



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 691 31 513 T3** 2005.05.25

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 449 116 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **691 31 513.2**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **91 104 432.9**

(96) Europäischer Anmeldetag: **21.03.1991**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.10.1991**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **11.08.1999**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **25.08.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.05.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/48**

**C12N 15/49, C12N 15/62, A61K 39/21**

(30) Unionspriorität:

**90105319            21.03.1990        EP**

(73) Patentinhaber:

**Geneart GmbH, 93053 Regensburg, DE**

(74) Vertreter:

**Vossius & Partner, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE**

(72) Erfinder:

**Wolf, Hans, Prof. Dr., W-8130 Starnberg, DE;  
Fließbach, Holger, Dipl.-Biol., W-8000 München 2,  
DE; v. Brunn, Albrecht Dr., W-8000 München 71,  
DE; Wagner, Ralf, Dipl.-Biol., W-8000 München 71,  
DE; Motz, Manfred, Dr., W-8000 München 70, DE**

(54) Bezeichnung: **Für abgeänderte retrovirale GAG-Polypeptide kodierende DNA-Sequenzen und diese enthaltende Impfstoffe oder Aggregate davon**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Das technische Problem, welches der vorliegenden Erfindung zu Grunde liegt, ist die Bereitstellung von DNA-Sequenzen, die modifizierte retrovirale p55-gag Polypeptide kodieren, die für die Immunisierung von Säugetieren gegen retrovirale Krankheiten verwendet werden können. Die Erfindung bezieht sich insbesondere auf einen neu entwickelten rekombinanten HIV-Untereinheiten-Impfstoff, der in entsprechenden Expressionssystemen, wie z.B. rekombinante Bakulo- bzw. Vakziniaviren in Insekten- bzw. Säugerzellen, hergestellt wird. Die Erfindung basiert auf dem HIV-1-gruppen-spezifischen Antigen p55-gag, welches die virale Kernstruktur (core) ausbildet und im Falle der Produktion aus eukaryontischen Zellen für die Ausbildung partikulärer Strukturen verantwortlich ist. Die Immunogenität dieser unreifen 90–110 nm großen p55-core Partikel kann durch den Einbau gut charakterisierter Epitope aus anderen HIV-1-, HIV-2- oder SIV-Leserahmen (z.B. env, nef, pol) in drei unterschiedliche Bereiche der gag-kodierenden Sequenz erhöht werden, wobei die Auswahl dieser Bereiche durch Computer-unterstützte Analysen der p55-Sekundärstruktur erfolgte. Um das universale Prinzip, das der stabilen Expression und der erhöhten Immunogenität von rekombinanten p55/gp120-Partikeln zu Grunde liegt, aufzuzeigen, wurden beispielhaft die gp120-CD4-bindende Region, eine Konsensussequenz des gp120 hauptneutralisierenden Epitopes V3 und eine Sequenz aus gp41 (die „fusogene Region“) in die kodierende Sequenz des p55-Trägerproteins inseriert und die resultierenden Konstrukte durch rekombinante Vakzinia- und Bakuloviren exprimiert. Rekombinante p55/gp120-Vakziniaviren können direkt als Lebendimpfstoff verabreicht werden oder direkt als Quelle für das Protein-Antigen dienen. Rekombinante Bakuloviren können jedoch nur für die effiziente Produktion und Reinigung der partikulären und chimären p55/gp120-Untereinheit-Impfstoffe verwendet werden.

**[0002]** Auf Grund der Tatsache, daß HIV in infizierten Zellen latent zu persistieren vermag, kommt der Eliminierung von freiem Virus durch neutralisierende Antikörper und die Zerstörung infizierter Zellen durch Antikörper vermittelte Zellzytolyse („antibody dependent cell cytolysis“ – ADCC) und zytotoxischer T-Zellen, eine entscheidende Bedeutung beim weiteren Verlauf der Krankheit zu. Zur Verbesserung des Verständnisses vom Umgang des Immunsystem mit freiem Virus oder HIV-infizierten Zellen, haben sich viele Arbeitsgruppen auf die Identifizierung und Charakterisierung von B- und T-Zell Epitopen, einschließlich aller Leserahmen konzentriert. Die Rolle der humoralen Immunantwort ist dabei entscheidend für den Ausgang einer HIV-Infektion. Mit Ausnahme der finalen AIDS-Stadien können im gesamten Verlauf der Erkrankung Antikörper gegen nahezu alle HIV-Prote-

ine nachgewiesen werden (Vornhagen et al., 1989). Neutralisierende Epitope, die gegen die äußeren Strukturproteine gp120 (Goudsmit et al., 1988; Palcker et al., 1988) und gp41 (Chan et al., 1986) sowie gegen die inneren Strukturproteine p17 (Papsidero et al., 1989) und p24 (Wolf et al. 19990) gerichtet sind, und eine Rolle bei der Eliminierung von freiem Virus spielen könnten, sind bereits beschrieben. Die Antikörper-vermittelte Zellzytolyse (ADCC; Lyverly et al., 1987, 1988) könnte ebenfalls wichtig für die Eliminierung von HIV-infizierten Zellen sein. Eines dieser ADCC-Epitope scheint am C-terminalen Teil des gp120 lokalisiert zu sein. Gleichwohl können sich diese Antikörper jedoch negativ auf den Verlauf der Krankheit auswirken (Fc und/oder Komplement vermittelte Infektionsverstärkung durch Antikörper; Takeda et al., 1989, Homsey et al., 1989, Robinson et al., 1989). Eine Proliferation von T4 Zellen kann gruppen-spezifisch geschehen und konnte durch die Verwendung synthetischer Peptide bestimmten Epitopen aus den env-, gag- und pol-Leserahmen zugeordnet werden (Schrier et al., 1989). Eine T-Zell Kartierung durch rekombinante gp120-Vakziniaviren erlaubte zudem die Lokalisierung von vier T-Helfer-Epitopen in gp120 (Berzofsky et al., 1988, Krohn et al., 1988). Darüber hinaus konnten drei p24-spezifische, CD4 positive T-Zelllinien etabliert werden. MHC Klasse I-restringierte CTL-Epitope wurden für env- (Takahashi et al., 1988, Silciliano et al., 1988), gag- (Nixon et al., 1988) und pol-Proteine (Walker et al., 1988, 1989) beschrieben. Die CTL -vermittelte Zellyse ist von überragender Wichtigkeit bei der Eliminierung von infizierten Zellen. Aus anderen Virussystemen (Influenza-, Tollwut-, Cytomegalovirus) wußte man, daß Nichtstrukturproteine fähig sind, eine Immunogenität durch Induktion von zytotoxischen T-Zellen aufzubauen, und daß dadurch eine initiale Stimulierung des Immunsystems erreicht werden kann, welche nach Belastung mit dem infektiösem Agens eine effektivere Immunantwort, die sogar andere virale Proteine mit einschließt, zur Folge hat (Milich et al., 1988).

**[0003]** Eine Verwendung von vollständigen HI-Viren oder von intakten HIV-kodierenden Genen kann nach Immunisierung adverse Effekte nicht ausschließen. Solche negative Effekte sind unter anderem infektiionsverstärkende Antikörper, Autoimmunreaktionen, die Induktion von Toleranz oder allergene Nebenwirkungen.

**[0004]** Trotz anfänglich vielversprechender in vitro-Ergebnisse scheint eine Immunisierung mit kompletten gp160 oder Untereinheiten davon nicht ausreichend zur Induktion einer schützenden Immunität zu sein. Die Fähigkeit der induzierten Immunantwort zur Neutralisation war immer auf das gleiche, für die Immunisierung verwendete Isolat beschränkt (Typen-, nicht gruppen-spezifisch; Nara et al., 1988). Zudem konnte gezeigt werden, daß sich nach Belas-

tung mit dem infektiösen Virus, HIV immer noch in den gp160-immunisierten Tieren vermehren konnte (Hu et al., 1987). Verschiedenste Gründe können aufgeführt werden, um das Ausbleiben einer schützenden Immunität zu erklären:

1. Die entscheidenden Epitope von gp120 verändern sich schneller als das Virus durch Antikörper eliminiert werden kann,
2. Die virale Streuung zu Beginn der Infektion geschieht durch direkte Zell – Zell Kontakte. Eine humorale Immunantwort ist nicht ausreichend und eine zelluläre Immunantwort gegen gp120 ist eventuell nicht ausreichend.
3. Infektionsverstärkende Antikörper könnten den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen. Eine Komplement-abhängige sowie Fc-vermittelte HIV Infektionsverstärkung ist in verschiedenen in vitro-Studien beschrieben worden (Takeda et al., 1988, Homsey et al., 1989, Golding et al., 1988, 1989).
4. Epitope, die normale zelluläre Genprodukte nachahmen, können eine Immunantwort auslösen, die gegen normale, Zellen gerichtet ist (Reiher et al., 1986, Golding et al., 1988, 1989).
5. Die immunsuppressiven Effekte des HIV-Hüllproteins: freies gp120 bindet hochaffin an das CD4-Rezeptor-Molekül von Zielzellen und markiert sie somit in vitro für ADCC-(Lyerly et al., 1988) und CTL-Attacken (Siliciano et al., 1988, Lancavecchia et al., 1988). Darüber hinaus gibt es Befunde, die zeigen; daß die Bindung von gp120 an das CD4-Molekül mit der Region interferiert, die für eine Interaktion mit MHC Klasse II-Molekülen notwendig ist (Weinhold et al., 1989, Clayton et al., 1989). Ferner ist bekannt, daß bestimmte Bereiche innerhalb von gp120, die Homologien zu Transmembranglykoproteinen von humanen Typ C-Retroviren aufweisen und sich suppressiv auf die Funktion von Makrophagen auswirken, ebenfalls im HIV gp41 vorhanden sind (Claniciola et al., 1988).

**[0005]** Somit besteht also das technische Problem, das der vorliegenden Erfindung zu Grunde liegt, in der Bereitstellung von DNA-Sequenzen, die für ein modifiziertes retrovirales p55-gag-Polypeptid kodieren, welches zur Immunisierung von Säugetieren gegen retrovirale Krankheiten verwendet werden kann.

**[0006]** Die Lösung des oben beschriebenen technischen Problems wird erreicht durch die Bereitstellung der Ausführungsformen, die in den Patentansprüchen näher charakterisiert werden, Demgemäß bezieht sich die vorliegende Erfindung auf eine DNA-Sequenz, die wie in den Patentansprüchen näher beschrieben für ein modifiziertes retrovirales gag-Polypeptid kodiert, wobei das gag-Polypeptid mindestens eine Aminosäuresequenz enthält, die eine nicht-gag-Polypeptid-antigene Determinante darstellt, wobei die DNA-Sequenz abgeleitet ist vom

Retrovirus HIV-1, wobei das gag-Polypeptid p55 ist, wobei die Aminosäuresequenz (einen) Bereiche) des gag-Polypeptids ersetzt, der (die) die eingefügte Aminosäuresequenz dem Immunsystem präsentieren kann/können, so daß eine Immunantwort hervorgerufen wird und wobei der oben beschriebene Bereich in den Aminosäurepositionen 99 bis 154, 211 bis 241 oder 436 bis 471 oder jeder Kombination davon liegt.

**[0007]** Eine solche Immunantwort kann entweder humoral oder zellvermittelt sein. Solche Immunantworten involvieren B-Zell- und/oder T-Zell-Kompartimente.

**[0008]** Die Bezeichnung „präsentieren“ bezieht sich auf die Fähigkeit des Antigens auf Erkennung durch das Immunsystem durch Initiation einer primären und/oder wiedererkennenden Immunantwort.

**[0009]** Die Auswahl der Regionen, in welche die erwähnten Aminosäuresequenzen substituiert werden, erfolgt durch nachfolgende Kriterien:

- (a) Hydrophilie
- (b) Flexibilität und
- (c) Oberflächenwahrscheinlichkeit der deletierten Region.

**[0010]** Die oben beschriebene Aminosäuresequenz ersetzt gag-Polypeptid-Sequenzpositionen.

**[0011]** In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die DNA-Sequenz, die für die zusätzliche Aminosäuresequenz kodiert, durch einen Linker eingefügt. In Übereinstimmung mit konventionellen Methoden enthalten solche konventionelle Linker verschiedenste Restriktionsenzym-Schnittstellen zur Inkorporation der DNA-Sequenz, welche für oben genannte Aminosäuresequenzen kodiert.

**[0012]** In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die nicht-gag Polypeptid-antigene Determinante

- (a) mindestens ein Teil der CD4-bindenden Domäne von gp120
- (b) mindestens ein Teil des variablen Bereichs 3 von gp120; oder
- (c) mindestens ein Teil des konservierten Bereichs von gp41

**[0013]** Besonders bevorzugte Teile der CD4-bindenden Domäne von gp120 leiten sich von der V3-Region ab und beinhalten Unterregionen sowie Derivate der bezeichneten V3-Region, welche detailliert in der Europäischen Patentanmeldung unter Inanspruchnahme der Priorität von EP 9010 5313.2 beschrieben ist.

**[0014]** Die oben erwähnten Teile des Proteins sind

ausgewählte Regionen, die die Induktion einer Immunantwort gegen das natürlich vorkommenden Virus ermöglicht. Vorzugsweise sind diese in der Lage, Antikörper, welche mit dem natürlich vorkommenden Virus reagieren, oder eine zell-vermittelte Immunantwort gegen besagtes Virus zu induzieren.

**[0015]** Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft rekombinante Vektoren, die etwaige DNA-Sequenzen beinhalten, auf die sich bislang hier bezogen wurde.

**[0016]** Erwähnte rekombinante Vektoren beinhalten konventionelle Plasmide, welche für die Klonierung oder Expression der DNA-Sequenz in einer Wirtszelle verwendet werden können. Im Falle der Expressionsplasmide ist die DNA-Sequenz vorzugsweise mit einer Promotorsequenz kombiniert, die ihre Expression in einer geeigneten Wirtszelle kontrolliert.

**[0017]** Eine weitere Ausführungsform der Erfindung bezieht sich auf rekombinante Vektoren, die hier beschriebene DNA-Sequenzen beinhalten. Vorzugsweise handelt es sich hierbei um rekombinante Viren, die vom Vacciniavirus abgeleitet wurden.

**[0018]** Die Erfindung bezieht sich auch auf Wirtsorganismen, welche durch die rekombinanten Vektoren oder rekombinante Viren transformiert wurden.

**[0019]** Darüber hinaus, bezieht sich die vorliegende Erfindung auf modifizierte retrovirale gag-Polypeptide, welche von oben erwähnten DNA-Sequenzen kodiert werden.

**[0020]** Die Erfindung bezieht sich zudem auf Aggregate, welche in Form von Partikeln vorliegen.

**[0021]** Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beinhaltet das Verfahren zur Produktion modifizierter retroviraler gag-Polypeptide und wird durch die hier beschriebenen Methoden charakterisiert, welches die Kultivierung des Wirtsorganismus unter den oben genannten geeigneten Bedingungen, sowie die Reinigung des Expressionsprodukts aus dem Kulturmedium einschließen.

**[0022]** Eine weitere spezielle Ausführungsform der Erfindung ist die Produktion der beschriebenen gag-Partikel in einem Bakulovirus-abhängigen Expressionssystem in Spodoptera frugiperda-Insektenzellen, sowie unter Verwendung stabil transfizierter Zelllinien, in Drosophila Schneider-Zellen.

**[0023]** Letztendlich bezieht sich die Erfindung auf Impfstoffe, die ein hier beschriebenes rekombinantes Virus und/oder ein hier beschriebenes partikelausbildendes Polypeptid beinhalten. In bevorzugten Ausführungsformen enthalten diese Impfstoffe auch pharmakologisch akzeptable Träger und/oder Ver-

dünnungsmittel.

**[0024]** Ein detailliertes Wissen um Antigenität und Variabilität von Strukturen, die in die Absorption und Penetration des Virus involviert sind, ist notwendig, um einen rekombinant entworfenen Impfstoff zu entwickeln, der in der Lage ist eine schützende Immunität gegen eine HIV-Infektion aufzubauen. Alternativ gibt es nur wenige Vorgehensweisen, die auf von HIV abgeleitete depletierte gp120 oder teilweise depletierte Partikel oder gereinigtem gag-Protein basieren.

**[0025]** Die folgenden Überlegungen bilden die Basis für die vorliegende Erfindung:

1. Auf Grund der bei HIV zu beobachtenden hohen Variabilität müssen große, immunologisch relevante Bereiche der viralen Genprodukte Teil der Erfindung sein.
2. Epitope von denen bekannt ist, daß sie infektionsverstärkende Antikörper generieren, oder Epitope, von denen bekannt ist, daß sie zelluläre Proteine nachahmen, sollten ausgeschlossen sein.
3. Regionen, welche eine T-Zell-Immunität induzieren sowie Ziel von ADCC sind, sollten als Bestandteil des Impfstoffs berücksichtigt werden.
4. Das Impfstoffprodukt sollte als partikuläres Antigen hergestellt werden und ohne die Verabreichung von zusätzlichen Adjuvantien als Immunogen stabil wirken können.
5. Alternativ können rekombinante Viren wie Vakzinia-, Herpes simplex oder Adenovirus eingesetzt werden, um die genannten Komponenten direkt in den infizierten Zellen zu exprimieren.

**[0026]** Die Möglichkeit zur Produktion der unreifen p55-core Partikel in eukaryontischen Expressionssystemen ermöglicht es uns, einen Untereinheiten-Impfstoff zu entwerfen, der den oben aufgeführten Ansprüchen gerecht wird. Autologe p55-core Partikel werden von unserer Gruppe und von anderen im Vakzinia- und Bakulo-Expressionssystem hergestellt. Wie schon von anderen Untereinheiten-Impfstoffen her bekannt (z.B. Hep. B 22 nm Partikel), zeigen partikuläre Strukturen intrinsische adjuvante Eigenschaften, welche in unserer Erfindung zur Anwendung kommen.

Die Produktion der rekombinanten p55/gp 120 Hybridpartikel entsprechend der Erfindung

**[0027]** Als Konsequenz dieser Befunde verwendeten wir p55-core-Partikel als autologen Träger für geeignete Epitope und zwar unabhängig vom Kontext anderer Leserahmen:

- 1) p55-gag wurde in einen kommerziellen pUC-Vektor inkloniert und im E. coli-Stamm JM109 exprimiert. Zur Klonierung des authentischen p55-Proteins ohne nichttranslatierte Sequenzen wurde die PCR („Polymerase Chain Reaktion“ – Polymerase-Kettenreaktion) angewen-

det. Die anschließende Expression in eukaryontischen Systemen wurde mittels rekombinanter Vakzinia- und Bakuloviren erreicht. Die Ausbildung von p55 Partikel wurde durch Sacharosedichtegradienten-Zentrifugation und Elektronenmikroskopie bestätigt.

2) Die Identifizierung geeigneter Positionen zur Insertion von Epitopen aus anderen Leserahmen in das p55-core-Protein wurde mittels Computer-unterstützter Analyse der p55-Sekundärstruktur erreicht (Wolf et al., 1988). Durch diese Vorgehensweise konnten wir die Oberflächenexposition von vier Regionen auf dem p55-core-Protein vorher-sagen.

3) Zur Entwicklung der rekombinanten p55-core/gp120-env-Sequenzen wurde ein Polylinker synthetisiert. Diese Linkersequenz enthält alle Restriktionsschnittstellen, welche für die Entwicklung und anschließende Expression der drei distinkten p55-Deletionskonstrukte, denen jeweils der kodierende Bereich für 30–45 Aminosäuren fehlt, notwendig sind. Diese Kompatibilität aller Deletionskonstrukte zur Insertion fremder Sequenzen ermöglichte die darauffolgende Expression in eukaryontischen Vektorsysteme.

4) In einem ersten Anlauf wurden für die Insertion in die p55-Deletionskonstrukte drei Epitope aus dem HIV-1 gp120-env-Leserahmen ausgesucht:

#### Die CD4-bindende Region

**[0028]** Die Adsorption von freiem Virus und HIV-infizierten Zellen an CD4-Zielzellen wird dirigiert durch die Bindung des viralen externen Membranproteins gp120 an das zelluläre Membranprotein CD4. Das CD4-Rezeptormolekül wird hauptsächlich auf T4-Lymphozyten und Zellen der Monozyten- und Makrophagen-Linie exprimiert. Eine C-terminale Region des gp120 (AS 413–451), welche für die Interaktion mit dem CD4 Rezeptor verantwortlich ist, liegt in verschiedensten HIV-Isolaten hoch-konserviert vor (Kowalski et al., 1987, Lasky et al., 1987). Obwohl diese CD4-bindende Region im Verlauf der Infektion beim Menschen nicht immunogen zu sein scheint, konnte gezeigt werden, daß die Insertion dieser Region in das VP1-Oberflächen-Strukturprotein von Poliovirus neutralisierende Antikörper in infizierten Tieren zu induzieren vermag. Zusätzlich besitzen monoklonale Antikörper, die gegen diese Sequenz gerichtet sind, neutralisierende Eigenschaften und verhindern in vitro die Synzytienbildung durch Blockierung der CD4-abhängigen Anheftung von freiem Virus oder HIV-infizierter Zellen an die Zielzelle (Sun et al., 1989).

#### Die GPGR-V3-Schleife von gp120

**[0029]** Die hypervariable V3-Schleife des gp120 würde von unserer Gruppe als die einzige hypervariable Region ohne Konsensussequenz für N-Glykosy-

lierungen beschrieben und hinsichtlich ihrer immunologischen Bedeutung diskutiert (Modrow et al., 1987). Diese Region konnte als HIV-1 hauptneutralisierendes Epitop identifiziert werden und würde einer 24 Aminosäuren (AS) langen Sequenz (AS 302–326) zugeordnet. Ein 6 AS langes Peptid ist ausreichend zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern. Diese Sequenz beinhaltet ein 4 AS langes betq-Schleifen-GPGR-Motiv, welches in verschiedensten Isolaten hochkonserviert vorliegt (Palker et al., 1988, Goudsmit et al., 1988). Die flankierenden Aminosäuren scheinen wichtig für die Generierung von Antikörper und der Fähigkeit zur Typ-spezifischen Virusneutralisation zu sein. Eine 14-AS Sequenz (315–329) konnte als eine ADCC-Zielregion identifiziert werden. Überdies konnte im Mausmodell gezeigt werden, daß MHC Klasse I -restringierte cytotoxische T-Zellen ein 18 AS-Peptid innerhalb der V3-Region erkennen können (Takahashi et al., 1988). Wie die anti-V3 neutralisierenden Antikörper in vitro die Infektion sowie die Synzytienbildung verhindern, ist jedoch bislang noch unklar. Hinweise geben neuste Befunde, die zeigen, daß gp120 unter bestimmten Reaktionsbedingungen möglicherweise in 2 Polypeptide (50 KD, 70 KD) gespalten wird. Die Schnittstelle ließ sich direkt der konservierten GPGR-Sequenz innerhalb der V3-Schleife zuordnen. Die prozessierte Form des gp120 kann zwar immer noch an das CD4-Molekül binden, wird aber nicht mehr von anti-V3 neutralisierenden Antikörpern erkannt. Trypstatin, ein neuer Proteaseinhibitor vom Kunitz-Typ, der eine hohe Sequenzhomologie zur gp120-V3 Region aufweist, inhibiert die beschriebene Proteaseaktivität und unterbindet die darauffolgende Synzytiumbildung. Diese V3-abhängigen, Postbindungs- und Prozessierungsereignisse scheinen eine Voraussetzung für die Membranfusion der äußeren viralen Membran bzw. HIV-1 infizierter Zellen mit den CD4-Zielzellen zu sein (Hattori et al., 1989). Im Wesentlichen könnte diesen inhibitorischen Effekt der anti-V3-neutralisierenden Antikörper erklären. Kürzlich bekannt gewordene Ergebnisse zeigen, daß die Deletion dieser Schleife in einem infektiösen Klon die Infektiosität des Virus zerstört.

#### Die konservierte gp41-Region

**[0030]** Das gp41-Molekül vermittelt sowohl die Fusion von membrangebundenem HIV mit der CD4-Zielzelle, als auch die Ausbildung von Synzytien von infizierten mit nicht-infizierten Zellen (Kowalski et al., 1987, Mc Clure et al., 1988). Monoklonale Antikörper gegen das gp41 gruppen-spezifische Antigen neutralisieren in vitro eine Reihe von verschiedenen HIV-1-Isolaten. Die Insertion des gp41-neutralisierenden Epitops in das Poliovirus VP1 und die Immunisierung von Versuchstieren resultierte in der Induktion von anti-gp41-neutralisierenden Antikörpern, welche eine Synzytienbildung verhindern konnten (Evans et al., 1989).

**[0031]** Die CD4-bindende, sowie die fusogene Region in gp41 konnten mittels PCR vervielfältigt und in die p55-Deletionskonstrukte subkloniert werden. Die Konsensussequenz des gp120-hauptneutralisierenden Epitops V3 wurde chemisch synthetisiert und ebenso in die p55-Deletionsklone integriert. Um die korrekte Expression der neu gestalteten p55/gp120-Fusionsproteine zu überprüfen, wurden die rekombinanten Proteine in *E. coli* produziert und durch Western-Blot-Analyse verifiziert. Nachdem die endgültigen rekombinanten p55/gp120-Konstrukte in einen eukaryontischen Transfervektor subkloniert waren, wurden diese Hybridgene im Vaccinia- und Bakulovirus-Expressionssystem exprimiert. Die korrekte Expression wurde mittels Western-Blot-Analyse und Immunfluoreszenz überprüft. Durch Elektronenmikroskopie konnte die Partikelbildung eingehend studiert werden.

#### Kurzbeschreibung der Figuren

**[0032] Fig. 1:** Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des *E. coli*-Expressionsklones pUC8p55

**[0033] Fig. 2:** Expression von p55 (v-p55) alleine und p55 in Kombination mit der HIV-Protease (v-p55prt) mittels rekombinanter Vacciniaviren. CV1-Zellen wurden mit 10 pfu von p55-rekombinanten Vacciniavirus infiziert. 36 Stunden nach Infektion (v-p55) sowie nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden die Zellen geerntet und in Probenpuffer aufgenommen. Die infizierten Zellen wurden wie folgt einer konventionellen Western-Blot-Analyse unterzogen:

**[0034]** Zellysate wurden in einer 17,5% PAGE aufgetrennt und auf Nylonmembranen (Schleicher und Schuell) transferiert. Die rekombinanten 55KD- und 41KD-Proteine wurden durch monoklonale Antikörper detektiert, welche spezifisch p24 (mAk 13/5) und p17 erkennen. Es konnte zudem experimentell belegt werden, daß die HIV-1 Protease keinen Einfluß auf die Expression von p55 im Vaccinia-Expressionssystem hat. Durch die Bindung des anti-p17-monoklonalen Antikörpers an das verkürzte 41 KD-Produkt konnte gezeigt werden, daß wenigstens Teile des verkürzten Produkts identisch mit der N-terminalen Sequenz des kompletten 55KD-Proteins sind.

**[0035] Fig. 3:** Expression von p55 mittels rekombinanter Bakuloviren (b-p55). *Spodoptera frugiperda*-Zellen wurden mit 10 PFU des beschriebenen Virus infiziert. Bis zum 5. Tag nach der Infektion wurden die infizierten Zellen täglich geerntet. Zellen von Tag 1 bis 5 und Zellkulturüberstand von Tag 5 wurden in Auftragspuffer aufgenommen und einer konventionellen Western-Blot-Analyse unterzogen. Rekombinante Proteine wurden mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen p24 spezifisch detektiert.

**[0036] Fig. 4:** 5 Tage nach Infektion wurden 2 ml Zellkulturüberstand einer Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation (2,5 Stunden; TST 41.14; 28000 UPM) unterworfen und analysiert. 19 Fraktionen (600µl) wurden gesammelt und jeweils 20 µl davon einer konventionellen Western-Blot-Analyse unter Verwendung monoklonaler p24 spezifischer Antikörper zur Detektion des rekombinanten Proteins unterzogen. Die unreifen p55-Partikel akkumulierten, wie die darauffolgende Negativkontrastierung zeigte, in Fraktion 17 bei einer Saccharosedichte von 45%.

**[0037] Fig. 5:** Mit 10 PFU b-p55 infizierte *Spodoptera frugiperda*-Zellen wurden 5 Tage nach Infektion in 2% Glutaraldehyd fixiert und auf Partikelbildung hin an Ultradünnschnitten im Elektronenmikroskop untersucht. Unreife 90–110 nm p55-Partikel wurden beim Ausknospen aus der Zytoplasmamembran nachgewiesen.

**[0038] Fig. 6:** Mit Hilfe von Computer-unterstützten Analysen der p55 Sekundärstruktur konnte die Oberflächenexposition von 4 Regionen sowie darin befindlicher Epitope auf dem core-Protein vorhergesagt werden. Diese Regionen wurden deletiert und durch kleine, für die einfache Integration von Fremdepitopen ausgesuchte, Polylinker ersetzt.

**[0039] Fig. 7:** Dargestellt sind, die in der PCR-Reaktion verwendeten synthetische Startersequenzen. Kleine synthetische Linker-Fragmente wurden verwendet, die die p55-Deletionskonstrukte untereinander kompatibel machen sollten und zwar unter besonderer Berücksichtigung des Leserahmens der inserierten Fremdepitope, sowie eines synthetisch hergestellten HIV-1 gp120-Epitopes.

- a) synthetischer Polylinker für die Konstruktion des von pUC8 abgeleiteten plin8-Vektors.
- b) synthetische Startersequenzen, welche für die Vervielfältigung des 3'-Teils des p55-Deletionskonstruktes-4 verwendet wurden.
- c) synthetische Startersequenzen, welche für die Vervielfältigung der HIV-1 abgeleiteten CD4-bindenden Region gp120 notwendig sind.
- d) synthetische Startersequenzen, welche für die Vervielfältigung der HIV-1 abgeleiteten fusogenen Region gp41 verwendet wurden.
- e) Sequenz einer chemisch synthetisierten Konsensusregion des HIV-1 hauptneutralisierenden Epitopes V3.

**[0040] Fig. 8:** Klonierungsstrategie für die Entwicklung des plin8p55 1-Konstruktes

**[0041] Fig. 9:** Klonierungsstrategie für die Entwicklung des plin8p55 2-Konstruktes

**[0042] Fig. 10:** Klonierungsstrategie für die Entwicklung des plin8p55 3-Konstruktes

**[0043]** [Fig. 11](#): Klonierungsstrategie für die Entwicklung des plin8p55 4-Konstruktes

**[0044]** [Fig. 12a](#): Expression von drei verschiedenen plin8p55-Deletionskonstrukten (plin8p55 2, 3, 4) neben den entsprechenden Klonen mit der inserierten Konsensussequenz des HIV-1-hauptneutralisierenden Epitopes V3 (plin8p55V3-2,-3-4). Rekombinante Bakterien wurden bis auf eine optische Dichte von 0,6 kultiviert, dann mit 2mM IPTG für 2 Stunden induziert, mit Auftragspuffer lysiert und durch konventionelle Western-Blot-Analyse charakterisiert. Die rekombinanten p55V3-Fusionsproteine wurden spezifisch durch einen monoklonalen Antikörper gegen das p24 (a) sowie durch ein humanes Serumgemisch (b) detektiert.

**[0045]** [Fig. 12b](#): Expression von vier unterschiedlichen plin8p55-Deletionskonstrukten (plin8p55 1, 2, 3, 4) neben den entsprechenden Klonen mit der inserierten CD4-bindenden Region innerhalb von HIV-1 gp 120 C3 (plin8p55CD4-1,-2,-3-4). Rekombinante Bakterien wurden bis auf eine optische Dichte von 0,6 kultiviert, dann mit 2mM IPTG für 2 Stunden induziert, mit Auftragspuffer lysiert und durch konventionelle Western-Blot-Analyse charakterisiert. Die rekombinanten p55CD4-Fusionsproteine wurden spezifisch durch einen monoklonalen Antikörper gegen das p24 detektiert.

**[0046]** [Fig. 13](#): Expression dreier verschiedener p55/V3-Fusionsproteine (p55/V3-2,3,4) in *E. coli*, nach Induktion mit 2mM IPTG für 2 Stunden und bei einer O.D von 0.6. Die rekombinanten p55V3-Fusionsproteine wurden spezifisch durch einen monoklonalen Antikörper gegen das p24 (a) sowie gegen das V3-Epitop (c) eines fremden Isolats (IIIb) nachgewiesen. Ein polyklonales Serum gegen ein die V3-Konsensussequenz repräsentierendes, synthetisches Peptid erkannte das p55/V3 sogar besser als der von IIIb-Peptiden abgeleitete Antikörper. Die Tatsache, daß weder der monoklonale Antikörper, noch das polyklonale V3-spezifische Serum, das p55V3-2-Protein erkennen konnte, legt nahe, daß der antigene Kontext der V3-Region wichtig für die immunologische Detektion ist.

**[0047]** [Fig. 14](#): CV-1 Zellen wurden mit 10 PFU v-p55V3-3 infiziert, nach 2 Tagen geerntet und mittels konventioneller Western-Blot-Analyse, unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen das p24, sowie der IIIb abgeleiteten V3-Region, charakterisiert.

Beispiele zur Veranschaulichung der Erfindung

Beispiel 1: Expression von p55 in *E. coli* (Standardverfahren: Sambrook et al., 1989)

**[0048]** Vor der Produktion von p55 in eukaryontischen Expressionssystemen war es notwendig, das

Gen in *E. coli* zu klonieren und zu exprimieren. Für eine vorläufige Expression wurde das pUC-Vektorsystem verwendet. Um die 5'-Sequenz des vollständigen Proteins exakt und ohne größere nicht-translatierte Bereiche klonieren zu können, inserierten wir ein synthetisches 62 bp-Oligonukleotid, welches die 15 N-terminalen AS von p55 kodiert und im gleichen Leserahmen wie das lacZ alpha-Fragment liegt, in die BamHI/HindIII-Schnittstellen des pUC 8-Vektors. Zwei im 3'-Bereich des Oligonukleotides gelegene Restriktionschnittstellen, ClaI und Sall, ermöglichten uns die Insertion eines 1694 bp p55-ClaI/HincII-Fragments ([Fig. 1](#)). Nach Induktion mit 2 mM IPTG konnte die Expression des rekombinanten Proteins in *E. coli* mittels konventioneller Western-Blot-Analyse unter Verwendung von anti-p24-Antikörpern gezeigt werden.

Beispiel 2: Expression von p55 mittels rekombinanter Vakziniaviren

**[0049]** Das BamHI/Sall-Fragment umfaßt den vollständigen p55-Leserahmen und konnte direkt in den pAvB-Transfervektor subkloniert und in Vakziniaviren einrekombiniert werden. Die Expressionsprodukte wurden mittels Western-Blot unter Verwendung von anti-p24-Antikörpern analysiert ([Fig. 2](#)).

Beispiel 3: Expression von p55 mittels rekombinanter Bakuloviren

**[0050]** Um das Protein mit Hilfe rekombinanter Bakuloviren exprimieren zu können, mußte es zweimal subkloniert werden: Das BamHI/Sall-Fragment mußte zunächst in die BamHI/Sall-Schnittstellen des pUC 19 inseriert werden. Dann wurde das für p55 kodierende SacI/Sall-Fragment weiter in, die SacI/Sall-Schnittstellen eines kommerziellen pC19R-Vektors einkloniert. Nach dieser Prozedur konnte die p55-kodierende Region in eine singuläre Schnittstelle des Bakulotransfervektors pVL941 (Summers et al., 1988) einkloniert werden. Nach einem Rekombinationsereignis wurde das core-Protein mit Hilfe p55-rekombinanter Bakuloviren in *Spodoptera frugiperda*-Insektenzellen exprimiert. Die Expression wurde mittels Western-Blot nachgewiesen ([Fig. 3](#)).

Beispiel 4: Identifizierung der unreifen p55 Partikel

**[0051]** Die Erzeugung der p55-Partikel wurde mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation-Analyse und Elektronenmikroskopie charakterisiert. Saccharosegradienten wurden bei 28000 UPM für 150 Minuten in einem TST 41.14 Rotor zentrifugiert. 19 Fraktionen wurden durch Negativ-Kontrastierung und Western-Blot-Analyse auf p55 Partikel untersucht. Partikel akkumulierten in der Fraktion 17 bei einer Saccharosedichte von 1,41 ([Fig. 4](#)). Eine Analyse der *Spodoptera frugiperda*-Zellen am Ultradünnschnitt im Elektronenmikroskop zeigte unreife

p55-Partikel, im Begriff aus der Zytoplasmamembran in das Zellkulturmedium zu knospen ([Fig. 5](#)).

Beispiel 5: Computeranalyse der Sekundärstruktur von p55

**[0052]** Um in einem rationalen Ansatz ausgesuchte Epitope aus anderen Leserahmen in das p55-Protein zu inserieren, wurden verschiedenste p55-Deletionskonstrukte auf DNA-Ebene etabliert, denen Fragmente von 120 bis 180 by Länge fehlen. Basierend auf einer Computerunterstützten Analyse der p55-Sekundärstruktur entschieden wir uns dafür, vier 30 bis 45 AS kodierende Sequenzen, entsprechend ihrer Exposition auf der Oberflächen des p55-Proteins, zu deletieren. ([Fig. 6](#)). Alle Deletionsmutanten wurden vom Expressionsklon pUC8p55 abgeleitet.

Beispiel 6: Konstruktion der p55-Deletionskonstrukte

**[0053]** sBasis aller vier p55-Deletionskonstrukte war ein speziell entworfener, den pUC8 ergänzender Polylinker. Das neue Linkerfragment beinhaltet alle Restriktionsschnittstellen, die für die Konstruktion der vier verschiedenen p55-Deletionskonstrukte; deren direkte Expression in *E. coli*, sowie deren direkte Subklonierung in die finalen Transfervektoren für die eukaryontische Genexpression, notwendig sind. Das resultierende pUC8-Derivat wurde plin8 genannt ([Fig. 7a](#))

Referenz 1: p55 Deletionskonstrukt-1 (plin8p55 1)

**[0054]** Die Entwicklung des p55-Deletionskonstruktes-1 basierend auf dem pUC19p55-Klon wurde bereits oben beschrieben. Zur Entfernung zweier Accl-Schnittstellen wurde die p55-kodierende Region um das 1100 bp 3' PstI-Fragment verkürzt (pUC19p55BP). Ein 26 bp-Linkerfragment, welches zwei zusätzliche Restriktionsschnittstellen beinhaltet, wurde in die N-terminalen Clal/Accl-Schnittstellen der p55-kodierenden Region eingefügt, um die Kompatibilität mit den anderen schon beschriebenen p55-Deletionsklonen zu wahren. Anschließend würde die p55-kodierende Sequenz mit dein 3' PstI/Sall-Fragment vervollständigt (pUC19p551). Das resultierende p55-Deletionsfragment-1 wurde in den plin8-Vektor subkloniert (plin8p55 1) ([Fig. 8](#)).

Beispiel 7: p55-Deletionskonstrukt-2 (plin8p55 2)

**[0055]** Das vom pUC8 stammende 300 bp BamHI/HindIII-Fragment, welches für den N-terminalen Teil von p55 kodiert, würde in die BamHI/HindIII-Schnittstellen von plin8 kloniert (plin8p55BH). Anschließend wurde das 1283 bp 3' Nsil/Sall-Fragment in die PstI/Sall-Schnittstelle des plin8p55BH inseriert (plin8p55 2) ([Fig. 9](#)).

Beispiel 8: Entwicklung des p55-Deletionskonstrukts-3 (plin8p55 3)

**[0056]** Ein von pUC8p55 abgeleitetes BamHI/Sall-Fragment, welches für das komplette HIV-1 p55-core-Protein kodiert, wurde in die BamHI/Sall-Schnittstellen des beschriebenen plin8-Vektors subkloniert (plin8p55). Um die Kompatibilität des Konstrukts mit den anderen Deletionsklonen zu wahren, wurde ein 27 bp XhoI/SacI-Linker-Fragment in die PstI/Spel-Schnittstelle von plin8p55 inseriert. Das resultierende p55-Deletionskonstrukt wurde in plin8p55 3 umbenannt ([Fig. 10](#)).

Beispiel 9: Entwicklung des p55-Deletionskonstrukts-4 (plin8p55 4)

**[0057]** Die komplette von pUC8p55 abgeleitete gag-kodierende Sequenz wurde in die BamHI/Sall-Schnittstellen des plin8 einkloniert (plin8p55). Der 3'-Teil der p55-kodierenden Sequenz (welcher für AS 471–512 kodiert) wurde mittels PCR, unter Verwendung eines 61 bp 5'-Starters, welcher fünf verschiedene Restriktionsschnittstellen (BamHI, BglII, XhoI, EcoRI, SacI); und eines 21 bp 3'-Starters, welcher die HincII-Restriktionsschnittstelle enthält, vervielfältigt ([Fig. 7d](#)). Das so vervielfältigte BglII/Sall-Fragment würde in die BglII/Sall-Schnittstelle des plin8p55-Konstruktes inseriert ([Fig. 11](#)). Im finalen plin8p55 -Klon wurde eine 105 bp lange für 35 AS kodierende Sequenz deletiert.

Beispiel 10: Kompatibilität der vier p55-Deletionskonstrukte

**[0058]** Die entwickelten p55-Deletionskonstrukte sind kompatibel im Hinblick auf

1. die Insertion fremder Sequenzen. Eine definierte Sequenz kann in jede der vier Kassetten inseriert werden, ohne dabei den Leserahmen zu verändern.
2. die Möglichkeit zur direkten Subklonierung der kompletten Konstrukte in Vektoren, die eine eukaryontische Expression erlauben.

Beispiel 11: Expression der p55-Deletionskonstrukte in *E. coli*

**[0059]** Alle Deletionskonstrukte wurden in *E. coli* JM109 nach Induktion mit 2 mM IPTG exprimiert. Die Expressionsprodukte würden mittels konventioneller Western-Blot-Analyse unter Verwendung anti p24-monoklonaler Antikörper bestätigt.

Beispiel 12: Insertion von ausgesuchten Epitopen anderer Leserahmen

1. Die CD4-bindende Region des HIV-1 gp120 und die fusogene Region in gp41 wurden mittels PCR vervielfältigt. 5' Starter enthielten eine XhoI,

3'-Starter enthielten eine SacI-Schnittstelle, um die Insertion der vervielfältigten XhoI/SacI-Fragmente in das p55-Deletionskonstrukt zu ermöglichen ([Fig. 7e](#)).

2. Eine neu entworfene Konsensussequenz des gp120-hauptneutralisierenden V3-Epitopes wurde chemisch synthetisiert und in die XhoI/SacI-Schnittstelle des p55-Deletionskonstruktes integriert ([Fig. 7f](#)).

Beispiel 13: Expression des kompletten p55/gp120-Fusionsproteines in *E. coli*

**[0060]** Die unter Beispiel 15 beschriebenen p55/gp120-Fusionsprodukte wurden in *E. coli* nach Induktion mit 2 mM IPTG exprimiert und mittels konventioneller Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines anti-p24-monoklonalen Antikörpers und eines humanen Serengemisches analysiert ([Fig. 12A](#)).

Beispiel 14: Verifizierung der korrekten Expression eines inserierten Epitops

**[0061]** Die Expression des inserierten gp120-hauptneutralisierenden V3-Epitopes wurde unter Verwendung eines kommerziellen monoklonalen Antikörpers gegen die V3-Region des HTLVIIIb-Isolats durch konventionelle Western-Blot-Analyse bestätigt. Ein polyclonales monospezifisches Serum, welches gegen das synthetische V3-Konsensus-Peptid hergestellt wurde, erkannte ebenfalls die integrierten Epitope in der Western-Blot-Analyse.

Beispiel 15: Subklonierung der kompletten p55/gp120-Konstrukte in eukaryontische Expressionsvektoren

**[0062]** Die p55/gp120-Konstrukte wurden (i) in die BglII/SalI-Schnittstellen des Vakzinia-Transfervektors pAvB, (ii) in die singuläre BamHI-Schnittstelle des Bakulo-Transfervektors pVL941 und (iii) in die XbaI/SalI-Schnittstellen des pMD-Vektors für die Expression der chimären Proteine in CHO-Zellen inkloniert.

Beispiel 16: Expression der kompletten p55/gp120-Konstrukte in eukaryontische Expressionsvektoren

**[0063]** Nach Transfektion und Rekombination der Hybridgene in die virale DNA (Vakzinia, Bakulo) wurden die Fusionsproteine von den rekombinanten Vakzinia-viren in CV-1- sowie von den rekombinanten Bakuloviren in *Spodoptera frugiperda*-Zellen exprimiert. Die Expressionsprodukte wurden mittels konventioneller Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Analyse unter Verwendung spezifischer anti-p24 monoklonaler Antikörper bestätigt ([Fig. 14](#)).

Beispiel 17: Analyse der Partikelbildung

**[0064]** Die Ausbildung von Partikeln wurde durch elektronenmikroskopische Analyse von Ultradünnschnitten Glutaraldehyd-fixierter Zellen, welche mit p55 gp120-rekombinantem Vakzinia- bzw. Bakulovirus infiziert waren, überprüft.

## LITERATUR

- Berzofsky, J. A., Bensussan, A., Cease, K. B., Bourge, J. F., Salaun, J. J., Gallo, R. C., Shearer, G. M. and Zagury, 1988, Antigenic peptides recognized by T lymphocytes from AIDS viral envelope immune humans, *Nature*, Vol. 334, pp 706
- Chan, T. L., Dreesman, G. R., Kanda, P., 1986, Induction of anti HIV neutralizing antibodies by synthetic peptides; *Eur. Mol. Biol. Org.*, Vol. 5, pp 3065
- Cianciolo, G. J., Matthews, T. J., Bolognesi, D. P., Snyderman, R., 1980, Macrophage accumulation in mice is inhibited by low molecular weight products from murine leukemia viruses, *J. Immunol.*, Vol. 124, pp 2900–2905
- Clayton, L. K., Sieh, M., Pious, D.A., Reinherz, E. L., 1989, Identification of human CD4 residues affecting class II MHC versus HIV-1 gp120 binding, *Nature*, ol. 339, pp 548–551
- Evans D.J., McKeating J., Meredith J.M., Burke K.L., Katrak K.J., John, A., Ferguson, M., Minor, P.D., Weiss, R.A., Almond, I.W.: An engineered poliovirus chimera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies. *Nature*, 339 (6223), 385–388, 340, Juni 1989.
- Golding, H., Robey, F. A., Gates, F. T. et al., 1988, Identification of homologous regions in HIV-1 gp41 and human MHC class II domain, *J. Exp. Med.*, Vol. 167, pp914
- Golding, H., Shearer, G., M., Hillman, K. et al., 1989, Common epitope in HIV-1 gp41 and HLA class II elicits immunosuppressive autoantibodies capable of contributing to immune dysfunction in HIV infected individuals. *J. Clin. Invest.*, Vol. 83, pp1430
- Goudsmit, I., Debouck, C., Moloen, R.H., Smit, L., Bakker, M., Asher, D.M., Wolff, A.V., Gibbs, C.J., Gajdusch, D.C. (1988) Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *PNAS-USA*, Vol. 85, p. 4478.
- Hattori, T., Koito, A., Takatsuki, K., Kido, H., Katunuma, N. (1989) Involvement of tryptase-related cellular proteases in human immunodeficiency virus type 1 infection. *FEBS-Lett.*, Vol. 248, p. 48–52.
- Homsy J., Meyer M., Tateno M., Clarkson S., Levy J. A., 1989. The Fc and not CD4 Receptor mediates Antibody Enhancement of HIV Infection in human Cells. *Science* 244, 1357–1360.
- Hu, S.L., Fultz, P.N., McClure, H.M., Eichberg, J.W., Thomas, E.K., Zarling, J., Snighal, M.C., Kosowski, S.G., Swenson, R.B., Anderson, D.C., Todaro, G.

- (1987) Effect of Immunization with a vaccinia-HIV env recombinant on HIV infection of chimpanzees. *Nature*, Vol. 328, p. 721.
- Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfmann, T., Goh, W. C., Terwilliger, E., Dayton, A., Rosen, C., Haseltine, W., Sodroski, J., 1987. Functional Regions of the Envelope Glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Science* 237, 1351–1355.
- [0065]** Krohn, K., J. E., Lusso, E., Gallo, R. C. et al., 1988, Identification of two T cell specific epitopes in the conserved regions of human immunodeficiency virus glycoprotein. In: vaccines 88-new chemical and genetic approaches to vaccination: Prevention of AIDS and other viral, bacterial and parasitic disease eds. Ginsberg, H., Brown, F., Renner, T, A., Chanock, R. M., Cold spring harbour, New York: Cold spring harbour laboratory, pp, 357
- [0066]** Lancavecchia, A., Roosney, E., Gregory, T., Berman, P., Agrignani, S., 1988, T cells can present antigens such as HIV gp120 targeted to their own surface molecules, *Nature*, Vol. 334, pp530
- [0067]** Lasky, L. A., Nakamura, G., Smith, D. H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Bermann, P., Gregory, T., Capon, D. J., (1987). Delineation of a Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Glycoprotein Critical for Interaktion with the CD4 Receptor. *Cell* 50, 975–985.
- [0068]** Lyerly H. K., Matthews T. J., Langlois, A. J., Bolognesi, D. P., Weinhold, K J., 1987, Human T-cell lymphotropic virus IIIB glycoprotein bound to CD4 determinants on normal lymphocytes and expressed by infected cells serves as a target for immune attack, *PNAS-USA*, Vol. 84, pp 4601
- [0069]** Lyerly H. K., Reed D, L., Matthews T. J., 1988, Anti gp120 antibodies from HIV seropositive individuals mediate broad reactive anti-HIV ADCC, *AIDS Res Hum Retrovirus*; Vol. 3, pp 409
- [0070]** McClure, M. O., Sattenau, Q, J., Beverly, P. C. L., Hearn, J. P., Fitzgerald, A. K., Zuckermann, A. J., Weiss, R. A., (1987). HIV Infection of Primate Lymphocytes and Conservation of the, CD4 Receptor, *Nature (London)* 330, 487-489.
- [0071]** Milich, D.R., Huges, J.L., McLachlan, A., Thornton, G.B., Moriarty, A. (1988) Hepatitis B synthetic immunogen comprised of nucleocapsid T-cell sites and an envelope B-cell epitope, *PNAS-USA*, Vol. 85, p. 1610
- [0072]** Modrow, S., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Gallo, R. C., Wong-Stahl, F., Wolf, H., 1987. Computer-assisted Analysis of Envelope Protein Sequences of seven Human Immunodeficiency Virus Isolates: Prediction of Antigenic Epitopes in Conserved and Variable Regions. *J Virol* 61, 570–578.
- [0073]** Nara, P.L., Robey, W.G., Pyle, S.W., Hatch, W.C., Dunlop, N.M., Bess, I.W. Kelliher, J.C., Arthur, L.O., Fischinger, P.J. (1988) Purified envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus type 1 variants induce individual, type specific neutralizing antibodies. *J. Virol.*, Vol. 62, p. 2622.
- [0074]** Nixon; D. F., Townsend, A. R. M., Elvin, J. G., Rizza, C., R., Gallwey, J. and Mc Micehael, A. J., 1988, HIV-1 gag specific cytotoxic T- lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides, *Nature*, Vol, 336, pp. 484
- [0075]** Palker, T.J., Clark, M.E., Langlois, A.J., Matthews, T.J., Weinhold, K.J., Randall, R.R., Bolognesi, D.P., Haynes, B.F. (1988) Type specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *PNAS-USA*, Vol. 85, p. 1932.
- [0076]** Papsidero, L.D., Sheu, M., Ruscetti, F.W. (1989) Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibodies which react with p17 core protein: characterization and epitope mapping. *J. viral.*, Vol. 63, p.267.
- [0077]** Reiher, W. E., Blalock, J. E., Brunck, T. K., 1989, Sequence homology between aquired immunodeficiency syndrome virus envelope protein and interleukin 2, *PNAS-USA*, Vol. 83, pp9188
- [0078]** Robinson, W.E., Mantefiori, D.C., Mitchell, W.M., Bruice, A.M., Altor, H.J., Dreesman, G.R., Eichberg, J.W., 1989, Antibody dependent enhancement on human immunodeficiency virus type 1 infection in vitro by serum from HIV-1 infected and passively immunized chimpanzees, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 86, pp 4710
- [0079]** Schrier, R. D., Gnann, J. W., Landes, R., Lockshin, C., Richman, D., McCutchan, A., Kennedy, C., Oldstone, M. B. and Nelson, J. A., 1989, T-cell recognition of HIV synthetic peptides in a natural infection, *J. Immunol.* pp. 1166
- [0080]** Siliciano, R. F., Lawton, T., Knall, C. et al., 1988, Analysis of host virus interactions in AIDS with anti-gp120 T cell clones: effect on HIV sequence variation and a mechanism for CD4+ cell depletion, *Cell*, Vol. 54, pp 561
- [0081]** Siliciano, R. F., Lawton, T., Knall, C., Karr, R. W., Berman, B., Gregory, T. and Reinherz, E. L., 1988, Analysis of host-virus interactions In AIDS with anti gp120 T-cell clones: effect of HIV sequence variation and a mechanism for CD4+ cell depletion, *Cell*, Vol. 54, pp. 561

**[0082]** Skinner M. A., Langlois, A. J., McDanal, C. B., Mc Dougal, J. S., Bolognesi, D. P., Mathews, T., J., 1988, Neutralizing antibodies to immunodominant envelope sequenz do not prevent gp120 binding to CD4, J. Virol., Vol. 62, pp4195

**[0083]** Sun, N-C., Ho, D. D., Sun, C. R. Y., Liou, R-S., Gordon, W., Fung, M. S. C., Li, X-L., Ting, R. C., Lee, T-H., Chang, N. T., Chang; T-W., (1989). Generation and Characterisation of Monoclonal Antibodies to the Putative CD4-Binding Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120. J Virol 63, 3579-3585.

**[0084]** Takahashi, H., Cohen, J., Hosmalin, A., Cease K.B., Houghten, R., Cornette, I.L., De Lisi, C., Moss, B., Germain, R.N., Berzofsky, I.A. (1988) An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted murine cytotoxic T-lymphocytes. PNAS-USA, Vol. 85, p. 3105.

**[0085]** Takeda, A., Tuazon, C. U., Ennis, F. A., 1988, Antibody enhanced infection by HIV-1 via FC-receptor mediated entry. Science, Vol. 242, pp 580

**[0086]** Vornhagen, R., Motz, M., Soutschec-Bauer E., Pichler W., Siegl G., Hinderer W., Wolf H., Sonneborn H.-H., 1989, The determination of additional serological markers concerning HIV-infection using recombinant viral antigens of all HIV-1 reading frames, V. int. conf. on AIDS, (abs. W.B.P.118) abs. M.C.O.7)

**[0087]** Walker, D. B., Birch-Limberger, K., Fischer, L., Young, R., Moss, B. and Schooley, R. T. 1989, Longterm culture and fine antigen specificity of HIV-1 reverse transcriptase-specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL) clones. V int. Conf. on AIDS, Montreal, (abs. W.C.O.43

**[0088]** Walker, D.B., Flexner, C.W., Paradis, T.J., Fuller, T.C., Hirsch, M.S., Schooley, R.T., Moss, B., 1988, HIV-1 Reverse Transcriptase is a target for cytotoxic T-lymphocytes in infected individuals.

**[0089]** Weinhold, K. J., Lyster, H. K., Stanley, S. D., Austin, A. A., Matthews, T. J., Bolognesi, D. P., 1989, HIV-1 gp120-mediated immune suppression and lymphocyte destruction in the absence of viral infection, J. Immunol., Vol. 142, pp 3091-3097

**[0090]** Wolf, H., Modrow, S., Motz, M., Jameson, B., Herrmann, G. and Förtsch B., 1988, An integrated family of aminoacid sequence analysis programs, Cabis, Vol. 4, pp 187

**[0091]** Wolf, H., Modrow, S., Soutschek, E., Motz, M., Grunow, R., Döbl, H., v. Baehr, R. (1990) Herstellung, Kartierung und biologische Charakterisierung

von monoklonalen Antikörpern gegen das Core protein (p24) des humanen Immundefizienz-Virus. AIFO, Vol. 1.

### Patentansprüche

1. Modifiziertes retrovirales gag-Polypeptid, das ein Partikel bildet, wobei das gag-Polypeptid mindestens eine Aminosäuresequenz enthält, die eine nicht-gag-Polypeptid-antigene Determinante darstellt, wobei das gag-Polypeptid p55 von HIV-1 ist, wobei die Aminosäuresequenz (einen) Bereiche) des gag-Polypeptids ersetzt, der (die) die eingefügte Aminosäuresequenz dem Immunsystem präsentieren kann/können, so daß eine Immunantwort hervorgerufen wird, und wobei der Bereich in den Aminosäurepositionen 99 bis 154, 211 bis 241 oder 436 bis 471 oder jeder Kombination davon liegt.

2. Modifiziertes retrovirales gag-Polypeptid nach Anspruch 1, wobei die nichtgag-Polypeptid-antigene Determinante

(a) mindestens ein Teil der CD4-bindenden Domäne von gp120;

(b) mindestens ein Teil des variablen Bereichs 3 von gp120; oder

(c) mindestens ein Teil des fusogenen Bereichs von gp41 ist.

3. DNA-Sequenz, die das modifizierte retrovirale gag-Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2 codiert.

4. DNA-Sequenz nach Anspruch 3, wobei die DNA-Sequenz, die die Aminosäuresequenz codiert, über einen Linker eingefügt ist.

5. Rekombinanter Vektor, der eine DNA-Sequenz nach Anspruch 3 oder 4 beinhaltet.

6. Rekombinantes Virus, das eine DNA-Sequenz nach Anspruch 3 oder 4 beinhaltet.

7. Rekombinantes Virus nach Anspruch 6, das ein Vaccinia-Virus ist.

8. Wirtsorganismus, der mit einem rekombinanten Vektor nach Anspruch 5 oder einem rekombinanten Virus nach Anspruch 6 oder 7 transformiert ist.

9. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten retroviralen gag-Polypeptids nach Anspruch 1 oder 2, das das Züchten eines Wirtsorganismus nach Anspruch 8 unter geeigneten Bedingungen und die Gewinnung des Expressionsprodukts aus dem Medium umfaßt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der Wirtsorganismus eine Insektzelle ist, vorzugsweise eine Spodoptera frugiperda-Zelle, und wobei das Virus, mit dem die Insektzelle transformiert ist, ein rekomb-

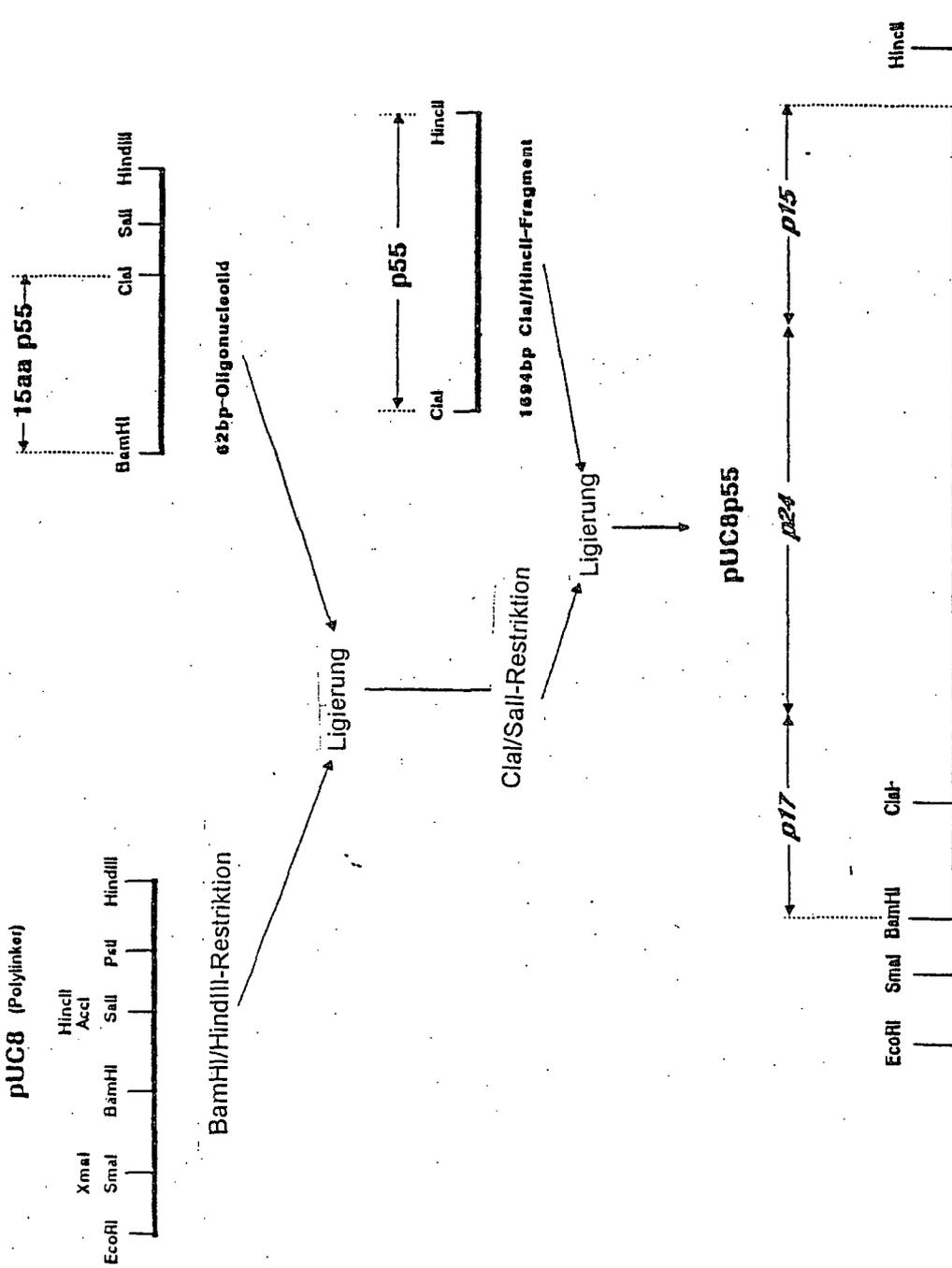
binantes Insektenvirus ist, vorzugsweise ein Baculovirus.

11. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Wirtszelle eine Insektenzelle ist, vorzugsweise eine *Drosophila* Schneider-Zelle, und wobei der rekombinante Vektor, mit dem die Insektenzelle transformiert ist, in Insektenzellen stabil replizierbar ist.

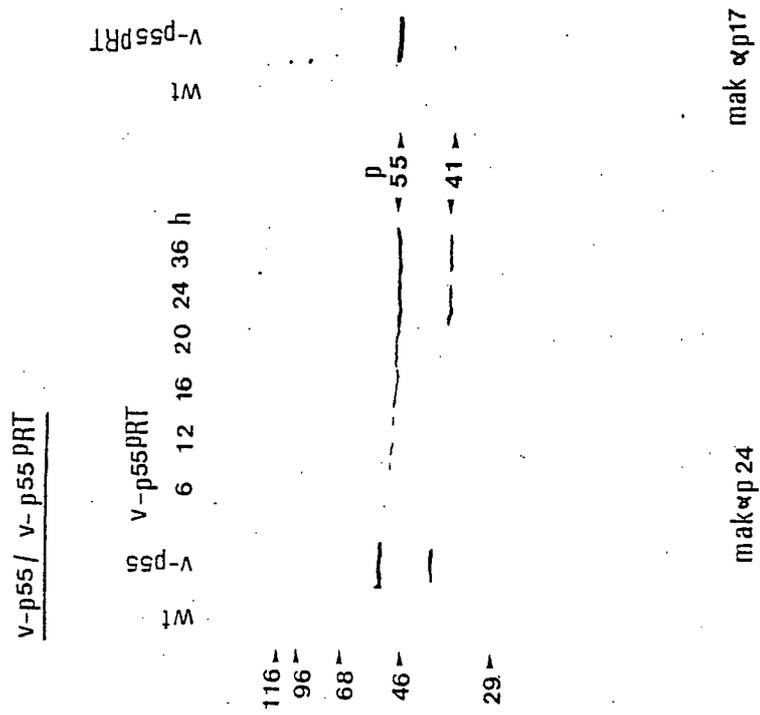
12. Impfstoff, der ein rekombinantes Virus nach Anspruch 6 oder 7 oder ein modifiziertes retrovirales gag-Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2 beinhaltet, gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Verdünnungsmittel.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

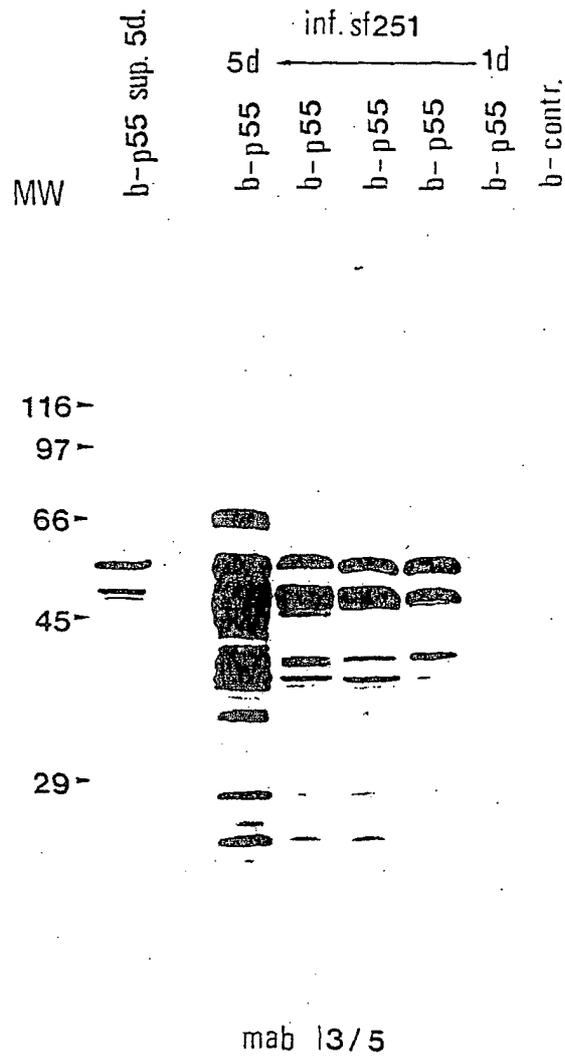


Figur 1



Figur 2

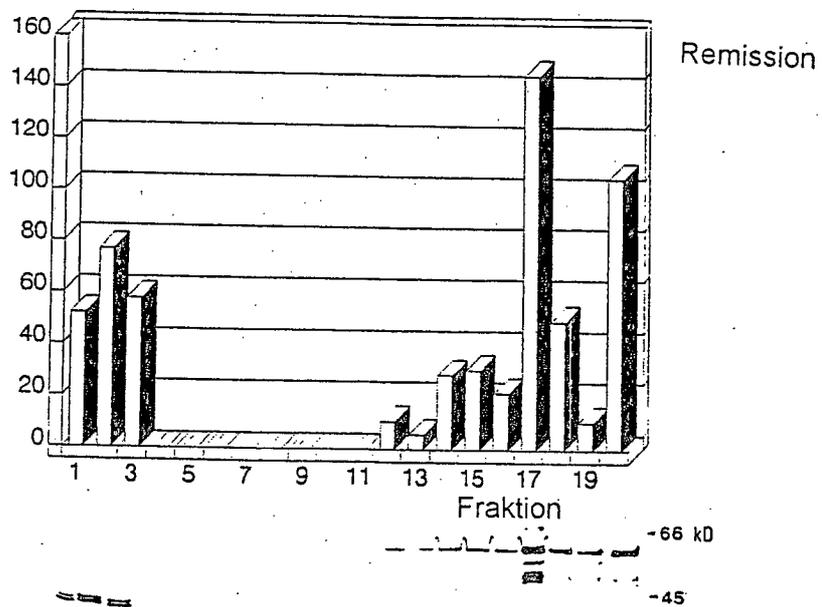
Expression von p55 in Baculo



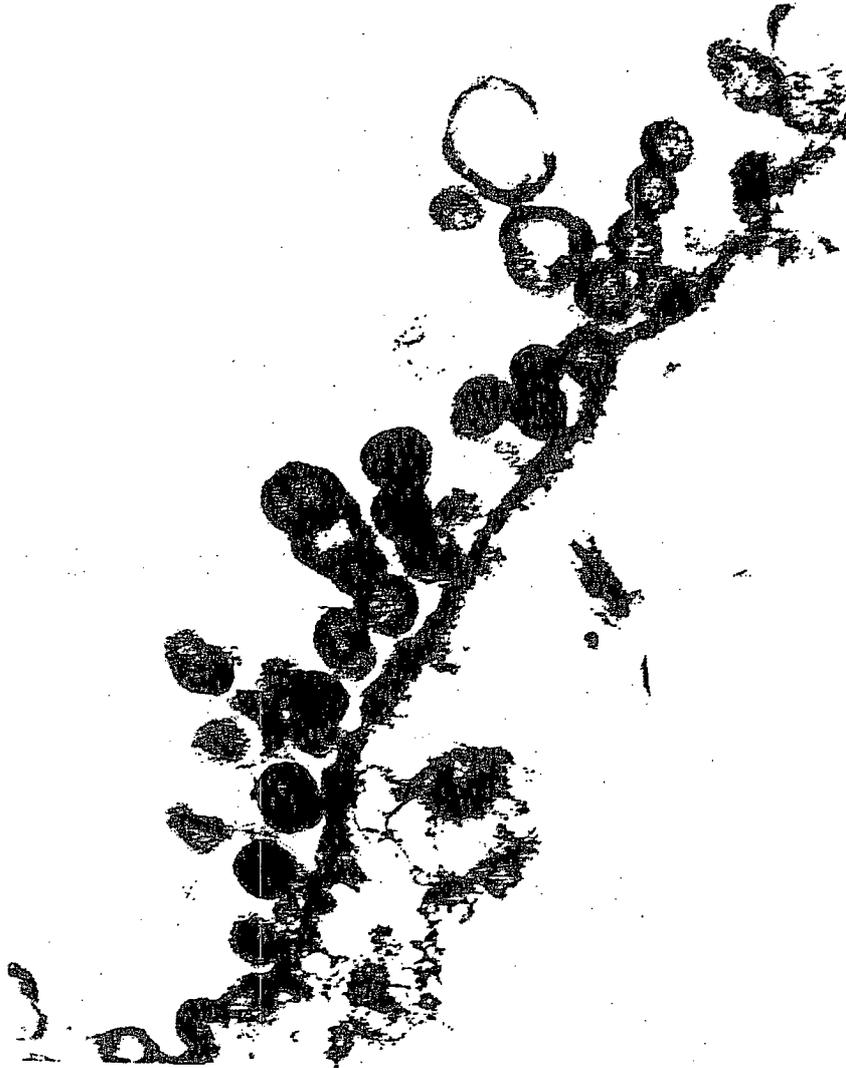
Figur 3

Sedimentationsanalyse – Saccharose 10-60%

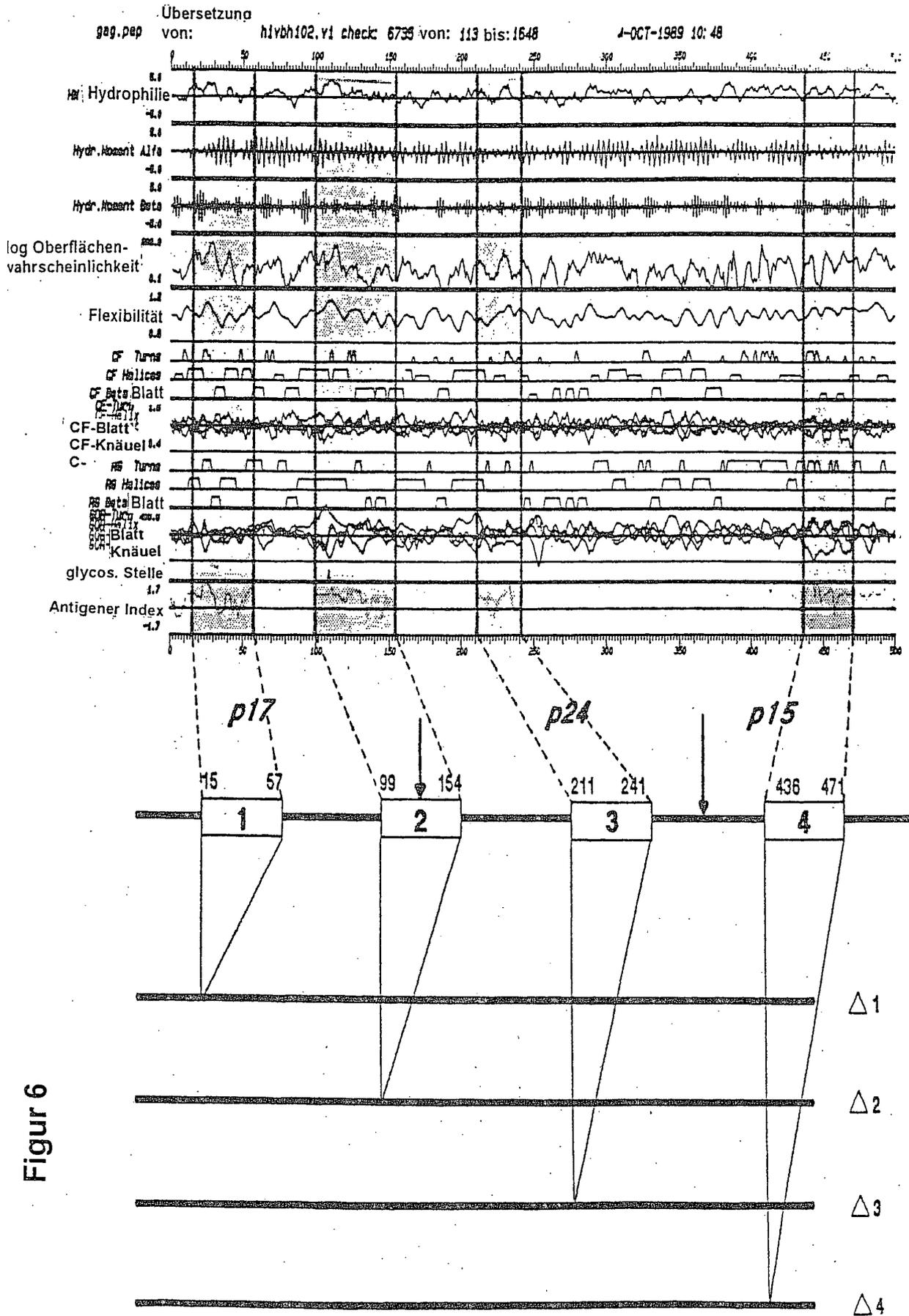
b-p55 infizierte SF9/Überstand



Figur 4



Figur 5



Figur 6

				H							
E		B	X S	d	X	K	S	P	S	SA	
C	X	a	m m	I	h	p	a	s	p	ac	
O	b	H	a a	I	o	n	c	t	e	lc	
R	a	I	I I	I	I	I	I	I	I	II	
I	I	I	I I	I	I	I	I	I	I	II	

gaattctagaggatcccgggaagcttctcgcgaggtaccgagctcgctgcagtgactagtcacgtcgacg

1 ----- 72

gatctcctagggcccttcgaagagctccatggctcgagcgcagctcactgatcagtcgagctgctcga

Figur 7a

			E		
C	X	c		S	A
l	h	o		a	c
a	o	R		c	c
I	I	I		I	I

cgatctcgagaattcgagctctgt

1 ----- 26

tagagctcttaagctcgagacatc

Figur 7b

			E		
P X	c		S S		
s h	o		a p		
t o	R		c e		
I I	I		I I		

gctcgagaattcgagctca

1 ----- 27

acgtcgagctcttaagctcgagtgatc

Figur 7c

B	B	X	E	S	homologer Bereich in p55:	
a	g	h	c	a		
m	l	o	r	c	1526	1551
H	I	I	I	I	-----	
I	I	I	I	I	-----	

5' cgactcggatccaagatctctcgcgagaattcgcagctcgaagagagcttcaggtctggggtaga 3'

H  
l  
n  
c  
I  
I

5' TTCCAATTATGTTGACAGGTG 3'

homolog zu bp 1850 - 1870 in p55

Figur 7d

H			S	homologer Bereich in gp120:	
l			a		
n		C	c	6954	6931
d		l	I	-----	
I		a	I	-----	
I		I	I	-----	

5' gagaagctta.tcgatccgag ctcaccatct cttgttaata gcagccc 3'

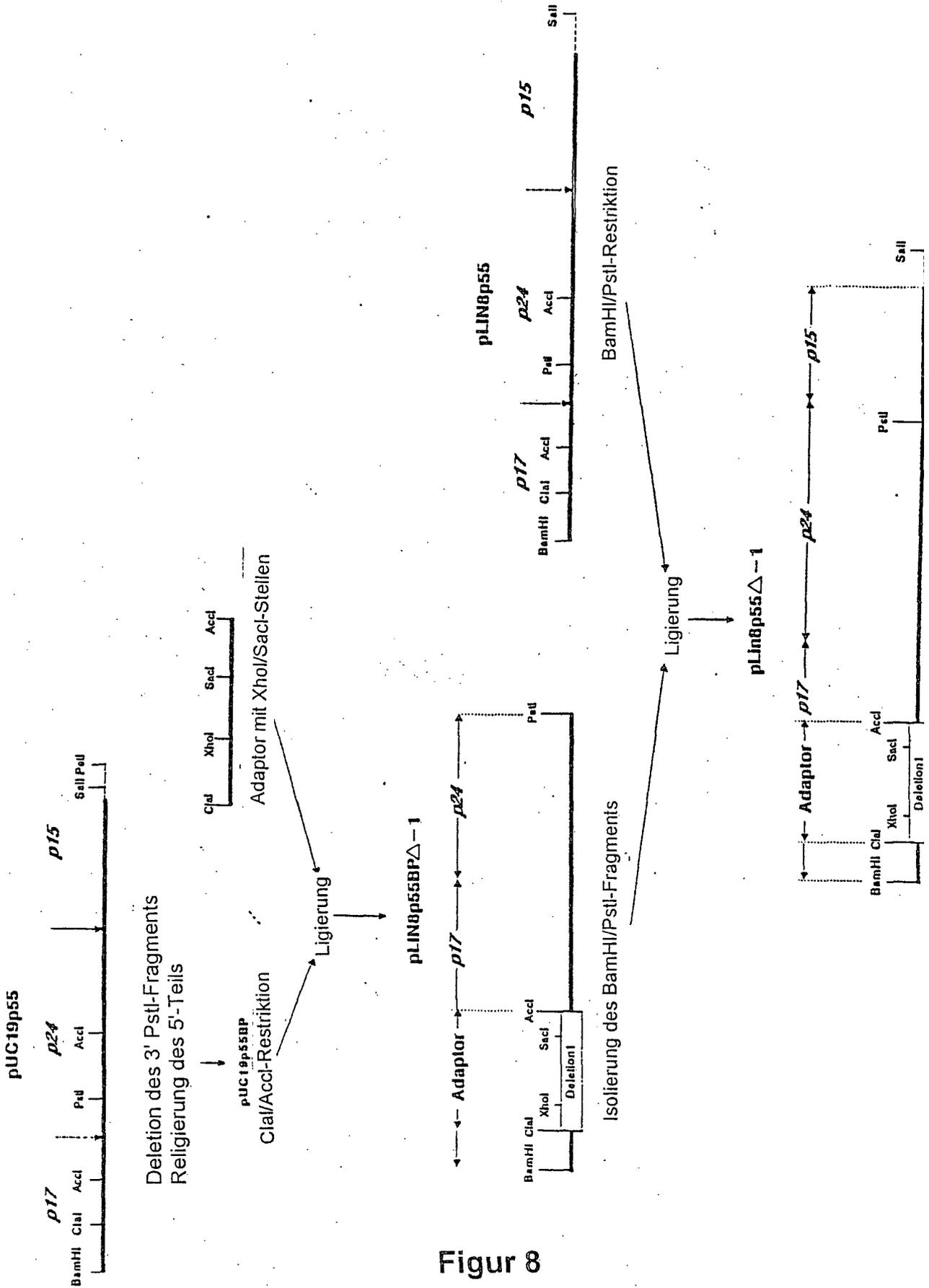
B	X	homologer Bereich gp120:	
a	h		
m	o	6789	6813
H	I	-----	
I	I	-----	

5' agggatccctcgcaggggtcaaataacactgaaggaagt 3'

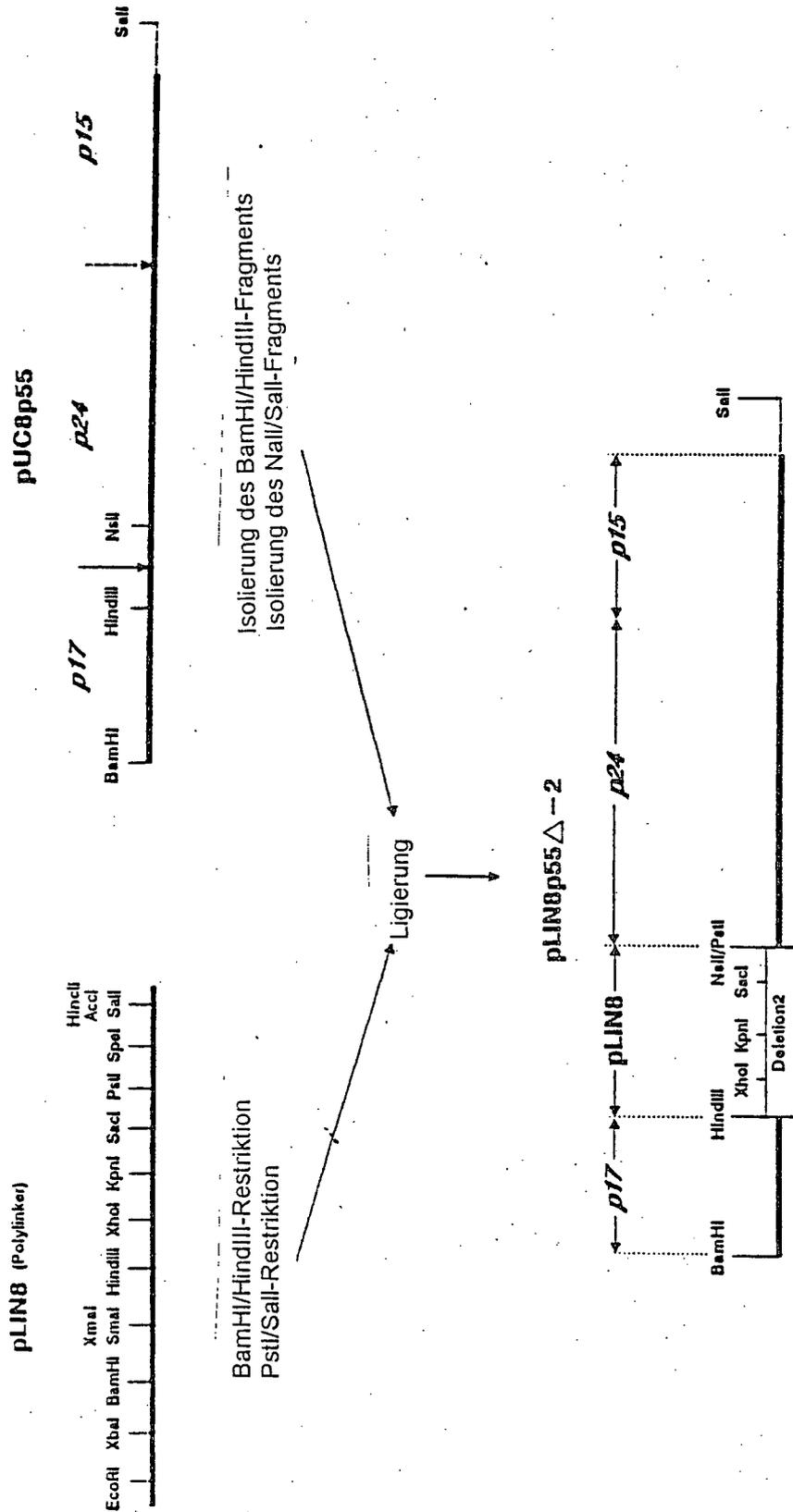
Figur 7e

```
X  
h  
o  
I  
1 tcgagagggcagtctgtacaagacccaacaacaatacaagaaaacgta  
-----+-----+-----+-----+-----  
ctccgtcagacatgttctggggttggttattggttcttttgcac  
  
H  
l  
n  
f  
I  
tcagaatcggaccagggagagcatttggtacaataggaaaaataggaaatatgagacaag  
-----+-----+-----+-----+-----  
agtcttagcctgggccctctcgtaaacaatggttatcctttttatcctttatactctgttc  
  
S  
a  
c  
I  
cacattgtactgagctc  
---+-----+----- 124  
gtgtaacatgac
```

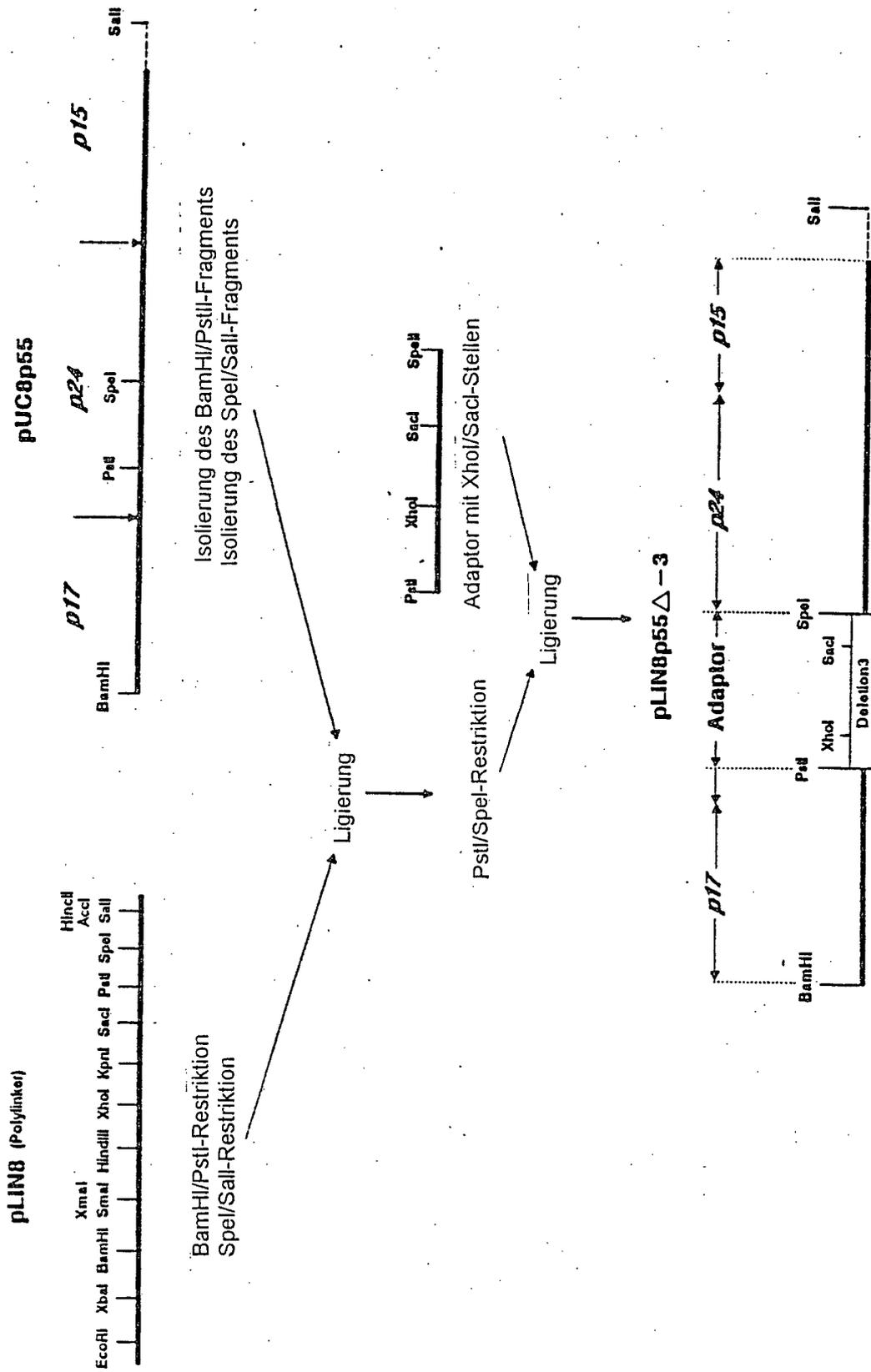
Figur 7f



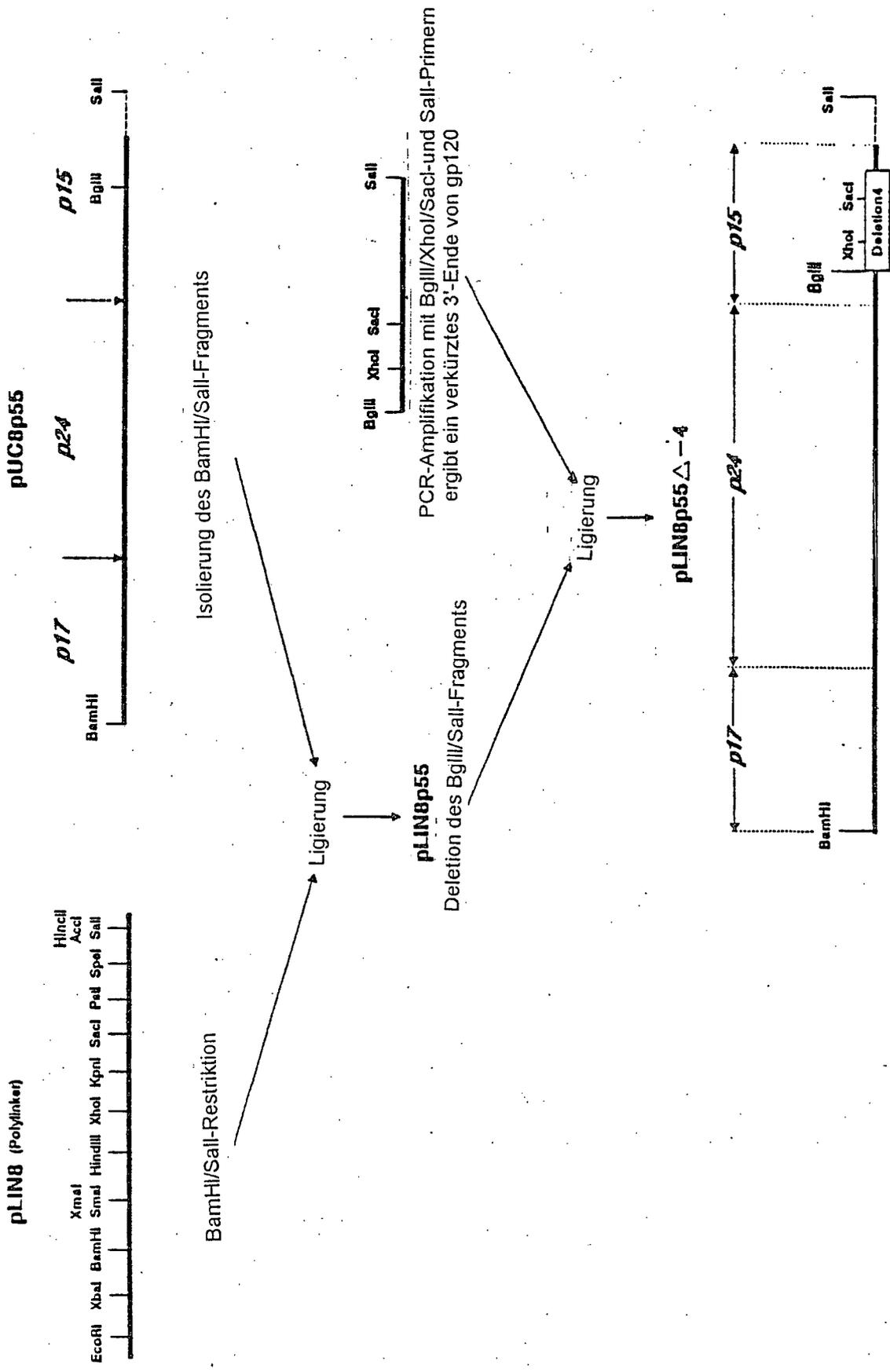
Figur 8



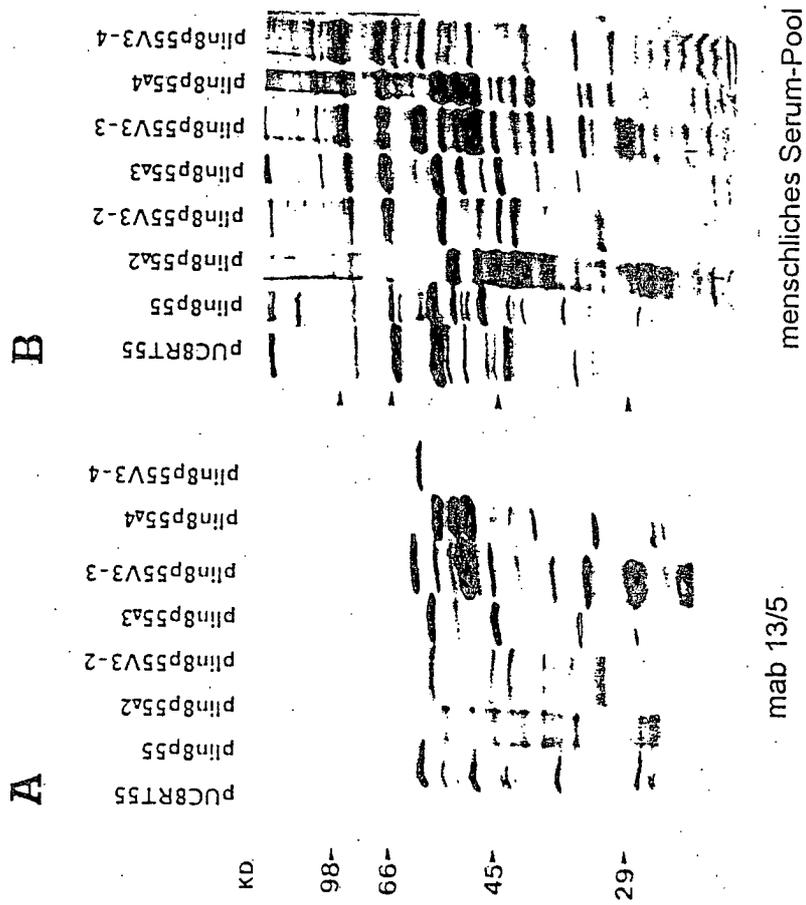
Figur 9



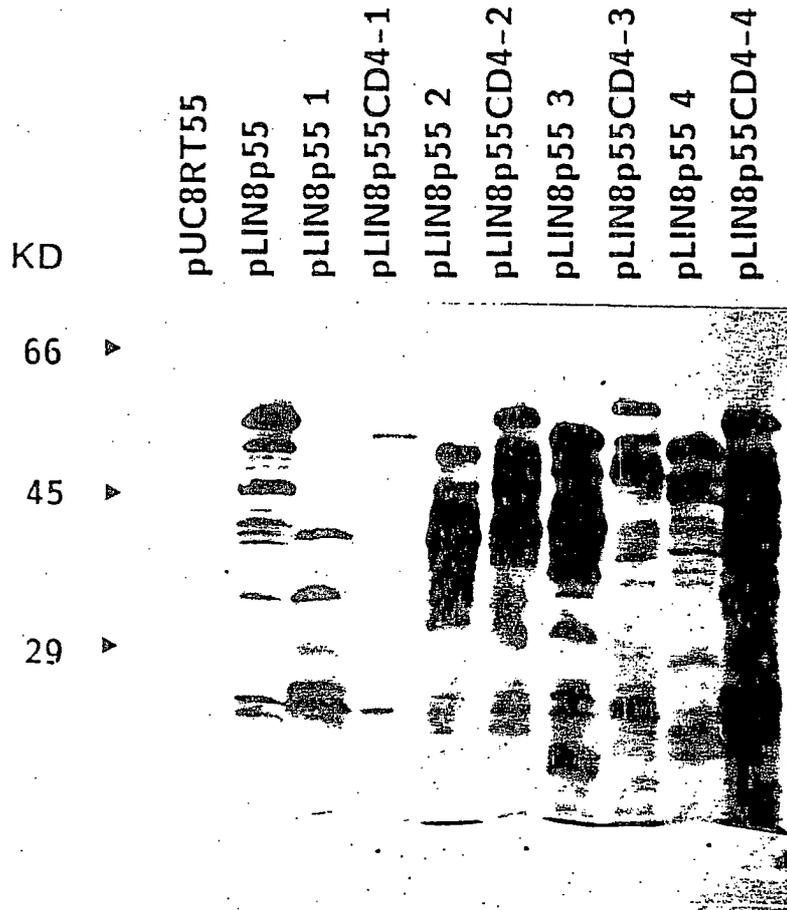
Figur 10.



Figur 11

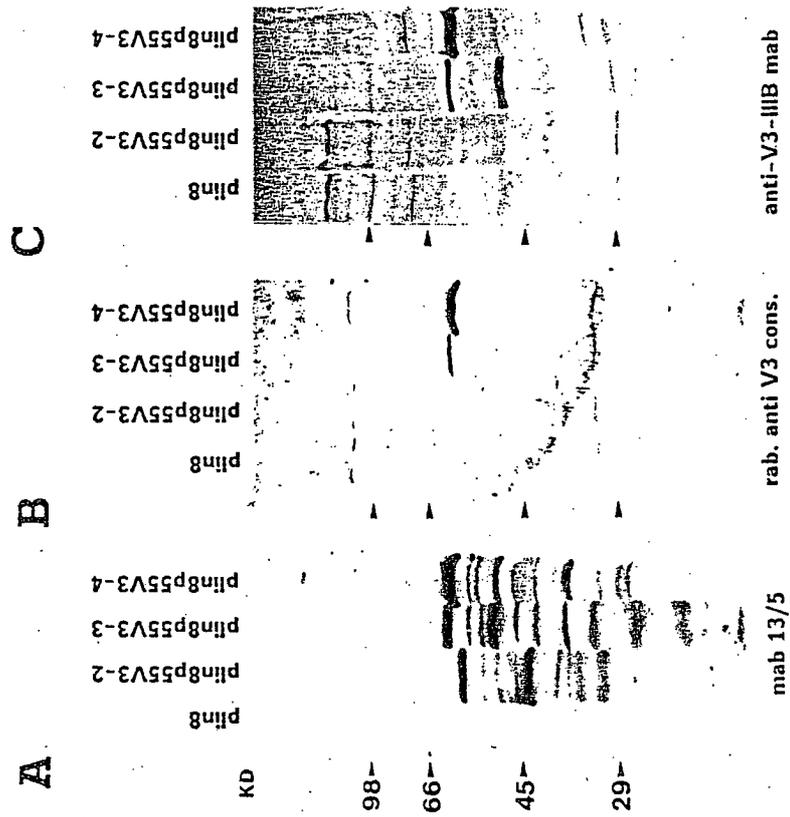


Figur 12a

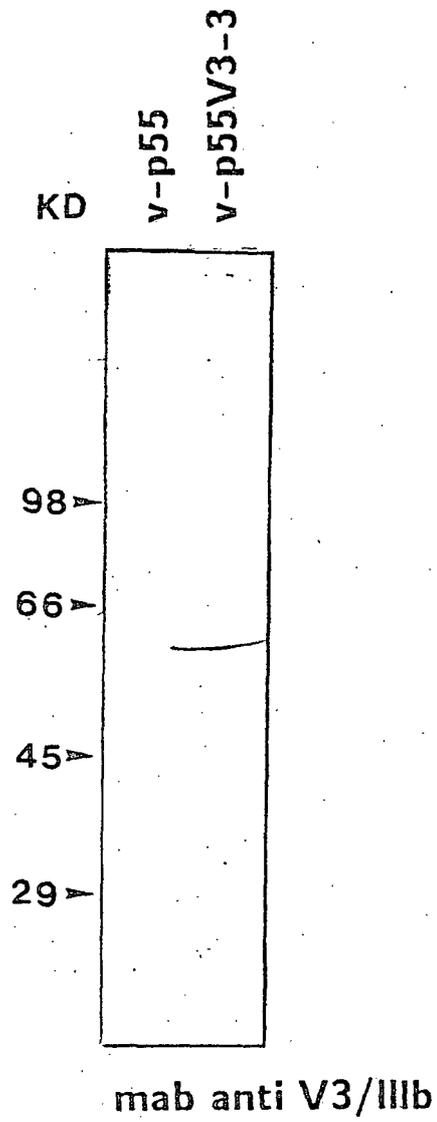


mab 16/4

Figur 12b



Figur 13



Figur 14