peptid innerhalb von p25 binden, welche allein nur eine kleine oder keine neutralisierende Wirkung aufweisen. Die Resultate zeigen an, dass die monoklonalen Antikörper gp110-2 in Kombination von entweder p25-6 oder p25-7 besonders hohe Niveaus von neutralisierender Aktivität aufweisen. Die Hybridomzelllinien p25-6 und p25-7 wurden durch die oben beschriebenen Verfahren gebildet, jedoch mit Änderungen, welche die Verwendung von inaktiviertem, zerkümmertem Virus oder eines gereinigten rekombinanten gag-Fusionsproteins, das in *E. coli* exprimiert wurde, als Immunogen umfassen und die resultierenden monoklonalen Antikörper bezüglich Spezifität und Reaktivität unter Verwendung der rekombinanten Fusionsproteine, die vorläufig als GAG-1, GAG-2 und GAG-3 und den synthetischen Peptiden 15, 88, 150, 137 und 148 charakterisiert wurden. Die synthetischen Peptide werden durch die LAV<sub>BRU</sub> codiert, welche wie folgt, den Aminosäureresten entspricht. Peptid 15, Aminosäurereste 329 bis 350; Peptid 88, Aminosäurereste 325 bis 350; Peptid 150, Aminosäurereste 318 bis 363; Peptid 147, Aminosäurereste 278 bis 319; und Peptid 148, Aminosäurereste 290 bis 319. Die durch die Hybridomzelllinien p25-6 und p25-7 produzierten monoklonalen Antikörper sind mit dem rekombinanten Fusionsprotein GAG-3 reaktiv, p25-6 ist reaktiv mit den synthetischen Peptiden 147 und 148 und p25-7 ist mit den synthetischen Peptiden 15, 88 und 150 reaktiv.

15 Die Neutralisationstests wurden wie oben beschrieben durchgeführt mit der Ausnahme, dass wenn Cocktails verwendet wurden, die individuellen monoklonalen Antikörper zuerst 1:5 mit Kulturmedium verdünnt und dann in gleichem Verhältnis gemischt wurden, um eine finale Konzentration von 1:10 zu erhalten. Der Rest des Test wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

20 Die monoklonalen Antikörper gp110-2, p25-6 und p25-7 zeigen weniger als 50% neutralisierende Aktivität, wenn sie allein verwendet werden. Bei der Verwendung in einem Cocktail, welches die monoklonalen Antikörper gp110-2 mit p25-6 und gp110-2 mit p25-7 in einer 1:10-Verdünnung enthielt, wurde eine totale Neutralisation festgestellt. Ein Cocktail, welches die monoklonalen Antikörper p25-6 in Kombination mit p25-7 umfasste, ergab eine neutralisierende Aktivität von 60 bis 90%.

Beispiel IV35 Immunopotenz des Peptides 29 und der Homologen

Die Fähigkeit des Peptides 29 und der homologen Peptide, einschliesslich Peptid 177, eine Immunantwort gegen HIV zu stimulieren, wurden an zwei Mäusestämmen geprüft. Die Verfahren für die Herstellung der Peptidimmunogene der Arbeitsvorschriften für die Immunisierung und für die Charakterisierung der gebildeten Immunantwort sind nachstehend im einzelnen angeführt.

40 Das Peptid 29 wurde durch Konjugation mit einem gereinigtem Thyroglobulin für die Immunisierung vorbereitet. Das thyroglobulin kann mit N-Succidimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) für die Konjugation deriviert sein, gemäss dem Verfahren, welches in der US-A 4 629 783, Spalte 10, Zeilen 28-51, beschrieben ist. Als zweites Immunogen wurde Thyroglobulin folgendermassen mit Glutaraldehyd deriviert. Schweine-Thyroglobulin, 27 mg, wurde in 1 ml 0,1 M Natriumbicarbonat aufgelöst, zu welchem 8,3 l 25% Glutaraldehydlösung tropfenweise zugegeben wurde und die Mischung wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. 1 ml des Natriumcarbonat-bicarbonatpuffer (pH 9,3) wurde zur Lösung gegeben und dann während 8 Std. gegen 2 l des gleichen Puffers bei 4°C dialysiert, wobei das Dialysat nach 4 Std. vollständig ersetzt wurde. Das Peptid 29 wurde dann zum derivierten Thyroglobulin in etwa 100 molarem Überschuss zugegeben und die Mischung wurde bei Zimmertemperatur über Nacht gerührt. Nicht umgesetztes Glutaraldehyd wurde mit 200 µl 0,2 M Lysinlösung blockiert und die Mischung während mehreren Stunden (oder über Nacht) bei Zimmertemperatur gerührt. Das Peptid-Thyroglobulinkonjugat wurde dann erschöpfend gegen PBS bei 4°C dialysiert.

50 Zwei Mäusestämme (C57 schwarz und BALB/c) wurden mit Peptiden, welche nach allen Konjugationsmethoden hergestellt wurden, inokuliert. Sämtliche Tiere waren zur Zeit der Inokulation etwa 2-4 Wochen alt. Die Inokulationswege umfassten die Pfoten, die Schwanzskarifikation oder erfolgten subkutan, intranasal oder intraperitoneal. Das Inokulum bestand aus 25 µg konjugiertem Peptid, welches in 0,5 ml vollständigem Freund-Adjuvans bestand, wobei die Verstärkungsinokulationen nach den Wochen 2, 3 und 5 durch das gleiche Immunogen, welches in unvollständigem Freund-Adjuvans aufgelöst war, wiederholt wurden. Es wurden Serumproben von einzelnen Mäusen genommen, vor der Immunisierung, 4 Tage nach der Verstärkungsinmunisierung, nach 3 Wochen und 4 Tage nach der finalen Verstärkung nach 5 Wochen. Die Serumproben wurden auf Antikörper gegen homologe Peptide oder das gesamte Virus durch Screening in ELISAs analysiert. Die Seren, welche eine Antikörperaktivität gegen LAV zeigten, wurden einem weiteren Screening auf neutralisierende Aktivität unterworfen, gefolgt durch Analy-

65

sieren des Gens durch Immunoblots gegen zertrümmertes LAV-Antigen und Radioimmunpräzipitationstest mit radiomarkiertem gp110.

Die Resultate der Immunisierungen zeigten, dass Mäuse, welche mit dem Peptid 29 immunisiert waren, Antikörper entwickelten, welche mit dem Peptid 29 und dem zertrümmerten LAV-1-Virus gemäss ELISA reaktiv waren. Die Konjugation des Peptides 29 mit Glutaraldehyd rief im allgemeinen höhere Antikörpertiter gegen das Peptid 29 in BALB/c-Mäusen hervor, obschon die Konjugation mit Maleinimid erfolgreich Anti-Peptid 29-Antikörper in einigen BALB/c-Mäusen hervorrief. Mäuse, welche mit dem Peptid 177 immunisiert waren, entwickelten Antikörper gegen das Peptid und die Konjugation des Peptides 177 mit Glutaraldehyd war besser für die Hervorrufung einer Immunantwort. Die C57-Mäuse zeigten eine grössere Reaktion auf Immunostimulation mit dem Peptid 177, als die BALB/c-Mäuse. Mäuse, welche mit dem LAV-2-Peptid 110-2-2 immunisiert waren, entwickelten Antikörper gegen 110-2-2 und LAV-2-Virus, wie durch ELISA gezeigt wurde. Die Peptide 110-2-2, welche mit Glutaraldehyd konjugiert waren, zeigten Immunogenität, sowohl in den C57- als auch in den BALB/c-Mäusen, obschon die Titer gegen die 110-2-2-Peptide bei BALB/c im allgemeinen höher, als bei C57-Mäusen waren, während die Titer gegen das LAV-2-Virus bei den C57-Mäusen höher waren, als bei den BALB/c-Mäusen.

Im allgemeinen sind Serumproben von immunisierten Mäusen, welche (i) Antikörper gegen das gesamte Virus zeigten, (ii) fähig, das HIV zu neutralisieren, wie dies in den Tests im Beispiel II beschrieben ist und (iii) sind in ELISAs reaktiv mit dem Peptid 29, was kumulativ die Wirksamkeit der Verwendung des Peptides 29 in einer Impfstoffformulierung angibt.

#### Beispiel V

##### Immunoaffinitätstrennung von gp110 unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern

Monoklonale Antikörper gegen gp110-Antigen von HIV können bei Immunoaffinitätstrennverfahren verwendet werden, um bakteriell exprimierte, rekombinante Fusionsproteine wesentlich zu reinigen. Wenn das exprimierte Protein durch das Bakterium ausgeschieden wird, kann das Protein aus dem Kulturüberstand isoliert werden; wenn das Protein nicht ausgeschieden wird, kann eine Zertrümmerung der bakteriellen Zellen erforderlich sein.

Die Konstruktion des Plasmides pENV-5 (ATCC Nr. 53 074) ist beschrieben in der parallelen US-Patentanmeldung Serial number 721 237, auf welche hier ausdrücklich Bezug genommen wird. Das Plasmid pENV-S codiert den Hauptteil des Carboxy-Terminus von gp110 und einen Teil des Amino-Terminus von gp41 von LAV, welcher in den *trp*-Expressionvektor insertiert ist. *E. coli* C600, welche durch diesen Vektor transformiert wird, exprimiert, sekretiert jedoch das gp110-Fusionsprotein nicht.

Das *E. coli* C600, welches das Plasmid pENV-5 enthält, wird in einem Medium, das Tryptophan enthält (20 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C unter Luftzufuhr gezüchtet. Die Übernachtskulturen werden dann 1:100 in frischem minimalem Medium inokuliert, welches Ampicillin (100 µg/ml), jedoch kein Tryptophan enthielt. Diese Kulturen werden Belüftung während 2 bis 3 Std. gezüchtet (bis zu einer frühen logarithmischen Phase), bei 37°C. Der Induktor 3-B-Indol-acrylsäure (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), wird bis zu einer finalen Konzentration von 20 µg/ml aus frisch gemachten Vorräten von 20 mg/ml in 95 % Ethanol zugegeben. Die induzierten Kulturen werden dann bei 37°C unter Belüftung während 4 bis 5 Std. gezüchtet und dann deletisiert und gegebenenfalls eingefroren. Die Proteinausbeuten von pENV-5 sind typischerweise kleiner als 1 mg/l.

Die pelletisierten Bakterienzellen werden unter Verwendung von P-RIPA-Puffer ( PBS, enthaltend 1% Triton X-100, 1% Desoxycholat, 0,1% Natriumdodecylsulfat und 1% Aprotinin ) lysiert, wobei die *E. coli*-Zellen lysiert werden. Die Suspension kann beschallt werden, um die DNA und die RNA voneinander zu trennen und anschliessend kann durch Zentrifugation das partikelförmige Material entfernt werden. Ein Verdünnungs- oder Konzentrationsschritt kann erforderlich sein, um die Proteinkonzentration zu standardisieren.

Der monoklonale Antikörper HIV-gp110-1 wird zuerst von Ascites-Flüssigkeit oder Zellkulturüberständen bei Zimmertemperatur 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 finale Sättigung von 33 bzw. 18% gesättigt sind, ausgefällt. Die ausgefallenen Proteine werden durch Zentrifugation entfernt und wiederum in PBS aufgelöst und ein zweites Mal mit 33%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  oder 12 bis 15%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ausgefällt. Dieser Schritt kann nötigenfalls wiederholt werden. Die durch Zentrifugation erhaltene Pastille wird wiederum in PBS aufgelöst und die überschüssigen Salze werden durch Gelfiltration, durch eine Entsalzungsmatrix oder durch erschöpfende Dialyse gegen PBS entfernt.

Der gereinigte monoklonale Antikörper 110-1 kann dann an Cyanbromid-aktivierte Sepharose gekoppelt werden. Der erforderliche Anteil Gel wird in  $10^{-3}$  M HCl-Lösung auf einem Glasfilter gequollen (1 g gefriergetrocknetes Material ergibt ein finales Gelvolumen von ungefähr 3,5 ml) und während 15 Min. mit der gleichen Lösung gewaschen und der Antikörper wird unmittelbar danach zugegeben. Im allgemeinen erfolgt die Kupplungsreaktion am wirksamsten in einem pH-Bereich von 8-10, es kann aber, falls es die Antikörperstabilität erfordert, ein tieferer pH verwendet werden. Der Antikörper sollte in PBS oder in einem Carbonat/Bicarbonat- oder einem Boratpuffer mit 150 mM NaCl von hoher Ionenstärke aufgelöst werden. Die aktivierte Sepharose und die Antikörpersuspension wird dann mässig während 2 bis 4 Std. bei Zimmertemperatur oder über Nacht bei 4°C gerührt und dann auf einem Probenglas-Frittenfilter

mit dem Kupplungspuffer gewaschen. Sämtliche verbleibenden aktiven Gruppen werden durch Behandlung mit 1,0 M Ethanolamin bei pH 8 während 2 Std. blockiert. Das Antikörper-Sepharoseendprodukt wird dann abwechslungsweise vier- bis fünfmal mit einer Pufferlösung mit einem hohen und niederen pH-Wert gewaschen (Boratpuffer, 0,1 M, pH 8,5, 1M NaCl und Acetatpuffer 0,1 M, pH 4,0, 1 M NaCl). Dieses Waschen entfernt Spuren von nicht kovalent adsorbierten Materialien. Die fertigestellte Immunoaffinitäts-Trennungsmatrix wird unterhalb von 8°C in Gegenwart eines zweckmässigen Bakterioantikums, wie 0,01% Azid aufbewahrt.

Die Zugabe der Suspension des exprimierten Proteins zur Immunoaffinitätstrennungsmatrix führt zur selektiven Entfernung des gp110-Antigens. Die Mischung kann 2 bis 24 Std. miteinander reagieren, vorzugsweise 12 bis 18 Std. unter schwachem Rühren oder Schaukeln. Es kann ebenfalls ein Säulenformat verwendet werden, worin die Immunoaffinitätsmatrix in die Säule gegossen, equilibriert und die Lösung des exprimierten Proteins langsam in die Säule gegeben wird. Nachdem die Proteinsuspension zugegeben wurde, sollte der Durchfluss gestoppt werden, um eine maximale Immunkomplexbildung zu ermöglichen.

Ungebundenes Material wird durch erschöpfendes Waschen mit Adsorptionpuffer ausgewaschen oder abgetrennt. Ein grober Glasfrittenfilter mit Vakuum oder der Säulendurchfluss kann dazu verwendet werden. Das gebundene Material wird dann eluiert, wobei Pufferlösungen mit niederem und hohem pH-Wert (Acetatpuffer, pH 4,0 oder Boratpuffer, pH 8,56) oder ein chaotropes Mittel verwendet werden.

#### Beispiel VI

##### Immunoaffinitätsreinigung von rekombinantem gp110 aus einem Säugetierexpressionssystem

Die erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper finden Verwendung bei der Immunoaffinitätsreinigung von rekombinantem Fusions-gp110, welches durch Säugetierzellen exprimiert wird. Die Säugetierzellen sind mit einem rekombinanten Vaccinia infiziert (Mackett et al., *J. Virol.* 49: 857 (1984)), welches Sequenzen enthält, welche mindestens einen Teil von gp110, welches antigenisch ist und neutralisierende Antikörper hervorruft, codiert.

Der rekombinante Vaccinia ist gemäss dem Verfahren, welches in der US-Patentanmeldung Serial number 842 984 beschrieben ist, konstruiert worden. Kurz gesagt werden dabei Sequenzen, die das Hüllglykoprotein von HIV codieren in einem Plasmid-Vektor (pGS20) stromabwärts vom Vaccinias transkriptions-Kontrollelement inseriert. Dieses chimäre Gen wird durch Sequenzen flankiert, welche das virale Thymidinkinase (TK)-Gen codieren.

Chimäre Plasmidvektoren, welche den Vaccinia-Viruspromotor aufweisen, welcher an das LAV-Hüllgen gebunden ist, werden verwendet, um den *E. coli*-Stamm MC1000 umzuformen. Die Insertion der chimären LAV-env-Sequenzen in das Vaccinia-Virusgenom wurde *in vivo* durch Rekombination erzielt, was durch die Tatsache ermöglicht wurde, dass die chimären Gene in den Plasmiden pv-env5 durch Vaccinia-Virussequenzen flankiert sind, welche das TK-Gen codieren. Dieses Plasmid wird dann in die Zellen eingeführt, welche vorher mit dem Wildtyp des Vaccinia-Virus infiziert worden sind und die Rekombination konnte zwischen den TK-Sequenzen auf dem Plasmid und den homologen Sequenzen im viralen Vacciniagenom ablaufen, wobei das chimäre Gen inseriert wurde. Leberzellen des afrikanischen grünen Affen (Stamm BSC-40, eine Linie, welche von BSC-1-Zellen abgeleitet wurden, ATCC Nr. CCL26) wurden im Expressionssystem als Wirt verwendet.

Zusammenfliessende BSC-40-Zellen werden durch eine Vielzahl von Infektionen von 10 rekombinanten Vaccinia-Viren infiziert. Die Infektion wurden während 12 Std. fortschreiten gelassen, wonach die Zellen geerntet, einmal mit PES gewaschen und durch Zentrifugation gesammelt wurden. Die Zellpastillen wurden in Lysenpuffer wiederum suspendiert (1,0% NP 40, 2,5% Natriumdesoxycholat, 0,1 M NaCl, 0,01 M M Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA) und das Lysat wurde dann durch Zentrifugation geklärt. Die Immunoaffinitätsreinigung des exprimierten rekombinanten Fusionsproteins wird wie oben für das bakterielle Expressionssystem beschrieben durchgeführt, wobei der monoklonale Antikörper gp110-1 verwendet wird. Die durch dieses Expressionssystem produzierten Proteine gleichen dem natürlich produzierten HIV-gp110 mehr, da das Verfahren und die Glykosylierung durch Säugetierzellen erfolgte.

#### Beispiel VII

##### Hemmung der HIV-Infektion durch blockierende Peptide

Die Wirksamkeit von blockierenden Peptiden bei der Hemmung von Gewebekulturzellen durch den LAV<sub>BRU</sub>-Stamm des HIV wurde studiert, wobei eine modifizierte Arbeitsvorschrift für die Auswahl des Peptides T verwendet wurde, wie sie durch Pert et al., *supra*, publiziert wurde. Die bevorzugten HIV-Hemmungstests umfassen die Kombination von gleichen Volumen von blockierenden Peptiden und CEM-Zellen ( $2,5 \times 10^5$ ) im Medium (RPMI, 10% FCS und 2 mg/ml Polybren) und die Inkubation während 45 Min. bei 37°C. Das Virus wird dann in verschiedenen Dosen (10, 50, 500 TCID<sub>50</sub>) zugesetzt und die Mi-

schung während 14 Tagen bei 37°C inkubiert, wonach der Überstand auf eine Virus-Antigen-Produktion (z.B. die Anzahl p25) getestet wurde.

Die Wiederinkubation der CEM-Zellen mit den-Peptiden vor der Zugabe des Virus in die Kulturen erhöhten den Hemmungseffekt in den Tests. Die Hemmung erwies sich als abhängig von der Virusdosis, was die starke Aktivität bei niederen und mittleren Dosen, jedoch die geringere Aktivität bei höchsten Virusdosen zeigt.

Es wurde etwa 60 bis 90% Hemmung der Virus-Antigen-Produktion bei niederen Virusdosis-Experimenten mit dem Peptid T erzielt. Zusätzliche Experimente mit den Peptiden X–XV, typischerweise mit einem amidierten COOH-Terminus und einem acetylierten NH<sub>2</sub>-Terminus zeigten ähnliche Resultate, während das Peptid XI über einen breiten Dosisbereich besonders wirksam war. Die neutralisierenden Antikörper können entweder während der Preinkubationsperiode oder zur Zeit der Viruszugabe zugegeben werden, um eine zusätzliche oder synergistische Hemmung der viralen Antigenproduktion zu erreichen.

Aus dem vorhergehenden ist ersichtlich, dass die erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper und Peptide, einschliesslich der Blockierungspeptide verbesserte Verfahren für die Neutralisierung und/oder Hemmung von HIV-Infektionen ermöglichen. Dies erlaubt, dass leichter prophylaktische und therapeutische Zusammensetzungen entwickelt werden können, welche wirkungsvoll gegen Infektionen eingesetzt werden können, die durch die meisten, wenn nicht durch alle HIV-Stämme verursacht werden. Zusätzlich finden die neuen Materialien Anwendung in diagnostischen Tests und anderen wohlbekannten Verfahren.

Obschon die vorliegende Erfindung im einzelnen durch Erläuterungen und Beispiele zum Zwecke des klaren Verständnisses beschrieben ist, ist es offensichtlich, dass gewisse Änderungen und Modifikationen innerhalb des Geltungsbereiches der beiliegenden Ansprüche durchgeführt werden können.

Hinterlegungsdaten für die Mikroorganismen

Die folgenden Mikroorganismen, welche einen Teil der vorliegenden Erfindung darstellen, wurden bei der American Type Culture Collection, 12 301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20 852, USA, hinterlegt. Die Daten, welche die Hinterlegungen betreffend sind folgende:

Wissenschaftl. Beschreibung	Ref. des Hinterlegers	Ref. ATCC	Hinterlegungsdatum
Mäusehybridom (balb c/NS-1)	HIV-gp 110-1	HB 9175	15. August 1986
Mäusehybridom (balb c/NS-1)	HIV-gp 110-2	HB 9176	15. August 1986
Mäusehybridom (balb c/NS-1)	HIV-gp 110-3	HB 9177	15. August 1986
Mäusehybridom (balb c/NS-1)	HIV-gp 110-6	HB 9404	30. April 1987
Mäusehybridom (balb c/NS-1)	HIV-gp 110-4	HB 9405	30. April 1987
Mäusehybridom (balb c/NS-1)	HIV-gp 110-5	HB 9406	30. April 1987
Mäusehybridom (balb c/NS-1)	HIV-p 25-2	HB 9407	30. April 1987
Mäusehybridom (balb c/NS-1)	HIV-p 25-3	HB 9408	30. April 1987
Mäusehybridom (balb c/NS-1)	HIV-p 25-6	HB 9409	30. April 1987
Mäusehybridom (balb c/NS-1)	HIV-p 25-7	HB 9410	30. April 1987

Die Hybridome HB 9175, HB 9176 und HB 9177 wurden getestet und am 26. August 1986 als lebensfähig befunden. Die restlichen Hybridome wurden getestet und am 4. Mai 1987 als lebensfähig befunden.

**Patentansprüche**

1. Zusammensetzung für die Verwendung bei der Behandlung von HIV-Infektionen, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine therapeutisch wirksame Dosis mindestens eines monoklonalen Antikörpers, welcher fähig ist, spezifisch mit einem oder mehreren Epitopen des HIV zu reagieren und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger enthält.

2. Zusammensetzung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Epitope in den env- oder gag-Regionen des HIV-Genoms codiert werden.

3. Zusammensetzung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Epitope in den HIV-Proteinen gp110 oder p25 lokalisiert sind.

4. Zusammensetzung gemäss einem der Ansprüche 1–3, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich eines oder mehrere blockierende Peptide, welche fähig sind, die HIV-Infektiosität zu verringern und/oder monoklonale Antikörper, welche mit den Epitopen der genannten Peptide reaktiv sind, enthält.

5. Zusammensetzung gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich eine Mischung von monoklonalen Antikörpern enthält, welche mit verschiedenen Homologen der genannten Sequenz der blockierenden Peptide reaktiv sind.

6. Zusammensetzung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der monoklonale Antikörper mit mindestens einem Epitop von LAV<sub>BRU</sub> p25-Aminosäuresequenz 278 bis 319 und/oder Homologen davon reaktiv ist und ein zweiter Antikörper mit mindestens einem Epitop in der LAV<sub>BRU</sub> p25-Aminosäuresequenz 315 bis 363 und/oder Homologen davon, reaktiv ist.

5 7. Zusammensetzung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der monoklonale Antikörper mit mindestens einem Epitop von HIV reaktiv ist und ein zweiter Antikörper mit mindestens einem Epitop von HIV gp110 reaktiv ist.

8. Zusammensetzung gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das p25-Epitop in der LAV<sub>BRU</sub>-Aminosäuresequenz 278 bis 319 oder 315 bis 363 oder in Homologen von den genannten Sequenzen lokalisiert ist.

10 9. Zusammensetzung gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das gp110-Epitop in der LAV<sub>BRU</sub>-Aminosäuresequenz 308 bis 328 oder Homologen davon lokalisiert ist.

10. Zusammensetzung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie weiter einen monoklonalen Antikörper enthält, welcher fähig ist, mit einem blockierenden Peptid von HIV zu reagieren.

15 11. Zusammensetzung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie die nachstehenden Komponenten a) und b) enthält:

- 20 a) mindestens einen monoklonalen Antikörper, welcher mit einem Epitop von HIV reaktiv ist und  
 b) blockierendes Peptid, welches mindestens fünf nebeneinanderliegende Aminosäuren der folgenden HIV-gp110-Aminosäuresequenzen oder Homologen davon enthält:

IX (173)

25 Y-Ala-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Y'; oder

XV (191)

Y-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y',

30 worin Y und Y', falls vorhanden, je eine Aminosäuresequenz von bis zu 20 Aminosäuren darstellen.

12. Zusammensetzung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie die nachstehenden Komponenten a) und b) enthält:

- 35 a) einen monoklonalen Antikörper, welcher spezifisch für ein Epitop des HIV ist und  
 b) ein Peptid, enthaltend mindestens eine der folgenden Aminosäuresequenzen oder Homologen davon:

XI (187)

40 Y-Thr-Thr-Ser-Tyr-Thr-Y'; oder

XII (188)

Y-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Y; oder

45 XIII (189)

Y-Asn-Thr-Ser-Tyr-Gly-Y'; oder

XIV (190)

50 Y-Asp-Thr-Asn-Tyr-Ser-Y'; ,

worin Y und Y', falls vorhanden, je eine Aminosäuresequenz von bis zu 20 Aminosäuren darstellen.

55 13. Zusammensetzung gemäss Anspruch 10, worin das genannte blockierende Peptid mindestens eine antigenische Determinante definiert, welche fähig ist, Antikörper in einem Wirt hervorzurufen, wobei die genannten hervorgerufenen Antikörper protektiv gegen HIV-Infektionen sind.

60 14. Monoklonale Antikörper entsprechend den monoklonalen Antikörpern in Zusammensetzungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie fähig sind, spezifisch mit einem Epitop des HIV zu reagieren.

15. Monoklonale Antikörper gemäss Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Epitop im Hüllglykoprotein gp110 des HIV lokalisiert ist.

65 16. Monoklonale Antikörper gemäss Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das genannte Epitop die HIV-gp110-Aminosäuresequenz von 301 bis 336 oder 308 bis 328 oder Homologe der genannten Sequenzen umfasst.

17. Monoklonale Antikörper gemäss Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Epitop in HIV p25 lokalisiert ist.

18. Monoklonaler Antikörper gemäss Anspruch 14, welcher fähig ist, spezifisch mit einer antigenischen Determinante des HIV zu reagieren, wobei der monoklonale Antikörper die Bindung eines Antikörpers blockiert, welcher durch die Zelllinien mit den ATCC-Nrn. HB 9175, HB 9176, HB 9177, HB 9405, HB 9406, HB 9404, HB 9409 oder HB 9410 produziert wird.

19. Peptid von Epitopen des HIV, welches mit monoklonalen Antikörpern gemäss Anspruch 14 spezifisch reagiert, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens fünf aneinandergrenzende Aminosäuren der folgenden HIV-gp110-Aminosäuresequenzen oder Homologen davon enthält:

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.

20. Peptid gemäss Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die aneinandergrenzenden Aminosäuren mindestens eine antigenische Determinante bilden, welche fähig ist, Antikörper hervorzurufen, nach der Immunisierung eines Wirts, wobei die genannten Antikörper protektiv gegen HIV-Infektionen sind.

21. Peptid gemäss Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass es eine der folgenden HIV-gp110-Aminosäuren oder Homologe davon enthält:

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',

V (I77)

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

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 Y', wenn vorhanden, je eine Aminosäuresequenz von bis zu 20 Aminosäuren umfassen.

22. Peptid gemäss Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass Y und/oder Y' einen Aminosäurerest von Glycin, Tyrosin, Cystein, Lysin, Glutaminsäure oder Asparagin bedeuten.

23. Nukleinsäuresequenz, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Nukleinsäuresegment von ungefähr 150 Nukleotiden oder weniger enthält, welches ein Peptid von Epitopen des HIV codiert, mit welchen ein monoklonaler Antikörper gemäss Anspruch 14 spezifisch reagiert.

24. Nukleinsäuresequenz gemäss Anspruch 23, welche die Peptide der Ansprüche 19 oder 22 codiert.

25. Nukleinsäuresequenz gemäss Anspruch 23, welche zusätzlich ein blockierendes Peptid des HIV codiert.

26. Nukleinsäuresequenz gemäss Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid mindestens fünf Aminosäuren der LAVBRU-gp110-Aminosäuren 301 bis 336 oder LAVBRU-p25-Aminosäuresequenzen 278 bis 319 oder 315 bis 363 und der Homologen der Sequenzen enthält.

27. Probeplatte für die Verwendung bei diagnostischen Hybridisierungsversuchen, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens zwei Nukleinsäuresequenzen gemäss Anspruch 23 enthält, welche die Peptide gemäss der folgenden Tabelle I codieren:

TABELLE I

HXB2	TGTACAAGACCCCAACAACAATACACAGAAAAAGA.....ATCCGTATC	309
	CysThrArgProAsnAsnThrArgLysArg.....IleArgIle	309
BH102	-----Ser-----	309
BH8	-----Lys-----	309
HXB3	-----Lys-----	309
H9M	-----Ser-----	309
BRU	-----Ser-----	314
MAL	-----Gly-----ArgGly-----HisPhe	314
ELI	-----Ala-----TyrGln-----Gln-----ThrPro-----	310
ARV2	-----Ser-----	312
WMJ2	-----Tyr-----Val-----ArgSer-----LeuSer-----	306
RFENV	-----Ser-----	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

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65

FORTS. TABELLE I

HXB2	CAGAGA.....GGACCAGGAGAGCATTTGTTACAATAGGAAAATAGGAAATATG	326
	GlnArg.....GlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIleGlyAsnMet	326
BH102	-----	326
BH8	-----	326
HXB3	-----	326
H9M	-----	326
BRU	-----	331
MAL	.....Gln--LeuTyr--Thr--IleVal--AspIle	329
ELI	GlyLeu-----GlnSerLeuTyrThr--Arg--IleValSerArgSer	323
ARV2	.....His--Thr--Arg--IleGlyAsp	327
WMJ2	.....Arg--ArgGlu.....IleGlyIle	320
RFENV	.....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
LAV2	MetSer-----HisVal--HisSerHisTyrGlnProIle--Lys	323

5                    10                    15                    20                    25                    30                    35                    40                    45                    50                    55                    60                    65

CH 675 728 A5

	HXB2	...AGA...CAAGCACATTGT	
		...Arg...GlnAlaHisCys	331
5	BH102	-----	331
	BH8	-----	331
	HXB3	-----	331
10	H9M	-----	331
	BRU	-----	336
	MAL	-----Arg---Tyr---	334
15	ELI	IleIleGly-----	330
	ARV2	Ile---Lys...-----	333
20	WMJ2	Ile-----	326
	RFENV	Ile---Lys...-----	343
	Z6	Gly...-----	334
25	Z3	IleThrGly-----	326
	NY5	-----	325
	CDC42	Ile-----	341
30	LAV2	ArgProArg-----Met---	330

35 28. Impfstoff gegen eine HIV-Infektion, dadurch gekennzeichnet, dass er eine immunologisch wirksame Dosis eines oder mehrerer Peptide mit weniger als 50 Aminosäuren, welche die Epitope von gp110 und/oder P25 umfassen, mit denen monoklonale Antikörper gemäss Anspruch 14 spezifisch reagieren, enthält, wobei die genannten Peptide in Mischung mit einem physiologisch annehmbaren Träger vorliegen.

40 29. Impfstoff gemäss Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass er zusätzlich eine Sequenz von fünf Aminosäuren eines blockierenden Peptides enthält.

30. Immortalisierte Zelllinien zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 14, welcher fähig ist, mit einer antigenischen Determinante eines Hüllglykoproteins, welche in einem Epitop des HIV enthalten ist, zu reagieren.

45 31. Die Zelllinien HIV-gp110-1 mit der ATCC-Nr. HB 9175, HIV-gp110-2 mit der ATCC-Nr. HB 9176, HIV-gp110-3 mit der ATCC-Nr. HB 9177, HIV-gp110-4 mit der ATCC-Nr. HB 9405, HIV-gp110-5 mit der ATCC-Nr. HB 9406, HIV-gp110-6 mit der ATCC-Nr. HB 9404, HIV-p25-6 mit der ATCC-Nr. HB 9409 und HIV-p25-7 mit der ATCC-Nr. HB 9410 als immortalisierte Zelllinien gemäss Anspruch 30.

50 32. Monoklonaler Antikörper gemäss Anspruch 14, hergestellt durch eine Zelllinie gemäss Anspruch 31.

33. Verfahren zur Bildung von Zelllinien gemäss Anspruch 30, welche Antikörper produzieren, die mit antigenischen Determinanten des HIV-gp110 reaktiv sind, dadurch gekennzeichnet, dass einem Wirt eine immunogene Menge eines Antigen-Präparates verabreicht wird, welches an HIV-Proteinen angereichert ist, der immunisierte Wirt auf die Produktion von Antikörpern, welche mit gp110-Antigen-Determinanten reaktiv sind, geprüft wird, die antikörper-produzierenden Zellen des Wirts gewonnen werden und die gewonnenen Zellen immortalisiert werden, aus den immortalisierten Zellen diejenigen, welche HIV-gp110 produzieren ausgewählt werden und die immortalisierten Zellen zur Herstellung der Zelllinien geklont werden.

60 34. Verfahren gemäss Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass die HIV-Proteine rekombinante Fusionsproteine sind, welche durch einen eukaryontischen oder bakteriellen Wirt exprimiert werden oder dass die HIV-Proteine von einem Extrakt oder Lysat von HIV extrahiert werden.

65 35. Verfahren für die Diagnose der Gegenwart von HIV in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, dass ein monoklonaler Antikörper gemäss Anspruch 14, welcher fähig ist, mit HIV-gp110 zu reagieren, mit einer biologischen Probe inkubiert wird und die Gegenwart des Immunkomplexes, welcher mit dem monoklonalen Antikörper und der antigenischen Determinante der biologischen Probe gebildet

wird, nachgewiesen wird und daraus die Gegenwart oder die Abwesenheit von HIV in der Probe bestimmt wird.

36. Verfahren gemäss Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass der monoklonale Antikörper fähig ist, mit einem Epitop oder einem blockierenden Peptid von gp110 zu reagieren.

5 37. Verfahren für die Diagnose der Gegenwart von Antikörpern gegen das HIV in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, dass ein Peptid gemäss Anspruch 19 eines Epitops von HIV-gp110 oder p25 mit der biologischen Probe inkubiert wird und die Gegenwart des Immunkomplexes, welcher zwischen dem Peptid und den Antikörpern gebildet wird, in der mit dem Peptid reaktiven Probe nachgewiesen wird und daraus die Gegenwart oder die Abwesenheit von HIV in der Probe bestimmt wird.

10 38. Verfahren für die Diagnose der Gegenwart von HIV in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, dass eine Nukleinsäuresequenz gemäss Anspruch 23, welche mindestens einen Teil eines Epitops von HIV codiert, mit Nukleinsäure in der biologischen Probe unter hybridisierenden Bedingungen inkubiert wird und die Gegenwart des Hybridkomplexes, welcher zwischen dem Nukleinsäuresegment und der Nukleinsäure in der Probe gebildet wird, nachgewiesen wird und daraus die Gegenwart oder Abwesenheit von HIV in der Probe bestimmt wird.

15 39. Verfahren zur Bestimmung eines HIV-Stammes in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe mit einem Peptid gemäss Anspruch 19 eines Epitops von HIV inkubiert wird und die Gegenwart des Immunkomplexes zwischen dem Peptid und dem Antikörper in der Probe nachgewiesen wird und daraus der Stamm des HIV bestimmt wird.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65