



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **300462**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 07 K 16/10, C 12 P 21/08, C 12 N 5/20,
G 01 N 33/569

Patentstyret

(21) Søknadsnr	873495	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	19.08.87	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	19.08.87	(30) Prioritet	20.08.86, US, 898273
(41) Alm. tilgj.	22.02.88		01.05.87, US, 45026
(45) Meddelt dato	02.06.97		29.06.87, US, 67996
(83) Mikroorganisme deponert:	ATTC nr. HB 9175, HB 9176, HB 9177, HB 9404, HB 9405, HB 9406, HB 9407, HB 9408, HB 9409, HB 9410		

(73) Patenthaver Genetic Systems Corp, 3005 First Avenue, Seattle, WA 98121, US
(72) Oppfinner Mary Kathleen Shriver, Bellevue, WA, US
Elaine K. Thomas, Seattle, WA, US
Wesley L. Cosand, Bothell, WA, US
Larry H. Gosting, Snohomish, WA, US
Edna S. Dickinson, Seattle, WA, US
Janela McClure, City of Vashon Island, WA, US
George J. Todaro, Seattle, WA, US
Robert C. Nowinski, Seattle, WA, US
(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS, 0306 OSLO

(54) Benevnelse **Monoklonale antistoffer og peptider som kan anvendes til diagnose av HIV-infeksjoner**

(56) Anførte publikasjoner WO 86/02383

(57) Sammendrag

Metoder og preparat for HIV-diagnose og behandling under anvendelse av monoklonale antistoffer som er reaktive med én eller flere nøytraliserende regioner av HIV-proteiner, under anvendelse av peptider eller homologer derav fra denne region, og under anvendelse av beslektede nucleinsyresegmenter og blokkerende peptider. Eksempler på nøytraliserende regioner innbefatter utvalgte deler av env- og gag-genene fra forskjellige HIV-isolater. Monoklonalt antistoffutskillende celledinjer innbefatter HIV-gp110-1, -2, -3, -4, -5 og -6 (hhv. A.T.C.C. deponeringsnr. HB9175, HB9176, HB9177, HB9405, HB9406 og HB9404) og HIV-p25-2, -3, -6 og -7 (hhv. A.T.C.C. deponeringsnr. HB9407, HB9408, HB9409 og HB9410).

Foreliggende oppfinnelse angår generelt in vitro diagnose av virusinfeksjoner. Nærmere bestemt angår oppfinnelsen monoklonale antistoffer som kan anvendes ved in vitro diagnose av Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infeksjoner.

Det infektiøse middel som er ansvarlig for Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) og dets prodromalfaser, AIDS-relatert kompleks (ARC) og lymfadenopatisyndrom (LAS), er et hittil ukjent lymfotrofisk retrovirus. Viruset er vekselvis blitt betegnet LAV, HTLV-III, ARV og i senere tid HIV.

Etter hvert som utbredelsen av HIV når pandemiske proporsjoner, blir behandlingen av infiserte individer og forebyggelsen av transmisjon til uinfiserte individer med risiko for eksponering av meget stor betydning. Forskjellige terapeutiske strategier har vært rettet mot forskjellige stadier i virusets livssyklus, og disse omtales i Mitsuya og Broder, 1987, Nature 325:773. Ved en metode anvendes antistoffer som bindes til viruset og inhiberer virusreplikasjon enten ved å interferere med virusets inn-trengning i vertceller, eller ved hjelp av andre mekanismer. Når først den eller de viruskomponenter som mistenkes for antistoffintervensjon er identifisert, håper man at antistofftitere som er tilstrekkelige til å nøytralisere virusets infeksjonsevne, vil kunne fremkalles ved vaksinasjon eller ved passiv administrering av immunoglobuliner eller monoklonale antistoffer med den ønskede spesifisitet.

De glycoproteiner som omgir de fleste retrovirus, menes å reagere med reseptormolekyler på overflaten av mottagelige celler, hvorved virusets infeksjonsevne overfor visse verter fastlegges. Antistoffer som bindes til glycoproteinene, kan blokkere virusets interaksjon med cellereseptorene, idet de nøytraliserer virusets infeksjonsevne. Se generelt The Molecular Biology of Tumor Viruses, 534 (J. Tooze, utgitt 1973) og RNA Tumor Viruses, 226, 236

(R. Weiss et al., utgitt 1982). Se også Gonzalez-Scarano et al., 1982, *Virology* 120:42 (La Crosse Virus), Matsuno og Inouye, 1983, *Infect. Immun.* 39:155 (Neonatal Calf Diarrhea Virus) og Mathews et al., 1982, *J. Immunol.*, 129:2763 (Encephalomyelitis-virus).

Den generelle struktur av HIV er en ribonucleo-proteinkjerne omgitt av et lipidholdig svøp som viruset under celleavsnøringen erverver fra den infiserte vertcelles membran. Innleiret i svøpet og ragende ut derfra finner man de viralt innkodede glycoproteiner. HIV's svøp-glycoproteiner syntetiseres innledningsvis i den infiserte celle som et forløpermolekyl på 150.000-160.000 dalton (gp150 eller gp160) som deretter behandles i cellen til et N-terminalfragment på 110.000-120.000 dalton (gp110 eller gp120) til utvikling av det eksterne glycoprotein, og et C-terminalfragment på 41.000-46.000 dalton (gp41) som representerer transmembransvøp-glycoproteinet.

Av de ovenfor diskuterte årsaker har HIV's gp110 glycoprotein vært gjenstand for utstrakt forskning som et potensielt mål for avbrytelse av virusets livssyklus. Sera fra HIV-infiserte individer er blitt vist å nøytralisere HIV in vitro, og antistoffer som bindes til renset gp110, finnes i seraene. Robert-Guroff et al., 1985, *Nature* 316:72, Weiss et al., 1985, *Nature* 316:69 og Mathews et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:9709. Renset og rekombinant gp110 stimulerte produksjon av nøytraliserende serumantistoffer ved anvendelse for immunisering av dyr, Robey et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:7023, Lasky et al., 1986, *Science* 233:209 og et menneske, Zagury et al., 1986, *Nature* 326:249. Binding av gp110-molekylet til CD4- (T4) reseptoren er også blitt vist, og monoklonale antistoffer som gjenkjenner visse epitoper av CD4-reseptoren, er blitt vist å blokkere HIV-binding, syncytia-dannelse og infeksjonsevne. McDougal et al., 1986, *Science* 231:382. Putney et al. (1986, *Science* 234:1392) fremkalte nøytraliserende serumantistoffer i dyr etter immunisering med et rekombinant fusjonsprotein inneholdende carboxylterminalhalvdelen av gp110-molekylet, og

viste ytterligere at glycosylering av svøpproteinet er unødvendig for en nøytraliserende antistoffreaksjon.

En subenhetsvaksine mot AIDS under anvendelse av HIV gp110-molekylet eller deler derav, kan således være ønskelig. Subenhetsvaksiner er et alternativ til vaksiner fremstilt fra inaktiverte eller svekkede vira. Inaktiverte vaksiner er bekymringsfulle på grunn av risikoen for at ikke alle viruspartiklene er blitt drept, og svekkede vira kan være i stand til å mutere og gjenvinne deres sykdomsfremkallende evne. Ved subenhetsvaksiner anvendes bare de deler av viruset som inneholder antigener eller epitoper som er i stand til å fremkalle immunreaksjoner, dvs. nøytraliserende antistoffer, ADCC og cytotoksisk T-celle-reaksjon, til immunisering av verten. En vesentlig fordel ved subenhetsvaksiner er at irrelevant virusmateriale er utelukket.

Virussubenheter til bruk i en vaksine kan fremkalles på flere forskjellige måter. Eksempelvis kan svøpglycoproteinet uttrykkes og renses fra en bakterievert selv om dette molekyl vil mangle de fleste post-translateringsmodifikasjoner (slik som glycosylering) eller en annen behandling. En slik modifikasjon kan oppnås ved hjelp av et eukaryotisk ekspresjonssystem slik som gjær eller dyrkede pattedyrceller. Virusgener er blitt innført i pattedyrceller ved anvendelse av vacciniavirus som vektor. Se f.eks. Mackett, M., et al., 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79:7415, Panicali, D. og Paoletti, E., 1982, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79:4927. Rekombinant vacciniavirus kan konstrueres ved fremgangsmåten ifølge Hu et al., Nature 320:537 (1986) eller Chakrabarti et al., Nature 320:535 (1986). I disse systemer glycosyleres virusglycoproteiner fremstilt fra celler infisert med rekombinant vaccinia på passende måte og kan transporteres til celleoverflaten for ekstrusjon og endelig isolering.

Et viktig trinn ved fremstilling av en subenhetsvaksine er passende rensing av det ønskede glycoprotein fra den komplekse blanding i ekspresjonssystemet. Flere metoder kan anvendes til denne rensing. Disse omfatter,

men er ikke begrenset til, preparativ polyacrylamidgel-
elektroforese, gelpermeeringskromatografi og forskjellige
kromatografiske metoder (dvs. ionebytting, revers fase,
immunoaffinitet, hydrofob interaksjon) og andre. De fleste
5 av disse metoder anvendes i forskjellige kombinasjoner
under dannelse av hovedsakelig rene preparater (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).

10 For fremstilling av subenhetsvaksiner er det behov
for fremgangsmåter hvorved antall trinn som kreves for å
oppnå maksimal rensing av et gitt virusantigen fra en
kompleks ekspresjonsblanding, reduseres. Den effektive
separasjon av antigenene fra uvedkommende komponenter kan
15 oppnås under anvendelse av immunoaffinitetskromatografi.
Denne teknikk som også er kjent som immunoadsorpsjon,
består i prinsippet av selektiv adsorpsjon av et antigen
til en fast bærer hvortil et spesifikt antistoff er kovalent
bundet. Det selektivt adsorberte antigen elueres deretter
20 fra en slik antistoffaffinitetsadsorbent ved forandring
av f.eks. bufferens pH og/eller ionestyrke.

Polyklonale antistoffer erholdt fra dyr immunisert
med det ønskede antigen eller fra naturlig infiserte
individer (se f.eks. Lasky et al., supra), er hyppig blitt
25 anvendt som immunoadsorbenter, men disse reagenser er
generelt beheftet med betydelige ulemper, slik som at
(i) ikke alle de til den uoppløselige bærer bundne anti-
stoffer er spesifikke for det molekyl som er av interesse,
hvilket nødvendiggjør ytterligere rensing, (ii) utbytter
30 av det ønskede antigen ofte er lave, og (iii) antistoff-
affiniteter ofte varierer fra den ene fremstilling til den
andre, hvilket krever modifisering av elueringsprosedyrene.
Disse vanskeligheter ville kunne unngås ved anvendelse av
monoklonale antistoffer som var spesifikke for det ønskede
35 virusantigen som skal anvendes i et subenhetsvaksine-
preparat, istedenfor polyklonale antistoffer.

Murine, monoklonale antistoffer som binder HIV-

antigener, er blitt beskrevet. Flere grupper har rapportert om monoklonale antistoffer som er spesifikke for kjerneprotein p25 (se f.eks. di Marzo Veronese, et al., 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:5199 og Chassagne, J., et al., 1986, J. Immunol. 136:1442). Monoklonale antistoffer som er spesifikke for membranglycoproteinet gp41, er også blitt beskrevet (se f.eks. di Marzo Veronese, et al., 1985, Science 229:1402).

Innenfor området eksisterer det stadig et behov for monoklonale antistoffer som er spesifikke for epitoper innenfor veldefinerte områder av hoved-svøpglycoproteinet gp110. Monoklonale antistoffer som bindes til disse områder og fremkaller en reduksjon eller eliminering av HIV's replikasjon og transmisjonsevne, ville således ha betydelig terapeutisk og profylaktisk anvendelighet. De monoklonale antistoffer ville også kunne anvendes til rensing av det ønskede område av gp110 fra oppbrutt virus eller rekombinante ekspresjonssystemer for bruk i f.eks. vaksiner. Dessuten ville det område som inneholder den eller de epitoper som gjenkjennes av de monoklonale antistoffer, kunne syntetiseres kjemisk, hvorved de vanskeligheter som oppstår ved rensing og administrering av større fragmenter av gp110-molekylet, kunne unngås. Foreliggende oppfinnelse oppfyller disse og andre lignende behov.

Peptider som er i stand til immunologisk å etterligne nøytraliserende epitoper av HIV-proteiner, nucleinsyreprober som koder for slike peptider, og monoklonale antistoffer som kan reagere med slike peptider samt andre peptider som interfererer med HIV infeksjonsevne, tilveiebringes således. Disse hittil ukjente materialer finner f.eks. anvendelse ved diagnostiske analyser til påvisning av HIV-infeksjoner, og i terapeutiske forskrifter for behandling av eller vaksinasjon mot slike infeksjoner.

Foreliggende oppfinnelse angår inhibering av dannelsen eller den cellulære transmisjon av infeksjons HIV i en vert. Nærmere bestemt anvendes peptider som etterligner et nøytraliserende område av HIV og monoklonale antistoffer som

kan reagere med et slikt område for diagnose av HIV-infeksjoner. I dette henseende indikerer uttrykket "nøytraliserende område" de deler av HIV, i særdeleshet HIV-proteiner, som inneholder aminosyresegmenter som definerer én eller
5 flere epitoper som kan reagere med antistoffer, som enten individuelt eller i kombinasjon med andre antistoffer er i stand til å nøytralisere HIV-infeksjoner. Egnede analyser for nøytralisering er velkjente og kan innbefatte reduksjon av HIV-infeksjoner i T-cellelinjer, reduksjon av plakkdannende enheter av VSV(HIV) pseudotyper som bærer HIV svøpglycoproteiner, tester og syncytial inhibering og virionreseptorbindingstester. Den nøytraliserende aktivitet kan sammenlignes med antistoffreaktiviteten ved immunokjemiske tester slik som immunofluorescens-, immunoavtrykks- og radioimmunutfellingsanalyse.
15

Oppfinnelsen angår således et monoklonalt antistoff, hvilket antistoff er kjennetegnet ved at det nøytraliserer HIV ved spesifikt å reagere med en gp110 nøytraliserende epitop innenfor HIV-området fra aminosyre 301-336 av LAV som har
20 sekvensen II (29a)

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-
25 Ile-Gly-Lys-Ile-Gly-Asn-Met-Arg-Gln-Ala-His-Cys

og homologer derav. Oppfinnelsen angår også cellelinjer som er kjennetegnet ved at de er HIV-gp110-1, ATCC HB9175, HIV-gp110-2, ATCC HB9176, HIV-gp110-3, ATCC HB9177, HIV-gp110-4,
30 ATCC HB9405, HIV-gp110-5, ATCC HB9406, HIV-gp110-6, ATCC HB9404, HIV-p25-6, ATCC HB9409, HIV-p25-7 og ATCC HB9410. Oppfinnelsen angår sluttelig anvendelse av monoklonale antistoffer ved in vitro diagnose av HIV.

(a) aminosyresekvensene av HIV-isolater og LAV_{BRU} kan bringes på linje for å oppnå maksimal homologi mellom de to sekvenser;

(b) peptider omfattende HIV-isolaters aminosyresekvenser svarende til lokaliseringen av LAV_{BRU}-peptider som immunologisk etterligner LAV_{BRU}-protiner, kan identifiseres. De således identifiserte peptider omfattende HIV-isolataminosyresekvenser, vil typisk immunologisk etterligne tilsvarende HIV-isolatproteiner.

Denne metode kan anvendes til HIV-stammer som ennå ikke er oppdaget. Når nye stammer av HIV identifiseres, kan f.eks. deres svøp- og kjerneaminosyresekvenser bringes på linje med LAV_{BRU}'s for å oppnå maksimal homologi. De metoder hvorved sekvensene bringes på linje, er kjente for fagmannen. Når sekvensene bringes på linje, ønskes det å bibeholde så stor homologi som mulig mellom cysteinrester. Aminosyresekvensen av den nye HIV-stamme eller art som svarer til lokaliseringen av de her spesifikt beskrevne peptider, kan syntetiseres og anvendes i overensstemmelse med oppfinnelsen.

En annen metode for bestemmelse av sekvenser av et homologt område i andre HIV-stammer, beskrives av Scharf et al., Science (1986) 233:1076. Denne anvender to oligonucleotidprimere som bindes til bevarte sekvenser utenfor det sekvensområde som er av interesse, og inneholder forskjellige restriksjonsposisjoner i hver primer. DNA fra HIV-stammer kan deretter forsterkes in vitro, hvorefter de resulterende oligonucleotider kan klones i vektorer for sekvensanalyse og inkorporeres i en vaksine som en kassett som representerer en særlig epitope fra HIV-stammen.

Det er ikke nødvendig at de i slike sekvenser inneholdte epitoper er kryssreaktive med antistoffer for alle stammer eller arter av HIV. Peptider som omfatter immunologiske epitoper som skjelner en art eller serogruppe fra en annen, vil kunne anvendes til identifisering av særlige arter eller serogrupper, og kan i realiteten hjelpe til med å identifisere individer infisert med én eller flere arter eller serogrupper av HIV.

• De peptider som er av interesse, vil fortrinnsvis stamme fra virusets gp110-område. Av særlig interesse i dette område er peptider kodet innenfor den åpne env leseramme som strekker seg fra omkring basepar (bp) 6667 til 5 omkring 6774 i LAV_{BRU}-isolatet. Forskjellige homologe områder av andre HIV-isolater innbefatter således de homologe sekvenser oppnådd fra Los Alamos Data Bank (med unntak av LAV2) som angitt i tabell I.

10 Blant andre peptider som er egnet til utvikling av eller screening for monoklonale antistoffer, er slike som kodes i den åpne env leseramme fra omkring bp 7246 til omkring 7317 i LAV_{BRU}. Slike antistoffer og reaktive peptider er spesielt anvendbare til immunoanalyser.

15

20

25

30

35

Tabell I

HXB2	TGTACAAGACCCAACAACAATACAAGAAAAAGA.....ATCCGTATC	
	CysThrArgProAsnAsnAsnThrArgLysArg.....IleArgIle	309
BH102	-----Ser-----	309
BH8	-----Lys-----	309
HXB3	-----Lys-----	309
H9M	-----Ser-----	309
BRU	-----Ser-----	314
MAL	-----Gly-----ArgGly-----HisPhe	314
ELI	---Ala---TyrGln---Gln---ThrPro---	310
ARV2	-----Ser-----Tyr---	312
WMJ2	-----Tyr-----Val---ArgSer-----LeuSer---	306
RFENV	-----Ser-----ThrLys---	322
Z6	-----TyrLys-----GlnSer-----ThrPro---	311
Z3	-----GlySerAspLysLysIle-----GlnSer---	306
NY5	-----Lys---Gly-----Ala---	304
CDC42	-----His-----ValThrLeu.....	320
LAV2	-----Gly---Lys---Val---Gln-----MetLeu	302
HXB2	CAGAGA.....GGACCAGGGAGAGCATTGTTACAATAGGAAAAATAGGAAATATG	
	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
HXB2	...AGA...CAAGCACATTGT	
	...Arg...GlnAlaHisCys	331
BH102	-----	331
BH8	-----	331
HXB3	-----	331
H9M	-----	331
BRU	-----	336
MAL	-----Arg---Tyr---	334
ELI	IleIleGly-----	330
ARV2	Ile---Lys...-----	333
WMJ2	Ile-----	326
RFENV	Ile---Lys...-----	343
Z6	Gly...-----	334
Z3	IleThrGly-----	326
NY5	-----	325
CDC42	Ile-----	341
LAV2	ArgProArg-----Met---	330

I LAV_{BRU}-isolatets gag-område er p25 aminosyre-sekvensene fra omkring 278 til 319 og 315 til 363 ytterligere nøytraliserende områder av HIV. Fagmannen vil forstå at ytterligere nøytraliserende områder av HIV kan identifiseres på grunnlag av de her angitte anvisninger, i særdeleshet kombinasjoner av monoklonale antistoffer som reagerer med forskjellige HIV-epitoper, vil utvise nøytraliserende aktivitet.

Koden for peptid I, også kalt peptid 29, befinner seg i den åpne env leseramme fra omkring aminosyrerest 308 til omkring 328, og peptidet vil ha følgende aminosyre-sekvens hvor oligopeptider innbefattet i den etterfølgende sekvens, vil innbefatte lineære epitoper innenfor en slik sekvens:

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'

hvori Y og Y', når disse forefinnes, hver betegner sekvenser på opptil ca. 20 aminosyrer. Når Y og/eller Y' er til stede, kan de f.eks. omfatte én eller flere aminosyrer fra sekvenser som flankerer aminosyrerest nr. 308 til 328 i HIV svøpsekvensen eller en hvilken som helst del av disse flankesekvenser. Eksempelvis kan Y omfatte hele LAV_{BRU}-svøpaminosyresekvensen fra omkring rest nr. 301 til 307 eller deler derav, og Y' kan omfatte hele LAV_{BRU}-svøpaminosyresekvensen fra omkring rest nr. 329 til nr. 336, eller deler derav, som følger:

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.

Alternativt kan avkortede sekvenser av peptider ifølge oppfinnelsen fremstilles. I dette henseende kan følgende sekvenser av peptid 29 være spesielt anvendelige:

5 III (29b)

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

10 hvori Y og/eller Y', når disse er til stede, hver især representerer sekvenser på opptil tyve aminosyrerester.

IV (29c)

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

15 hvori Y og Y', når disse er til stede, hver især representerer sekvenser på opptil tyve aminosyrerester.

I en annen utførelsesform innkodes homologe områder av ARV-2-isolatet av særlig interesse i den åpne env lese-ramme fra omkring aminosyrerest nr. 306 til omkring nr. 323, og vil typisk ha følgende aminosyresekvens hvor oligopeptider innbefattet i følgende aminosyresekvens, vil innbefatte lineære epitoper med en slik sekvens:

25 V (177)

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

30 hvori Y og Y', når disse er til stede, hver især representerer inntil ca. tyve aminosyrerester eller flere. Når Y og/eller Y' er til stede, kan de omfatte én eller flere aminosyrerester fra sekvenser som flankerer aminosyrerest nr. 306 til 323 i ARV-2-svøpsekvensen, eller en hvilken som helst del av disse flankeringssekvenser. Spesielt kan Y omfatte hele HIV-svøpaminosyresekvensen fra omkring 35 nr. 299 til 306 eller deler derav, Y' kan omfatte hele HIV-svøpaminosyresekvensen fra rest nr. 324 til 333.

Alternativt kan avkortede sekvenser av peptid V

fremstilles. I dette henseende kan følgende sekvenser være spesielt verdifulle:

5

VI (177a)

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

VII

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

10

hvori Y og/eller Y', når disse er til stede, hver representerer sekvenser på opptil tyve eller flere aminosyrerester.

15

Et ytterligere eksempel omfatter homologe områder av LAV-2-isolatet, f.eks. som det innkodes i den åpne env leseramme fra aminosyrerest nr. 311 til 330 og vil typisk ha følgende sekvens:

VIII (110-2-2)

20

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

25

hvori Y og/eller Y', når disse er til stede, hver især representerer sekvenser på opptil tyve eller flere aminosyrerester. (Se Nature 326:662 (1987)).

30

De monoklonale antistoffer er i stand til selektivt ved ekstremt høye titere (fra 10^2 til 10^4 til 10^7 eller mer) å gjenkjenne nøytraliserende områder inneholdt i en på forhånd bestemt sekvens av svøpglycoprotein gp110 eller p25, deres proteinforløpere, biologisk uttrykte, rekombinante fusjonsproteiner og syntetiske peptider som inneholder én eller flere epitoper i det på forhånd bestemte sekvensområde av gp110 eller p25. De angjeldende hybridceller har et identifiserbart kromosom hvori kimlinje DNA'et er omleiret til å kode for et antistoff med et bindingssted for en epitop for gp110 eller p25 som er felles for visse kliniske HIV-isolater eller alle. Disse monoklonale antistoffer kan

35

anvendes til diagnose og til identifisering av andre kryss-reaktive antistoffer slik som blokkerende antistoffer.

Frembringelse av monoklonale antistoffer

5 Fremstilling av monoklonale antistoffer kan utføres ved udødeliggjørelse av ekspresjonen av nucleinsyresekvenser som koder for antistoffer som er spesifikke for HIV, ved innføring av slike sekvenser, typisk cDNA, som koder for antistoffet, i en vert som kan dyrkes i kultur. Den udøde-
10 liggjorte cellelinje kan være en pattedyrcellelinje som er blitt transformert via onkogenese, ved transfeksjon, mutasjon eller lignende. Blant slike celler er myelomalinjer, lymfomalinjer eller andre cellelinjer som er i stand til å understøtte ekspresjonen og utskillelsen av antistoffet
15 in vitro. Antistoffet kan være et naturlig forekommende immunoglobulin fra et pattedyr, hvilket er fremstilt ved transformasjon av en lymfocytt, i særdeleshet en splenocytt, ved hjelp av et virus eller ved fusjon av lymfocytten med en neoplastisk celle, f.eks. en myeloma under dannelse av
20 en hybridcellelinje. Splenocytten vil typisk stamme fra et dyr immunisert mot HIV-viruset eller et fragment derav inneholdende et epitopt sted.

Immuniseringsforskrifter er velkjente og kan variere betydelig, men likevel være effektive. Se Goding, Monoclonal
25 Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 2. utgave (1986). Brutt virus, syntetiske peptider og bakteriefusjonsproteiner som inneholder antigeniske fragmenter av gp110- eller p25-molekylet, kan anvendes som immunogener. Immunogenet av brutt virus, peptider eller
30 rekombinantproteiner, vil fortrinnsvis være beriket med hensyn til proteiner eller fragmenter derav inneholdende de epitoper til hvilke antistoffproduserende B-celler eller splenocytter ønskes. Nærmere bestemt kan oppløsninger inneholdende brutte viruslysater eller ekstrakter eller
35 supernatanter av biologisk uttrykte rekombinante proteiner eller brutte ekspresjonsvektorer om ønsket være beriket med hensyn til glycoproteiner ved anvendelse av metoder slik som f.eks. polyacrylamidgelelektroforese. Lecitin-

• affinitetsrensing er en foretrukket og hensiktsmessig metode for rensing av gp110 og andre glycoproteiner, f.eks. affinitetsrensing ved hjelp av lentillectin. Den grad hvortil glycoproteinene renses fra løsningene for bruk som immunogen, kan variere sterkt, dvs. fra mindre enn 50%, vanligvis eller minst 75% til 95%, fortrinnsvis 95% til 99%, og helst til absolutt homogenitet.

Når først proteinene er blitt rensset i den ønskede grad, kan de suspenderes eller fortynnes i en passende fysiologisk bærer for immunisering, eller de kan kobles til en adjuvans. En foretrukket teknikk innbefatter f.eks. adsorpsjon av proteinene og fragmentene derav på lentillectinagarose eller en annen makromolekylær bærer for injeksjon. Immunogene mengder av antigeniske preparater anriket med hensyn til HIV-proteiner innbefattende gp110-glycoprotein og p25-kjerneprotein, eller antigeniske deler derav, injiseres vanligvis i konsentrasjoner i området fra 1 µg til 20 mg/kg vert. Administreringen kan skje ved injeksjon, f.eks. intramuskulært, peritonealt, subkutant, intravenøst etc. Administreringen kan skje en eller flere ganger, vanligvis med 1 til 4 ukers mellomrom. Immuniserte dyr overvåkes for produksjon av antistoff mot de ønskede antigener, hvoretter miltene fjernes, og milt B-lymfocytter isoleres og fusjoneres med en myelomacellelinje eller transformeres. Transformasjonen eller fusjoneringen kan utføres på konvensjonell måte, og fusjoneringsteknikken er beskrevet i et stort antall patentskrifter, f.eks. US patentskrifter nr. 4.172.124, 4.350.683, 4.363.799, 4.381.292 og 4.423.147. Se også Kennett et al., Monoclonal Antibodies (1980) og de deri anførte referanser, samt Goding, supra.

De udødeliggjorte cellelinjer kan klones og screenes i overensstemmelse med konvensjonelle teknikker, og de antistoffer i celledsupernatantene som er i stand til å bindes til de ønskede gp110- eller p25 HIV-virusproteiner, rekombinante fusjonsproteiner eller syntetiske peptider som inneholder det ønskede epitopeområde, kan påvises. De

passende udødeliggjorte cellelinjer kan deretter dyrkes in vitro eller injiseres i peritonealhulen på en passende vert for dannelse av ascitesvæske. I kraft av at man har enkelte antistoffer som er kjent for å være spesifikke
5 for epitoper inneholdt f.eks. i de områder som kodes for av LAV_{BRU}-genområdet fra omkring bp6688 til omkring bp6750 (koder for peptid 29) eller fra omkring bp7246 til omkring 7317 (koder for peptid 36) (bp-nummerering i henhold til Wain-Hobson et al., Cell 44:9, 1985), kan supernatantene
10 screenes i konkurranse med de angjeldende, monoklonale antistoffer ved en konkurrerende analyse. Ytterligere udødeliggjorte hybridomacellelinjer med de ønskede bindingskarakteristika kan således lett fremstilles fra en rekke kilder på grunnlag av tilgjengeligheten av antistoffer
15 som er spesifikke for det bestemte antigen. Alternativt kan disse cellelinjer fusjoneres med andre neoplastiske B-celler hvor slike andre B-celler kan tjene som resipienter for genomt DNA som koder for antistoffet.

Selv om neoplastiske B-celler fra gnagere, og i
20 særdeleshet av murin opprinnelse foretrekkes, kan andre pattedyrarter anvendes slik som lagomorfa, kveg, sau, hest, svin, fjærkre eller lignende. Disse dyr kan lett immuniseres, og deres lymfocytter, og i særdeleshet splenocytene, kan oppnås til fusjoner.

Det av de transformerte cellelinjer eller hybrid-
cellelinjer utskilte monoklonale antistoff, kan være av en hvilken som helst av immunoglobulinklassene eller -under-
klassene slik som IgM, IgD, IgA, IgG₁₋₄ eller IgE. Da IgG
30 er den mest alminnelig anvendte isotype ved diagnostiske analyser, foretrekkes den oftest. De monoklonale antistoffer kan anvendes intakte eller som fragmenter, slik som Fv, Fab, F(ab')₂, men anvendes vanligvis intakte.

For å unngå den mulige antigenisitet av et mono-
klonalt antistoff som stammer fra et annet dyr enn mennesket
35 i en human vert, kan det konstrueres kimære antistoffer hvori antigenbindingsfragmentet av et immunoglobulinmolekyl

- (variabelt område) forbindes med en peptidbinding med i det minste en del av et annet protein som ikke gjenkjennes som fremmed av mennesker, slik som den utdrevne del av et humant immunoglobulinmolekyl. Dette kan oppnås ved å fusjonere variable dyreområdeexoner med humane kappa eller gamma konstante regionexoner. Forskjellige teknikker er kjent for fagmannen, slik som de som er beskrevet i PCT 86/O1533, EP171496 og EP173494.

10

Anvendelse av monoklonale antistoffer til immunoaffinitetsrensing

Monoklonale antistoffer som er spesifikke for polypeptider inneholdende gp110 eller andre antigeniske determinanter, i særdeleshet de antigeniske determinanter erholdt fra biologisk uttrykte rekombinerte fusjonsproteiner eller lysater eller ekstrakter av dyrket HIV, er spesielt fordelaktige å anvende ved rensingsforskrifter. Generelt vil antistoffene ha affinitetsassosiasjonskonstanter i størrelsesordenen 10^8 til 10^{12} M. Slike antistoffer kan anvendes til å rense de rekombinerte fusjonsproteiner fra dyrkningsmediet fra det rekombinante ekspresjonssystem hvis det uttrykte protein utskilles, eller fra komponentene i det brutte, biologiske ekspresjonssystem hvis de ikke utskilles. Generelt knyttes de monoklonale antistoffer som er i stand til å reagere med gp110 eller andre antigeniske determinanter, til eller immobiliseres på et substrat eller en bærer. Løsningen inneholdende de HIV-antigeniske determinanter, bringes deretter i kontakt med det immobiliserte antistoff under betingelser som er egnet til dannelse av immunkomplekser mellom antistoffet og polypeptidene inneholdende de gp110 antigeniske determinanter. Ubundet

35

materiale separeres fra de bundne immunkomplekser, hvilke komplekser eller gpl10 antigeniske fragmenter deretter separeres fra bæreren.

5 De monoklonale antistoffer vil typisk bli rensset grovt for ascitesvæske eller cellekultursupernatanter før binding til en bærer. Slike prosedyrer er velkjente for fagmannen og kan innbefatte fraksjonering med nøytrale salter i høy konsentrasjon. Andre metoder slik som DEAE-kromatografi, gelfiltreringskromatografi, preparativ gel-elektroforese eller protein A affinitetskromatografi, kan
10 også anvendes til rensing av det monoklonale antistoff før det anvendes som immunoadsorbant.

Bæreren til hvilken de monoklonale antistoffer immobiliseres, bør ha følgende generelle karakteristika:
15 (a) svak interakjon mellom proteiner generelt for å minimere ikke-spesifikk binding, (b) gode strømningskarakteristika som tillater gjennomstrømning av materialer med høy molekylvekt, (c) være i besittelse av kjemiske grupper som kan aktiveres eller modifiseres for å tillate kjemisk binding
20 av det monoklonale antistoff, (d) være fysisk og kjemisk stabile under de betingelser som anvendes til binding av det monoklonale antistoff, og (e) være stabile overfor de betingelser og komponenter som inngår i de buffere som er nødvendige for adsorpsjon og eluering av antigenet.

25 Enkelte generelt anvendbare bærere er agarose, derivatiserte polystyrener, polysaccharider, polyacrylamidperler, aktivert cellulose, glass og lignende. Det finnes forskjellige kjemiske metoder til binding av antistoffer til substratbærere. Se generelt Cuatrecasas, P., Advances in
30 Enzymology, 36:29 (1972). Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan knyttes direkte til bæreren eller via en sammenkjedings- eller avstandsarm.

35 Generelle betingelser for immobilisering av monoklonale antistoffer til kromatografiske bærere er velkjente for fagmannen. Se f.eks. Tijssen, P., 1985, Practice and Theory of Enzyme Immunoassay. Aktuelle koblingsprosedyrer vil avhenge litt av hvilke karakteris-

tika antistoffet som skal kobles, har og dets type. Monoklonale antistoffer har karakteristika som vanligvis er ensartet fra parti til parti, hvorved det er mulig at slike betingelser kan optimeres. Tilknytning finner typisk 5
sted ved hjelp av covalente bindinger.

En suspensjon av ekstrakter eller lysater av HIV-virus, supernatanten fra et dyrket biologisk ekspresjons-system eller en suspensjon av de brutte celler tilsettes deretter til separasjonsmatriksen. Blandingen inkuberes 10
under slike betingelser og i et tidsrom som er tilstrekkelig til at immunkompleksdannelse finner sted, vanligvis minst 30 minutter og mer vanlig fra 2 til 24 timer. Immunkompleksene inneholdende polypeptider med antigeniske deler av gp110 separeres deretter fra blandingen. Typisk fjernes 15
blandingene f.eks. ved eluering, og de bundne immunkomplekser vaskes grundig med adsorpsjonsbuffer. Immunkompleksene kan deretter elueres fra separasjonsmatriksen ved hjelp av et elueringsmiddel som er forenlig med den spesielle bærer som anvendes. Slike elueringsmidler er velkjente 20
for fagmannen. Polypeptidene inneholdende gp110 eller andre antigeniske deler, kan også fjernes selektivt. Eksempelvis kan peptider som inneholder en epitope som gjenkjennes av antistoffene, anvendes til å konkurrere om anti-stoffbindingsposisjonen, hvilket gir en alternativ eluerings- 25
teknikk som kan utføres under milde elueringsbetingelser. Det selektivt adsorberte polypeptid inneholdende gp110-antigenet, kan elueres fra et antistoffaffinitetsadsorpsjonsmiddel ved forandring av bufferens pH og/eller ione- 30
styrke. Chaotrope midler kan også anvendes ved fjerning av det bundne antigen. Valget av chaotropt middel, dets konsentrasjon og andre elueringsbetingelser, avhenger av karakteristika for antistoff-antigeninteraksjonen, men så snart disse er bestemt, skulle de ikke være gjenstand for forandringer som vanligvis er nødvendige i polyklonale 35
affinitetsseparasjonssystemer.

Det eluerte materiale kan kreve justering til en fysiologisk pH hvis buffere med lav eller høy pH-verdi

eller ionestyrke anvendes til separasjon av de bundne gp110-antigener fra separasjonsmatriksen. Dialyse eller gelfiltreringskromatografi kan også være nødvendig for å fjerne overskudd av salter anvendt i elueringsmidlet for å muliggjøre rekonstituering av gp110 eller polypeptider inneholdende antigeniske fragmenter av gp110 til naturlig oppbygning.

Fremgangsmåtene gir eksempelvis i det vesentlige rensset gp110 eller polypeptider inneholdende antigeniske fragmenter derav, fremstilt enten naturlig med infiserte cellekulturer eller med rekombinerte ekspresjonssystemer av bakterier, gjær eller dyrkede insekt- eller pattedyr-celler. gp110 og fragmentene eller andre rensede proteiner vil typisk, være mer enn 50% rene, mer vanlig minst 75% rene og hyppig mer enn 95 til 99% rene. Disse molekyler kan deretter finne anvendelse til mange forskjellige formål.

HIV gp110-proteinene, polypeptider inneholdende de antigeniske fragmenter derav eller andre proteiner som er vesentlig rensset ved fremgangsmåten, kan finne anvendelse til mange forskjellige formål, herunder i AIDS subenhetsvaksineformuleringer, hvori immunogenet omfatter en virksom dose av antigeniske determinanter av f.eks. gp110 eller et nøytraliserende område derav. Andre komponenter i formuleringen vil kunne innbefatte de antigeniske deler av HIV-proteiner eller glycoproteiner som stimulerer fremstillingen av antistoff (fortrinnsvis nøytraliserende antistoffer) i en immunisert vert, hvilke antistoffer er i stand til å beskytte mot etterfølgende infeksjon med HIV.

Diagnostiske anvendelser av monoklonale antistoffer

Monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen anvendes til diagnostiske formål. Til slike formål kan de enten være merket eller umerket. Diagnostiske analyser medfører typisk påvisning av dannelsen av et kompleks via bindingen av det monoklonale antistoff til et HIV-

antigen. Når de er umerket, kan antistoffene f.eks. finne
anvendelse til agglutineringsanalyser. Umerkede antistoffer
kan dessuten anvendes i kombinasjon med andre merkede anti-
stoffer (andre eller sekundære antistoffer) som kan reagere
5 med det monoklonale antistoff, slik som antistoffer som
er spesifikke for immunoglobulin. Alternativt kan de
monoklonale antistoffer være merket direkte. Vidt for-
skjellige markører kan anvendes slik som radionucleider,
fluorescensfrembringende midler, enzymer, enzymsubstrater,
10 enzymkofaktorer, enzyminhibitorer, ligander (i særdeleshet
haptener) etc. Tallrike typer av immunoanalyser er til-
gjengelig, og enkelte av analysene beskrives eksempelvis i
US patentskrifter nr. 3.817.827, 3.850.752, 3.901.654,
3.935.074, 3.984.533, 3.996.345, 4.034.074 og 4.098.876.

15 Vanligvis anvendes de monoklonale antistoffer
og peptidene ved enzymimmunoanalyser hvor f.eks.
de angjeldende antistoffer eller sekundære antistoffer
fra en annen art, konjugeres til et enzym. Når
en biologisk prøve inneholdende HIV-antigener, slik som
20 humant blodserum, saliva, sædvæske, vaginalsekreter eller
virusinfisert cellekultursuspensjon kombineres med de an-
gjeldende antistoffer, inntreffer det binding mellom anti-
stoffene og de molekyler som utviser den ønskede epitope.
Slike proteiner eller viruspartikler kan deretter separeres
25 fra de ubundne reagenser, og et sekundært antistoff (merket
med et enzym) tilsettes. Tilstedeværelsen av antistoff-
enzymkonjugat som spesifikt er bundet til antigenet, påvises
deretter. Andre konvensjonelle teknikker som er velkjente
for fagmannen, kan også anvendes.

30 Det kan også leveres sett eller utstyr til bruk
med de omhandlede antistoffer ved påvisning av HIV-infeksjon,
eller av tilstedeværelsen av HIV-antigen. De angjeldende
monoklonale antistoffpreparater kan således leveres,
vanligvis i lyofilisert form, enten alene eller i
35 forbindelse med ytterligere antistoffer som er spesi-
fikke for andre HIV-epitoper. Antistoffene som kan være
konjugert til en markør eller ukonjugerte, inkluderes

i settene eller utstyrene sammen med buffere slik som Tris, fosfat, carbonat etc., stabiliseringsmidler, biocider, inerte proteiner, f.eks. kvegserumalbumin eller lignende. Vanligvis vil disse materialer være til stede i en mengde på mindre enn ca. 5 vekt% basert på mengden av aktivt antistoff, og vanligvis til stede i en samlet mengde på minst ca. 0,001 vekt%, igjen basert på antistoffkonsentrasjonen. Det vil hyppig være ønskelig å inkludere et inert fordrøyningsmiddel eller eksipient for å fortynne de aktive bestanddeler hvor eksipienten kan være til stede i en mengde fra ca. 1 til 99 vekt% av det samlede preparat. Når et annet eller sekundært antistoff som er i stand til å bindes til det monoklonale antistoff anvendes, vil dette vanligvis forefinnes i en separat beholder. Det andre antistoff konjugeres typisk til en markør og formuleres på analog måte med de ovenfor beskrevne antistoffformuleringer.

Påvisning av gp110 eller p25-antigener, eller hele viruset i forskjellige biologiske prøver kan finne anvendelse ved diagnose av en verserende infeksjon med HIV-viruset. Biologiske prøver kan innbefatte, men er ikke begrenset til, blodserum, saliva, sædvæske, vevsbiopsiprøver (fra hjerne, hud, lymfekjertler, milt, etc.), cellekultursupernatanter, brutte, eukaryotiske og bakterielle ekspresjonssystemer og lignende. Det testes for tilstedeværelse av virus ved inkubering av det monoklonale antistoff med den biologiske prøve under betingelser som bidrar til immunkompleksdannelse, etterfulgt av påvisning av kompleksdannelse. I en utførelsesform påvises kompleksdannelse ved anvendelse av et sekundært antistoff som er i stand til å bindes til det monoklonale antistoff som typisk konjugeres til en markør og formuleres på analog måte med de ovenfor beskrevne antistoffformuleringer. I en annen utførelsesform bindes det monoklonale antistoff til en fast bærer som deretter bringes i kontakt med en biologisk prøve. Etter et inkubasjonstrinn tilsettes merket, monoklonalt antistoff til påvisning av det bundne antigen.

Fremstilling og anvendelse av syntetiske peptider

De nye peptider etterligner blant annet immunologisk proteinepitoper for hvilke det kodes av HIV-retroviruset, i særdeleshet epitoper innkodet i env- eller gag-områdene
5 av virusgenomet som koder for hhv. gp110 og p25. For å tilpasse variasjoner fra stamme til stamme blant forskjellige isolater kan det foretas justeringer for konservative substitusjoner og utvelgelse blant alternativene hvor det er tale om ikke-konservative substitusjoner. Disse pep-
10 tider kan anvendes som immunogener til inhibering eller eliminering av HIV-antigenproduksjon in vitro til påvisning av viruset eller av antistoffer mot viruset i en fysiologisk prøve. Avhengig av arten av forskriften kan peptidene være konjugert til en bærer eller andre for-
15 bindelser, merkede eller umerkede, bundet til en fast overflate eller lignende.

I en utførelsesform stammer peptider av interesse fra virusets gp110-område. Av særlig interesse er området i den åpne env leseramme som strekker seg fra ca. basepar
20 (bp) 6688 til ca. 6750, og ca. fra basepar 7246 til ca. 7317.

De interessante peptider, herunder blokkeringspeptider, vil innbefatte minst 5, av og til 6, av og til 8, av og til 12, av og til 21, vanligvis færre enn ca. 50,
25 og mer alminnelig færre enn ca. 35 og fortrinnsvis færre enn ca. 25 aminosyrer som er innbefattet i en sekvens for hvilken et HIV-retrovirus koder. Peptidet vil fordelaktig være så lite som mulig under fortsatt opprettholdelse av hovedsakelig hele immunoreaktiviteten eller den antivirale
30 aktivitet av det større peptid. I enkelte tilfeller kan det være ønskelig å sammenføre to eller flere oligopeptider som ikke er overlappende, under dannelse av en enkelt peptidstruktur, eller å anvende dem på samme tid som individuelle peptider som separat eller sammen gir ekvivalent sensi-
35 bilitet med utgangspunktet.

Peptidet kan modifiseres ved innføring av konserva-

tive substitusjoner i peptidet, idet vanligvis mindre enn 20 antallprosent og mer alminnelig mindre enn 10 antallsprosent av aminosyrene utskiftes. I de situasjoner hvor områder finnes å være polymorfe, kan det være ønskelig å variere en eller flere spesielle aminosyrer for mer effektivt å etterligne de forskjellige retrovirusstammers avvikende epitoper. I mange tilfeller kan methionin erstattes med norleucin (Nor) for å tilveiebringe kjemisk stabilitet.

Det skal bemerkes at det anvendte peptid ikke behøver å være identisk med noen spesiell HIV-polypeptidsekvens så lenge den angjeldende forbindelse er i stand til å konkurrere immunologisk med proteiner fra minst én av HIV-retrovirusstammene. Det angjeldende peptid kan derfor være gjenstand for forskjellige endringer slik som innskudd, utelatelser eller substitusjoner, enten konservative eller ikke-konservative, hvor slike endringer kan gi visse bruksmessige fordeler. Ved konservative substitusjoner forstås substitusjoner innenfor grupper slik som gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; phe, tyr; og nor, met. Vanligvis vil sekvensen ikke avvike med mere enn 20% fra sekvensen av minst én HIV-retrovirusstamme, unntatt hvor ytterligere aminosyrer kan være tilføyet ved den ene av endene eller begge, med det formål å tilveiebringe en "arm", hvormed peptidet hensiktsmessig kan immobiliseres. Armene vil vanligvis være minst én aminosyre lange og kan være 50 eller flere, oftere 1 til 10 aminosyrer lange.

Det peptid hvori aminosyresekvensen modifiseres ved substitusjon, addisjon eller strykning av aminosyrestoffer, bør hovedsakelig bibeholde hele immunoreaktiviteten eller antiviralaktiviteten av de umodifiserte peptider, hvilket hensiktsmessig kan måles ved hjelp av forskjellige her beskrevne analyseteknikker. d-isomerformen av en eller flere aminosyrer kan, om ønsket, anvendes til modifikasjon av biologiske egenskaper slik som aktivitet, nedbrytningshastighet, etc.

Dessuten kan 1, 2 eller flere aminosyrer adderes til endende på et oligopeptid eller peptid for å muliggjøre lett sammenkjeding av peptider med hverandre, kobling til en bærer eller et større peptid, av grunner som omtales senere, for å modifisere peptidets eller oligopeptidets fysiske eller kjemiske egenskaper eller lignende.

Aminosyrer slik som tyrosin, cystein, lysin, glutamin- eller asparaginsyre eller lignende, kan innføres ved peptidets eller oligopeptidets C- eller N-ende for å tilveiebringe en verdifull funksjonalitet til sammenkjeding. Cystein foretrekkes spesielt for å lette covalent kobling til andre peptider, eller for å danne polymerer ved oxydasjon.

Peptid- eller oligopeptidsekvensene kan dessuten avvike fra den naturlige sekvens ved at sekvensen er modifisert ved terminalaminoacylering, f.eks. acetylering eller thioglycolsyreamidering, carboxyterminalamidering, f.eks. med ammoniakk eller metylamin, under dannelse av stabilitet, forøket hydrofobisitet for sammenkjeding med eller binding til en bærer eller et annet molekyl, eller for polymerisering.

Eksempelvis er det tale om en foretrukket utførelsesform når Y eller Y' forefinnes i de ovenfor omtalte peptider I-VIII og IX-XV, når Y eller Y' omfatter én eller flere cysteinrester eller en kombinasjon av én eller flere cysteinrester med avstandsaminoasyrer. Glycin er en særlig foretrukket avstandsaminoasyre. Foretrukne peptider til bruk ved oxydativ polymerisering er slike hvori Y eller Y' betegner minst to cysteinrester. Når to cysteinrester forefinnes ved samme ende av peptidet, er det en foretrukket utførelsesform når cysteinrestene er adskilt fra hverandre med én eller to avstandsaminoasyrer, fortrinnsvis glycin. Tilstedeværelsen av cysteinrester kan tillate dannelse av dimerer av peptidet og/eller en økning av det resulterende peptids hydrofobisitet, hvilket letter immobilisering av peptidet i fast fase eller immobiliserte analysesystemer.

Av særlig interesse er anvendelse av mercaptan-

gruppen i cysteiner eller thioglycolsyrer anvendt til acylering av terminalaminogrupper eller lignende til sammenkjeding av to av peptidene eller oligopeptidene, eller kombinasjoner derav, via en disulfidbinding eller en lengre binding under dannelse av polymerer som inneholder et antall epitoper. Slike polymerer har den fordel at de gir forøket immunologisk reaksjon. Hvor forskjellige peptider anvendes til oppbygning av polymeren, har de den ytterligere evne til å fremkalle antistoffer som immunoreagerer med flere antigeniske determinanter på forskjellige HIV-isolater.

For å oppnå dannelse av antigeniske polymerer (syntetiske multimerer) kan det anvendes forbindelser med bis-halogenacetylgrupper, nitroarylhalogenider eller lignende, hvor reagensene er spesifikke for thiogrupper. Bindingen mellom de to mercaptogrupper i de forskjellige peptider eller oligopeptider kan således være en enkelt binding eller en sammenkjedingsgruppe på minst 2, vanligvis minst 4 og ikke mer enn ca. 16, og vanligvis ikke mer enn ca. 14 carbonatomer.

Det angjeldende peptid kan anvendes bundet til en oppløselig makromolekylær (f.eks. ikke mindre enn 5kDal) bærer. Bæreren kan hensiktsmessig være en polyamino-syre, enten naturlig forekommende eller syntetisk, mot hvilken det er usannsynlig at man vil finne antistoffer i humant serum. Eksempler på slike bærere er poly-L-lysin, albumin, hemocyanin, thyroglobulin, albuminer slik som kvegserumalbumin, tetanustoxoid, etc. Valget av bærer avhenger primært av den påtenkte endelige anvendelse av antigenet og av hensiktsmessighet og tilgjengelighet.

Med slike konjugater vil det være minst ett molekyl av minst ett omhandlet peptid pr. makromolekyl, og ikke mer enn ca. 1 pr. 0,5kDal, vanligvis ikke mere enn ca. 1 pr. 2kDal av makromolekylet. Ett eller flere forskjellige peptider kan være kjedet til samme makromolekyl.

Sammenkjedingsmåten er konvensjonell, idet det anvendes slike reagenser som p-maleimidobenzosyre, p-methyldithiobenzosyre, maleinsyreanhydrid, ravsyreanhydrid,

glutaraldehyd, etc. Sammenkjedingen kan finne sted ved N-enden, C-enden eller i en posisjon mellom molekylets ender. Det angjeldende peptid kan derivatiseres ved sammenkjeding, kan sammenkjedes mens det er bundet til en bærer eller lignende.

Forskjellige analyseforskrifter som er velkjente for fagmannen, kan anvendes for påvisning av tilstedeværelse av enten antistoffer mot retrovirusproteiner eller selve retrovirusproteinene. Av særlig interesse er anvendelse av peptidet som det merkede reagens, hvor markøren sørger for et påviselig signal eller binding av peptidet til en overflate enten direkte eller indirekte, hvor antistoff mot peptidet i prøven vil bli bundet til peptidet på overflaten. Nærvær av humant antistoff bundet til peptidet, kan deretter påvises ved anvendelse av et xenogent antistoff som er spesifikt for humant immunoglobulin, normalt både humant IgM og IgG, eller et merket protein som er spesifikt for immunkomplekser, f.eks. Rf-faktor av *S. aureus* protein A.

Illustrerende for en analyseteknikk er anvendelse av en prøvebeholder, f.eks. brønner i mikrobrønnplater, hvor det angjeldende polypeptid eller konjugater derav adsorberes til beholderbunnen og/eller veggene, enten covalent eller ikke-covalent. Prøven, normalt, humant blod eller serum fortynt i et passende bufret medium, tilsettes til beholderen, og et tilstrekkelig tidsrom tillates å forløpe til at det kan dannes kompleks mellom polypeptidet eller -peptidene og eventuelle beslektede antistoffer i prøven. Supernatanten fjernes, og beholderen vaskes for å fjerne ikke-spesifikt bundne proteiner. Et merket, spesifikt bindingsprotein som spesifikt bindes til komplekset, slik som xenogent antiserum mot humant immunoglobulin, anvendes til påvisning.

Peptidet kan fremstilles på mange forskjellige måter. På grunn av dets forholdsvis korte lengde kan peptidet syntetiseres i oppløsning, eller på en fast bærer i henhold til konvensjonelle teknikker. I dag finnes det

forskjellige automatiske syntetisatorer i handelen som kan anvendes i overensstemmelse med kjente forskrifter. Se f.eks. Steward og Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2. utgave, Pierce Chemical Co., 1984, og Tam et al., J. Am. Chem. Soc. (1983) 105:6442.

Alternativt kan det anvendes hybrid DNA-teknologi hvor et syntetisk gen kan fremstilles under anvendelse av enkle strenger som koder for polypeptidet, eller hovedsakelig komplementære strenger derav, hvor de enkle strenger overlapper hverandre og kan bringes sammen i et normaliseringsmedium for å hybridisere. De hybridiserte strenger kan deretter ligeres under dannelsen av det komplette gen, og ved valg av passende terminaler kan genet innføres i ekspresjonsvektorer som er umiddelbart tilgjengelige i dag. Se f.eks. Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, CSH, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. Det område av virusgenomet som koder for peptidet, kan også kloneres ved konvensjonelle rekombinant DNA-teknikker og bringes til uttrykk (se Maniatis, supra).

Blant DNA-kodningssekvenser fra LAV_{BRU}- og ARV 2-isolatene av HIV som kan anvendes til ekspresjon av peptidene, er følgende:

LAV _{BRU}	TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT
	ATC CGT ATC CAG AGG GGA CCA GGG AGA GCA TTT
	GTT ACA ATA GGA AAA ATA GGA AAT ATG AGA CAA
	GCA CAT TGT
ARV-2	TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT
	ATC TAT ATA GGA CCA GGG AGA GLA TTT CAT ACA
	ACA GGA AGA ATA ATA GGA GAT ATA AGA AAA GCA
	CAT TGT

Fragmenter av en sekvens kan anvendes til ekspresjon av peptidfragmenter, konservative baseendringer kan foretas hvor det eller de modifiserte kodoner koder for samme aminosyre(r), eller ikke-konservative endringer i

- kodningssekvensen kan foretas hvor den resulterende aminosyre kan være en konservativ eller en ikke-konservativ endring av aminosyresekvensen som tidligere omtalt.

Kodningssekvensen kan forlenges enten ved 5'- eller 3'-enden eller begge for å forlenge peptidet under bibeholdelse av dets epitope sted(er). Forlengelsen kan tilveiebringe en arm for sammenkjedning, f.eks. med en markør slik som et enzym, til sammenføyning av to av peptidene eller alle peptidene i samme kjede, for tilveiebringelse av antigenisk aktivitet, egnede restriksjonsposisjoner for kloning eller lignende.

Selve DNA-sekvensen, fragmenter derav eller større sekvenser, vanligvis på minst 15 baser, fortrinnsvis minst 18 baser, kan anvendes som nucleotidprober til påvisning av retroviralt RNA eller proviralt DNA, eller til identifikasjon av homologe områder for kloning eller sekvensanalyse. Tallrike teknikker finnes beskrevet slik som Grunstein-Hogness-teknikken, Southern-teknikken, Northern-teknikken, dot-blotteknikken, forbedringer av disse samt andre metoder, f.eks. som beskrevet i US patentskrift nr. 4.358.535.

Oppfinnelsen belyses nærmere ved hjelp av de etterfølgende eksempler.

25 Eksempel 1

Utvikling og karakterisering av monoklonale antistoffer

Eksempel 1 beskriver utvikling av hybridcellelinjer som produserer monoklonale antistoffer som er spesifikke for HIV svøpglycoproteinene. Denne fremgangsmåte gjør bruk av lectinrensede ekstrakter av LAV_{BRU} knyttet til lentillectin agarose som immunogen. De monoklonale antistoffer som deretter utvikles med hybridcellelinjene, er karakterisert ved deres evne til å immunoavtrykke og radioimmunutfelle gp110 fra renset LAV, og som biologisk uttrykt rekombinant fusjonsprotein. De monoklonale antistoffer som bindes til epitoper på gp110, er også reaktive ved ELISA med brutt, helt virus, fusjonsproteiner og syntetiske peptider, og reagerer med helvirus ved indirekte

- fluorescensanalyser.

Forskriftene for utvikling av hybridcellelinjene som produserer monoklonalt antistoff, og karakterisering av antistoffene, var som følger.

- 5 LAV-virus rensset for infiserte CEM-celler (A.T.T.C. nr. CRL8904) ble oppbrutt i 50 mM Tris, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 1,0% aprotinin, 2,0% "Nonidet" P-40 (NP-40) (octylfenoxypolyethoxyethanol). Ekstraktet ble klaret to ganger ved sentrifugering og ble innstilt til 0,5% NP-40 ved tilsetning av tre volumer oppbrytningsbuffer uten NP-40. 10 Lentillectin "Sephacrose" ble forvasket i oppbrytningsbuffer uten NP-40 og ble deretter bragt til likevekt i adsorpsjonsbuffer (50 mM Tris, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 1,0% aprotinin, 0,5% NP-40). Renset virusekstrakt ble adsorbent 15 med lentillectin "Sephacrose" i 42 timer ved 4°C. Uadsorbent materiale ble fjernet ved vasking med adsorpsjonsbuffer i overskudd. Eluering av adsorbent materiale ble utført med 0,2 M alfamethylmannosid i adsorpsjonsbuffer. Elueringsmidlet ble dialysert overfor PBS for å fjerne sukkeret, og 20 materialet ble readsorbent på lentillectin "Sephacrose".

- Glycoprotein-lentillectin "Sephacrose"-komplekset ble anvendt til immunisering av BALB/c-mus ved tre intraperitoneale injeksjoner uten adjuvans, gitt med 2-3 ukers mellomrom. Miltene ble fjernet fra immuniserte mus som ut- 25 viste sirkulerende antistoff mot HIV-glycoproteiner ved immunoavtrykk, RIP og/eller ELISA.

- Til utvikling av cellelinjer ble det generelt anvendt Kohler og Milsteins forskrifter (Nature 256:495 (1985)) med de av Goldstein, L.C., et al., (Infect. Immun. 38:273 30 (1982)) foreslåtte modifikasjoner. B-lymfocytter fra milt fra de immuniserte mus ble fusjonert med NS-1 myelomaceller ved hjelp av 40 vekt/vol% polyethylenglycol. Etter fusjonering ble celleblandingen resuspendert i HAT-medium (RPMI - 1640 medium supplert med 15% kalvefoster- 35 serum, 1×10^{-4} M hypoxanthin, 4×10^{-7} M aminopterin og $1,6 \times 10^{-5}$ M thymidin) for å utvelge på grunnlag av veksten av hybridceller, og ble deretter fordelt til 96-brønns mikrokulturbrett i en konsentrasjon på 1 til 3×10^6 celler/ml

og ble inkubert ved 37°C i en fuktet atmosfære inneholdende 6% CO₂. Kulturene ble matet ved erstatning av halvparten av supernatanten med friskt HAT-medium. Brønnene ble observert under invertmikroskop med hensyn til tegn på celleformering, og når cellene hadde tilstrekkelig densitet, ble supernatantene testet med hensyn til anti-LAV-antistoff.

Brønner inneholdende hybridceller som produserte antistoff mot LAV, ble identifisert ved ELISA som målte bindingen til enten rensset, helt oppbrutt virus eller biologisk uttrykte fusjonsproteiner. ELISA-analyser med oppbrutt virus ble utført på LAV EIA-plater. Platene ble inkubert med celledyrkningsvæsker ved 37°C i 45 minutter og ble deretter vasket tre ganger med 0,05 "Tween"-20 i fosfatbufret saltvann (PBS-"Tween").

Peroxydase-geiteantimuse-IgG (1:2.000 fortytning i PBS-"Tween") ble tilsatt 100 µl pr. brønn, og platene ble inkubert ved 37°C i 45 minutter og ble vasket som ovenfor angitt. Substrat (0,025 M sitronsyre, 0,05 M dibasisk natriumfosfat, pH 5,0, inneholdende 14 mg o-fenylendiamin og 10 µl 30% hydrogenperoxyd pr. 50 ml) ble tilsatt, og platene ble inkubert i mørket ved romtemperatur i 30 minutter. Reaksjonen ble stanset med 3 N svovelsyre, og kolorimetrisk reaksjoner ble avlest kvantitativt med en automatisert mikroplateavleser. Brønner som ga positive resultater, ble subklonet ved grensefortyning, ble testet på nytt med hensyn til spesifisitet og ble deretter ekspandert.

De av de resulterende hybridcellelinjer utskilte monoklonale antistoffer, ble karakterisert ytterligere med hensyn til spesifisitet og reaktivitet ved immunoavtrykning, immunutfelling og ELISA med oppbrutt LAV-virus, rekombinante LAV-fusjonsproteiner og syntetiske LAV-peptider. Alle antistoffene ble bestemt å være av IgG₁-isotype. Cellelinjene HIV-gp110-1, HIV-gp110-2 og HIV-gp110-3 er før innlevering av foreliggende søknad blitt deponert ved American Type Culture Collection under følgende deponeringsnumre HB 9175, HB 9176 og HB 9177.

Rekombinante fusjonsproteiner som er testet med

hensyn til reaktivitet, er tidligere blitt betegnet som ENV2, ENV3, ENV4 og ENV5. Protein ENV2 uttrykkes av pENV2 (A.T.C.C. nr. 53071) som er et område av LAV fra basepar (bp) 6598 til bp 7178 (nummerering i henhold til Wain-
5 Hobson et al., Cell 44:9 (1985)), ENV3 uttrykkes av pENV3 (A.T.C.C. nr. 53072) som omfatter LAV-området fra bp 7178 til bp 7698, ENV4 uttrykkes av pENV4 (A.T.C.C. nr. 53073) og omfatter pb 7698 til bp 8572, og ENV5 uttrykkes av pENV5 (A.T.C.C. nr. 53074) som omfatter LAV-området bp 5889 til
10 bp 7698. Fremstillingen av de rekombinante fusjonsproteiner beskrives nærmere i søkerens US patentsøknad nr. 721.237.

Samling av syntetiske peptider

Peptid I (29) og VIII (110-2-2) ble anbragt på en
15 benzhydrylamin- (polystyren/divinylbenzen) harpiks. Peptid V (177) ble anbragt på en t-butyloxycarbonyl-(Boc)-ethylbenzyl-
cystein-fenylacetamidomethyl (PAM) polystyren/divinylbenzen-
harpiks. Symmetriske anhydridkoblinger ble utført i en
syntetisator av typen Applied Biosystems 430A. Cystein ble
20 tilsatt som den første rest i begge peptider.

Dicyclohexylcarbodiimidkoblinger i nærvær av
hydroxylbenzotriazol ble anvendt til asparagin og glutamin. Benzylbasert sidekjedebeskyttelse og Boc alfa-aminbeskyttelse
ble anvendt. Annen rutinemessig anvendt sidekjedebeskyttelse
25 var Boc-(formyl)-tryptofan, Boc-methioninsulfoxyd, Boc-
(tosyl)-arginin, Boc-(methylbenzyl)-cystein, Boc-(tosyl)-
histidin, Boc-(klorbenzyloxycarbonyl)-lysin og Boc-(brom-
benzyloxycarbonyl)-tyrosin.

Da peptidene ble radiomerket, skjedde dette ved
30 acetylering av aminoenden med ³H-eddiksyre og dicyclohexyl-
carbodiimid i overskudd.

Avbeskyttelse og spalting av peptidet fra harpiksen
skjedde etter "lav-høy" HF-forskriften ifølge Tam (Tam et al.,
supra). Ekstraksjon fra harpiksen skjedde med 5% eddiksyre,
35 og ekstraktet ble underkastet gelfiltreringskromatografi i
5% eddiksyre.

Blant syntetiske HIV-peptider som ble testet for reaktivitet med de monoklonale antistoffer, var peptid 29,

- 36 og 39. Peptid 29 kodes av LAV_{BRU}-genomområdet fra ca. bp 6688 til bp 6750, peptid 36 kodes av området fra ca. bp 7246 til bp 7317, og peptid 39 kodes av området fra ca. bp 7516 til bp 7593. Peptid 36 og 39 beskrives nærmere i
5 US patentskrift 4.629.783.

Blokkeringspeptidene IX-XV ble anbragt hovedsakelig som ovenfor beskrevet på en methyl-benzhydrylamin- (polystyren/divinylbenzen) harpiks. Symmetriske anhydrid- koblinger ble utført på en syntetisator av typen Applied
10 Biosystems 430A. Dicyclohexylcarbodiimidkoblinger i nærvær av hydroxylbenzotriazol ble anvendt til asparagin. Til beskyttelse ble det anvendt benzylbasert sidekjede- og boc- alfa-aminbeskyttelse, mens Boc-(brombenzyloxycarbonyl) spesielt ble anvendt til tyrosinsidekjeder. Eventuell acetylering
15 ble utført ved hjelp av eddiksyreanhydrid eller iseddiksyre og dicyclohexylcarbodiimid. Avbeskyttelse og spalting av peptidet fra harpiksen ble utført ved "høy" HF standard- forskrift (Stewart et al., supra). Ekstraksjon fra har- piksene ble utført med 50% eddiksyre, og ekstraktet ble der-
20 etter underkastet gelfiltreringskromatografi i 20% eddiksyre. Om ønsket, ble væsekromatografi med høy ytelse utført på en "Vydac" C18-kolonne under anvendelse av en 0,1% trifluor- eddiksyre, acetonitrilgradient.

25 Immunoavtrykning

Karakterisering ved immunoavtrykning ble utført på klonsupernatanter eller ascitesvæske under anvendelse av rensed LAV-virus og rekombinante fusjonsproteiner som anti- gener. Antigenene ble først separert ved polyacrylamid-
30 gradientgelelektroforese (7,0-15,0%) og ble overført til nitrocellulosemembran (NCM) ved elektroforese i 4 timer ved 25 V i 25 mM natriumfosfat (pH 7,0). Etter overføring ble NCM blokkert for å forebygge ikke-spesifikke, innbyrdes reaksjoner ved inkubering i PBS-"Tween" eller "Blotto" (5%
35 fettfri tørrmelk i PBS) ved romtemperatur i 1 time. NCM ble inkubert med cellekultursupernatant eller ascitesvæske fortynnet i PBS-"Tween" ved romtemperatur i 1 time og ble skylt med tre porsjoner PBS-"Tween". I det andre trinn ble

• NCM inkubert med geiteanti-muse-IgG-pepperrotperoxydase fortynnet i PBS-"Tween" i en time ved romtemperatur. Denne inkubering ble etterfulgt av vasking med PBS-"Tween" og nedsenkning i pepperrotperoxydasefargefremkallingsoppløsning i 20 minutter. Reaksjonen ble stanset ved nedsenkning i avionisert vann. Reaktiviteten av monoklonalt antistoff ble sammenlignet med et positivt kontrollserum som reagerte med rensset, brutt virus eller uttrykt fusjonsprotein. Resultatene viste at alle antistoffer ble bundet til gp110 og dets forløpermolekyl gp150 ved anvendelse av preparater av brutt virus. Antistoff 110-1 og 110-2 gjenkjente også fusjonsproteinet ENV3, mens antistoff 110-3, 110-4, 110-5 og 110-6 dannet immunokompleks med ENV2.

15 Immunoutfelling

Virusekstrakter til radioimmunutfelling ble fremstilt fra CEM-celler infisert med LAV_{BRU}-isolatet av HIV tilpasset lytisk vekst ved kontinuerlig overføring. Når tidligere cytopatiske virkninger sås klart, ble cellene overført til merkningsmedier inneholdende ³⁵[S]-methionin (0,05 mCi/ml) eller ³[H]-glucosamin (0,025 mCi/ml), ble deretter inkubert i 24 timer inntil mesteparten av cellene var lysert under frigivelse av viruset til kultursupernatanten. Virus ble pelletisert (1 time ved 100.000 x g) fra den cellefrie supernatant, og detergentekstrakter ble fremstilt i P-RIPA-buffer (fosfatbufret saltvann inneholdende 1,05% "Triton" X-100, 1,0% deoxycholot, 0,1% SDS og 1% aprotinin). Lignende ekstrakter ble fremstilt fra supernatantene fra uinfiserte CEM-celler.

Immunutfellingsanalyser ble utført med 100 µl virusekstrakt inkubert med 100 µl kultursupernatant fra hybridcellelinjene i en time på is. 4 mikroliter kanin-anti-muse-Ig ble tilsatt til hver prøve og ble inkubert i 30 minutter. 100 µl immunoprecipitin resuspendert i P-RIPA-buffer inneholdende 1,0% ovalbumin, ble tilsatt til hver prøve og inkubert i ytterligere 30 minutter. De bundne kompleks ble vasket og separert ved SDS-polyacrylamid-gelelektroforese (15,0% acrylamid, DATD-gel). Etter elek-

troforese ble gelene fiksert, utbløtt i Enhance, tørket og eksponert til Kodak XR-5 film. Et positivt referanseserum som immunoutfelte alle HIV-virusproteiner, ble omsatt med virusinfiserte og etterligningsinfiserte CEM-cellesupernatanter som positive og negative kontrollprøver.

Resultatene viste at alle seks monoklonale antistoffer spesifikt immunoutfelte gpl10 og gpl50.

Enzymkjedet immunoadsorbansanalyse

For å kartlegge de gpl10-epitoper som ble gjenkjent av de monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen, ble kultursupernatanter fra hybridcellelinjer eller ascitesvæske ytterligere karakterisert ved reaktivitet ved ELISA-er med biologisk uttrykte fusjonsproteiner og syntetiske peptider. Prosedyrene var de samme som ovenfor beskrevet, med det unntak at fusjonsproteiner eller syntetiske peptider erstattet rensert virus som det til overflaten av mikrotiterbrønnene adsorberte antigen.

Når peptider ble anvendt som antigen, var pletteringsforskriften som følger. Lyofilisert peptid ble oppløst i 6 M guanidin HCl. Like før plettering i 96-brønnsplatene ble guanidinoppløsninen fortynnet i 0,05 M karbonat/bikarbonatbuffer (pH 9,6) til en peptid-sluttkonsentrasjon på opptil 100 µg/ml. Et 50 µl volum av det fortynnede peptid ble bragt i hver mikrotiterbrønn, hvoretter platene ble inkubert natten over ved 4°C. Overskytende peptidløsning ble "ristet ut", platene ble blokkert med Blotto, og den ovenfor beskrevne prosedyre ble fulgt for resten av ELISA-en. På tilsvarende måte ble rekombinant protein fortynnet til en sluttkonsentrasjon på ca. 2 µg/ml i 0,05 M karbonat/bikarbonatbuffer (pH 9,6) før den samme prosedyre ble fulgt.

Resultatene er vist i tabell II. Monoklonale antistoffer produsert av cellelinjene HIV gpl10-1 og HIV gpl10-2, reagerte med ENV3, ENV5, peptid 36 og brutt virus. Antistoffer fra cellelinjene HIV-gpl10-3, HIV-gpl10-4, HIV-gpl10-5 og HIV-gpl10-6 reagerte med såvel ENV2 og peptid 29 som brutt virus.

Tabell II

ELISA-er som viser monoklonale antistoffers reaktivitet
med rekombinante proteiner og syntetiske peptider

5

	<u>Rekombinant fusionsprotein</u>				<u>Syntetisk peptid</u>			LAV	CEM	
	<u>ENV2</u>	<u>ENV3</u>	<u>ENV4</u>	<u>ENV5</u>	<u>29</u>	<u>36</u>	<u>39</u>	<u>Kontroll</u>	<u>Kontroll</u>	
10	110-1	0,077	3,000	0,113	3,000	ND	2,421	0,054	0,908	0,125
	110-2	-0,003	3,000	0,000	3,000	ND	2,305	-0,005	1,214	0,009
	110-3	3,000	0,011	ND	ND	3,000	ND	0,017	0,363	0,046
	110-4	3,000	0,020	ND	ND	3,000	ND	0,016	0,383	0,067
	110-5	3,000	0,014	ND	ND	3,000	ND	0,016	0,368	0,025
15	110-6	3,000	0,033	ND	ND	1,937	ND	0,017	0,486	0,032

Resultatene i tabell II viste at de monoklonale antistoffer 110-1 og 110-2 gjenkjente en antigenisk determinant for hvilken det kodes av en DNA-sekvens i pENV3-området, nærmere bestemt det område av HIV-genomet som er definert av en aminosyresekvens i peptid 36. De monoklonale antistoffer gp110-1 og 110-2 bindes således til et peptidområde av gp110, for hvilket det kodes innenfor bp7246 til 20 bp7317, hvilket dannelsen av immunkomplekser med peptid 36 og ENV3 viser. Dette område av HIV-genomet er tidligere blitt identifisert som bevart, dvs. at det er liten endring i DNA-sekvensen i det område som peptid 36 koder for blant forskjellige virusisolater fra forskjellige geografiske 25 lokaliteter. Se Starcich et al., Cell 46:637 (1986). I motsetning dertil bindes de monoklonale antistoffer gp110-3, -4, -5 og -6 til HIV-peptider definert ved det område for hvilket peptid 29 fra bp 6688 til ca. bp 6750 koder. Det av peptid 29 definerte område i gp110, er blitt identifisert 30 som inneholdende flere nucleotidsubstitusjoner blant forskjellige virusisolater. Monoklonale antistoffer som selektivt binder gp110-polypeptider som inneholder bevarte epi-

35

- toper slik som antistoff 110-1 og 110-2, kan ha forøket anvendelighet under mange forskjellige omstendigheter, slik som ved affinitetskromatografi etc. Ved en ELISA-analyse reagerte peptid 110-2-2 også med sera fra det individ hvorfra LAV-2 ble isolert.

Indirekte immunofluorescensanalyse

Indirekte immunofluorescensanalyser under anvendelse av monoklonale antistoffer rettet mot HIV gp110-antigenet, ble utført på aceton-fikserte og levende celler. Aceton-fikserte preparater fremstilt ut fra LAV-infiserte CEM-celler, ble inkubert med fortynnet kultursupernatant eller ascitesvæske ved 37°C i 1 time, mens levende celler ble inkubert med kultursupernatant eller ascitesvæske ved 4°C i 1 time, før cellene ble anbragt på objektglass og aceton-fiksert. Til begge metoder ble det anvendt fluorescein-isothiocyantmerket anti-muse-IgG til påvisning av celler med det reaktive gp110-antigen. Monoklonalt antistoff HIV-gp110-1 ga positive resultater ved anvendelse av enten levende eller aceton-fikserte LAV-infiserte celler.

Eksempel II

Immunoaffinitetsseparasjon av gp110 ved hjelp av monoklonalt antistoff

Monoklonale antistoffer mot HIV gp110-antigenet kan anvendes til hovedsakelig å rense bakterielt uttrykte rekombinante fusjonsproteiner ved immunoaffinitetsseparasjonsprosedyrer. Hvis det uttrykte protein utskilles av bakterien, kan proteinet isoleres fra kultursupernatanten. Hvis proteinet ikke utskilles, kan brytning av bakteriecellene være nødvendig.

Konstruksjonen av plasmid pENV-5 (A.T.C.C. nr. 53074) beskrives i søkerens US patentsøknad nr. 721.237. Plasmid pENV-5 koder for en større del av carboxylenden av gp110 og en del av aminoenden av gp41 fra LAV innført i trp-ekspressjonsvektoren. E. coli C600 transformert med denne vektor, uttrykker, men utskiller ikke, gp110-fusjonspro-

• teinet.

E. coli C600 inneholdende pENV-5-plasmidet, dyrkes i medium inneholdende tryptofan (20 µg/ml) og ampicillin (100 µg/ml) over natten ved 37°C under luftning. Kulturene som har stått over natten, inokuleres deretter til 1:100 i friskt, minimalt medium inneholdende ampicillin (100 µg/ml), men ikke tryptofan. Disse kulturer dyrkes under luftning i 2-3 timer (opptil tidlig logaritmisk fase) ved 37°C. Induktoren 3-B-indolacrylsyre tilsettes til en sluttkonsentrasjon på 20 µg/ml fra friskt fremstilt forråd av 20 µg/ml i 95% ethanol. Induserte kulturer dyrkes deretter ved 37°C under luftning i 4 til 5 timer, pelletiseres deretter og fryses eventuelt. Proteinutbytter fra pENV-5 er typisk mindre enn 1 mg/liter.

De pelletiserte bakterieceller lyseres under anvendelse av P-RIPA-buffer (PBS inneholdende 1% "Triton" X-100, 1% deoxycholat, 0,1% natriumdodecylsulfat og 1% aprotinin) som vil lysere E. coli-celler. Suspensjonen kan lydbehandles for å overskjære DNA og RNA, etterfulgt av sentrifugering for å fjerne partikkelformet materiale. Et fortynnings- eller konsentreringstrinn kan deretter være nødvendig for å standardisere proteinkonsentrasjonen.

Monoklonalt antistoff HIV-gp110-1 utfelles først fra ascitesvæske eller cellekultursupernatanter ved romtemperatur eller kaldt med $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eller Na_2SO_4 -oppløsninger bufret til pH 7,3 til sluttmetning på hhv. 33 og 18%. Utfelte proteiner fjernes ved sentrifugering og oppløses igjen i PBS og utfelles enda en gang med 33% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eller 12-15% Na_2SO_4 . Dette trinn kan gjentas etter behov. Pelleten oppløses igjen i PBS, og overskytende salter fjernes ved gelfiltrering gjennom en avsaltningsmatriks, eller ved grundig dialyse overfor PBS.

Renset, monoklonalt 110-1-antistoff kan deretter kobles til cyanogenbromid-aktivert "Sephrose". Den nødvendige mengde gel svelles i 10^{-3} M HCl-løsning på et glassfilter (1 g frysetørret materiale gir et sluttvolum på ca. 3,5 ml) og vaskes 15 minutter med samme oppløsning, og anti-

stoffet tilsettes umiddelbart deretter. Generelt forløper koblingsreaksjonen mest effektivt i et pH-intervall på fra 8-10, men en lavere pH kan anvendes hvis det er nødvendig av hensyn til antistoffstabiliteten. Antistoffet bør oppløses i PBS eller en karbonat/bikarbonat- eller boratbuffer med høy ionestyrke med 150 mM NaCl. Suspensjonen av aktivert "Sephacrose" og antistoff omrøres forsiktig ved romtemperatur i 2-4 timer eller over natten ved 4°C, og vaskes deretter med koblingsbuffer på et grovt sintret glassfilter. Eventuelle gjenværende, aktive grupper blokkeres ved behandling av 1,0 M ethanolamin ved pH 8 i 2 timer. Det sluttelige antistoff-"Sephacrose"-produkt vaskes deretter suksessivt med bufferoppløsninger med høy og lav pH (hhv. boratbuffer, 0,1 M, pH 8,5, 1 M NaCl og acetatbuffer, 0,1 M pH 4,0, 1 M NaCl) fire eller fem ganger. Denne vasking fjerner spor av ikke-covalent adsorberte materialer. Den ferdige immunoaffinitetsseparasjonsmatriks oppbevares under 8°C i nærvær av et passende bakteriostatisk middel slik som 0,01% azid.

Tilsetning av den uttrykte proteinsuspensjon til immunoaffinitetsseparasjonsmatriksen resulterer i selektiv fjerning av gp110-antigenet. Blandingen får reagere i 2-24 timer, fortrinnsvis 12-18 timer, under langsom omrøring eller vugging. Det kan også anvendes et kolonneformat hvor immunoaffinitetsmatriksen helles i en kolonne, bringes i likevekt, og den uttrykte proteinsuspensjon tilsettes langsomt til kolonnen. Etter at proteinsuspensjonen er tilsatt, bør gjennomstrømningen stanses for å tillate maksimal immunkompleksdannelse.

Ubundet materiale utvaskes eller separeres ved grundig vask med absorpsjonsbuffer. Et grovt sintret glassfilter med vakuum eller kolonnegjennomstrømning kan anvendes. Det bundne materiale elueres deretter under anvendelse av buffere med lav eller høy pH (acetatbuffer, pH 4,0 eller boratbuffer, pH 8,56) eller et chaotrop middel.

Eksempel IIIImmunoaffinitetsrensing av rekombinant gp110 fra et pattedyr-ekspressjonssystem

De monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen
5 finner anvendelse ved immunoaffinitetsrensing av rekombinant
fusjons gp110 uttrykt av pattedyrceller. Pattedyrceller
infiseres med rekombinant vaccinia (Mackett et al., J. Virol.
49:857 (1984) som inneholder sekvenser som koder for i det
minste den del av gp110 som er antigenisk og fremkaller
10 nøytraliserende antistoffer.

Den rekombinante vaccinia konstrueres i henhold til
den i US patentsøknad nr. 842.984 beskrevne metode. I korte
trekk innføres sekvenser som koder for HIV-svøpglycopro-
teinet i en plasmidvektor (pGS20) nedstrøms for et vaccinia-
15 transkripsjonskontrollelement. Dette kimære gen flankeres
av sekvenser som koder for det virale thymidinkinase- (TK)
gen.

Kimære plasmidvektorer inneholdende vacciniavirus-
promotor ligert til LAV-svøpogenet, anvendes til transfor-
20 mering av E. coli stamme MC1000. Innføring av de kimære
LAV-env-sekvenser i vacciniavirusgenomet utføres ved in vivo-
rekombinasjon muliggjort ved at de kimære gener i pv-env5-
plasmider flankeres av vacciniavirussekvenser som koder
for TK-genet. Dette plasmid innføres deretter i celler
25 som på forhånd er infisert med vill-type vacciniavirus, og
rekombinasjon får lov til å finne sted mellom TK-sekvensene
på plasmidet og de homologe sekvenser i vacciniavirus-
genomet, hvorved det kimære gen innføres. African Green
Monkey nyreceller (stamme BSC-40, en linje avledet av BSC-1-
30 celler, A.T.C.C. nr. CCL26) anvendes som vert i ekspressjons-
systemet.

Sammenflytende BSC-40-celler infiseres til en in-
feksjonsmultiplisitet på 10 med rekombinant vacciniavirus.
Infeksjonen får lov til å forløpe i 12 timer, hvorefter
35 cellene høstes, vaskes en gang med PBS og oppsamles ved sen-
trifugering. Cellepellets resuspenderes i lyseringsbuffer
(1,0% NP 40, 2,5% natriumdeoxycholat, 0,1 M NaCl, 0,01 M Tris-

- HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA), hvoretter lysatet klares ved sentrifugering. Immunoaffinitetsseparasjon av det uttrykte rekombinante fusjonsprotein utføres som beskrevet ovenfor, for bakterieekspresjonssystemet, under anvendelse av det
- 5 monoklonale antistoff gp110-1. De med dette ekspresjonssystem produserte proteiner ligner langt mer naturlig fremstilt HIV gp110 på grunn av den behandling og glycosylering som pattedyrcellene gir.

10 Mikroorganismedeponeringsdata

Følgende mikroorganismer som utgjør en del av oppfinnelsen, ble deponert ved American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A.

Data vedrørende deponeringene er som følger:

15

Vitenskapelig

<u>beskrivelse</u>	<u>Deponentens ref.</u>	<u>ATCC ref.</u>	<u>Deponeringsdato</u>
Musehybridoma (balb c/NS-1)	HIV-gp 110-1	HB 9175	15. august 1986
"	HIV-gp 110-2	HB 9176	15. august 1986
"	HIV-gp 110-3	HB 9177	15. august 1986
"	HIV-gp 110-6	HB 9404	30. april 1987
"	HIV-gp 110-4	HB 9405	30. april 1987
25 "	HIV-gp 110-5	HB 9406	30. april 1987
"	HIV-p 25-2	HB 9407	30. april 1987
"	HIV-p 25-3	HB 9408	30. april 1987
"	HIV-p 25-6	HB 9409	30. april 1987
30 "	HIV-p 25-7	HB 9410	30. april 1987

Hybridomene HB 9175, HB 9176 og HB 9177 ble testet og ble funnet å være levedyktige den 26. august 1986. De

35 øvrige hybridomer ble testet og funnet å være levedyktige den 4. mai 1987.

P a t e n t k r a v

1. Monoklonalt antistoff,

5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det nøytraliserer HIV ved spesifikt å reagere med en gp110 nøytraliserende epitop innenfor HIV-området fra aminosyre 301-336 av LAV som har sekvensen II (29a)

10

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

15 og homologer derav.

2. Monoklonalt antistoff ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det binder til en nøytraliserende gp110 epitop som befinner seg innenfor LAV_{Bru} aminosyresekvens 308 til 328, eller homologer derav.

20

3. Monoklonalt antistoff ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det er erholdt fra en cellelinje som er HIV-gp110-3, HIV-gp110-4, HIV-gp110-5 eller
25 HIV-gp110-6, med deponeringsnr. ATCC HB9177, HB9405, HB9406 og HB9404, eller konkurrerer med et monoklonalt antistoff erholdt fra minst én av disse cellelinjer om binding til gp110.

4. Cellelinjer,

30 k a r a k t e r i s e r t v e d at de er HIV-gp110-1, ATCC HB9175, HIV-gp110-2, ATCC HB9176, HIV-gp110-3, ATCC HB9177, HIV-gp110-4, ATCC HB9405, HIV-gp110-5, ATCC HB9406, HIV-gp110-6, ATCC HB9404, HIV-p25-6, ATCC HB9409, HIV-p25-7 og ATCC HB9410.

35

5. Anvendelse av monoklonalt antistoff ifølge kravene 1-3 for diagnose med hensyn til tilstedeværelse av HIV i en biologisk prøve, ved at man inkuberer et monoklonalt antistoff som er i stand til å reagere med HIV gp110 sammen med en bio-

logisk prøve, og påviser tilstedeværelsen av immunkomplekser dannet mellom det monoklonale antistoff og den antigeniske determinant i den biologiske prøve, og på grunnlag derav bestemmer tilstedeværelsen eller fraværet av HIV i prøven.

5

6. Anvendelse ifølge krav 5, hvor det monoklonale antistoff er i stand til å reagere med et nøytraliserende område av gp110.

10

15

20

25

30

35