

**Stimulierung der Immunreaktivität  
gegen endogene Retroviren und Schutz  
gegen Leukämie bei älteren AKR-Mäusen  
nach Impfung mit Antikörpern  
gegen Virusoberflächen-Komponenten.  
Rolle des Antikörpers gegen p15(E)**

Stimulation of Immunoreactivity  
against Endogenous Retroviruses and Protection  
against Leukemia of Older AKR Mice  
by Treatment with Antibodies  
against Retroviral Surface Components.  
Role of p15(E) Antibody

Heinz Schwarz  
Max-Planck-Institut für Biologie, D-7400 Tübingen

H.-J. Thiel  
Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere  
D-7400 Tübingen

Kent J. Weinhold und Dani P. Bolognesi  
Department of Surgery, Duke University Medical Center,  
Durham, North Carolina 27710

Werner Schäfer  
Max-Planck-Institut für Virusforschung, Spemannstr. 35,  
D-7400 Tübingen

Z. Naturforsch. 39c, 1199–1202 (1984);  
received September 24, 1984

Immunotherapy, AKR-Leukemia, Immunodeficiency,  
Retroviruses

Antibody against viral gp 71 is effective therapeutically for high leukemic AKR mice if injected immediately after birth [1]. No corresponding effect could be observed after inoculation later in life when the endogenous virus burden is already high. However, if antibody treatment was supplemented by the injection of p15(E) antibody, a therapeutic effect was observed even in older mice first treated at an age of 2½ months. Those mice produced antibodies against viral surface proteins and appeared to be able to survive longer than control mice. Thus p15(E) antibody might be able to overcome retroviral associated immunodeficiency. This therapy may have implications for the treatment of the apparently retroviral induced acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) of man.

Das Glykoprotein gp71 und das Protein p15(E) sind Oberflächenkomponenten von Retroviren des C-Typs (C-Viren). Nachdem sie schon vor längerer Zeit beim Friend-Leukämievirus (FLV) der Maus isoliert worden waren [2–4], wurden potente mono-

Sonderdruckanforderungen an Prof. W. Schäfer.

0341-0382/84/1100-1199 \$ 01.30/0

spezifische Antiseren gegen sie in Ziegen bzw. Kaninchen hergestellt, die auch mit den entsprechenden Komponenten anderer C-Viren der Maus und von C-Viren weiterer Säuger (z.B. der Katze) reagierten (Interspezies-Reaktivität) [4, 5]. P15(E) Antiserum zeigte eine Kreuzreaktion sogar mit D-Typ Retroviren von Primaten [6].

Unter Verwendung von gp71-Antiserum bzw. dessen IgG war es in der Folge möglich, durch C-Viren bedingte Erkrankungen von Mäusen und Katzen (vor allem Leukämien) zu verhindern [7–11]. Die Tiere bildeten nach solchen Behandlungen kein freies Virus mehr, dafür aber freie gegen gp71 sowie p15(E) gerichtete Antikörper (autogene Antikörper) in größerer Menge, wozu sie andernfalls nicht in der Lage waren, wahrscheinlich weil die betreffenden C-Viren eine immunsuppressive Wirkung entfalten. Besonders ausgeprägt ist ein solcher Effekt bei der durch ein exogenes C-Virus hervorgerufenen Leukämie der Katze, bei welcher Immundefekt-Erscheinungen das Krankheitsbild beherrschen [12]. Bei Mäusen niedrig-leukämischer Stämme werden, ohne daß diese vorher behandelt wurden, größere Mengen autogener, gegen gp71 und p15(E) ihrer endogenen C-Viren gerichtete Antikörper gefunden (Abb. 1). Es sind Hinweise dafür vorhanden, daß eine inverse Korrelation zwischen Antikörpertiter und Leukämiehäufigkeit besteht [13, 14].

Voraussetzung für den Erfolg der Behandlung mit gp71-Antikörper war, daß dieser injiziert wurde, ehe eine stärkere Vermehrung der verschiedenen C-Viren einsetzte. Eingehender untersucht wurden die Verhältnisse von unserer Arbeitsgruppe vor allem bei AKR-Mäusen, bei denen endogene C-Viren für die vom 6. Lebensmonat an einsetzende und schließlich bei nahezu 100% der Tiere auftretende Leukämie verantwortlich sind. Bei ihnen beginnt eine starke Vermehrung C-Virus produzierender Zellen schon bald nach der Geburt [15]. Hier war deshalb die Serumtherapie mit gp71-Antikörper nur dann erfolgreich, wenn sie unmittelbar post partum begann [1].

Was die biologische Wirksamkeit des Antikörpers gegen gp71 anlangt, wurde festgestellt, daß er die Infektiosität der Viruspartikeln neutralisiert und virusproduzierende Zellen mit Hilfe von Komplement lysiert [5, 16]. Vom p15(E)-Antikörper war zunächst lediglich bekannt, daß er in Gegenwart von Komplement gewisse C-Viren zu neutralisieren ver-



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht:  
Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

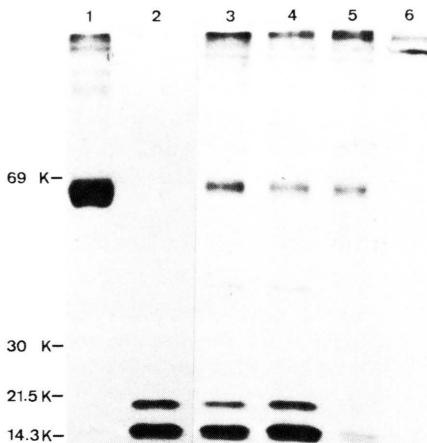


Abb. 1. Autogene Antikörper gegen gp71 und p15(E) endogener C-Viren in Mäusen (Alter der Tiere etwa 6 Monate). Säule 1: gp71-Ziegenserum. Säule 2: p15(E)-Kaninchenserum; das hierzu beobachtende p12(E) ist ein Abbauprodukt von p15(E) [24]. Säule 3: Niedrig leukämische STU-Mäuse (Leukämierate ~ 4%) [25]. Säule 4: Weiterer niedrig leukämischer Mäusesstamm (Leukämierate ~ 5%) [1]. Säule 5: AKR-Mäuse, die als Neugeborene mit gp71-Antikörper behandelt wurden (Leukämierate ~ 50%). Säule 6: Unbehandelte AKR-Mäuse. Die Mäuseseren sind Sammeleren von 10–20 Tieren. Radioimmunpräzipitation und nachfolgende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Fluorografie) [6]. Dazu wurde MCF-Virus [26] mit [<sup>35</sup>S]Cystein und [<sup>35</sup>S]Methionin markiert. <sup>14</sup>C-markierte Referenzproteine: Albumin aus Rinderserum (69K), Carboanhydrase (30K), Trypsininhibitor aus Sojabohne (21.5K) und Lysozym (14.3K).

mag [17]. Die Tatsache, daß er bei Mäusen zahlreicher niedrig leukämischer Stämme neben gp71-Antikörper regelmäßig gefunden wird (vgl. Abb. 1), ließ allerdings vermuten, daß er noch weitere Funktionen hat. Welcher Art diese sein könnten, deutete sich an, als kürzlich festgestellt wurde, daß die mit ihm reagierende Viruskomponente immunsuppressive Wirkung zeigt [18–20]. Wenn dies zutrifft, sollte es unter Umständen möglich sein, die mangelnde Immunreaktivität älterer, stark virushaltiger AKR-Mäuse dadurch zu beheben, daß gleichzeitig mit gp71- auch p15(E)-Antikörper injiziert und damit der immunsuppressive Effekt von p15(E) aufgehoben wird. Über entsprechende erste Versuche in dieser Richtung soll hier kurz berichtet werden.

Für die Experimente wurde isoliertes IgG unseres Ziegen-gp71- und Kaninchen-p15(E)-Serums verwendet (vgl. Abb. 1). Die Präparationen besaßen im Radioimmunpräzipitations-Test (RIP-Test) mit markiertem AKR-Virus Titer von 1/100 000 bis 1/1000 000 (anti-gp71) bzw.

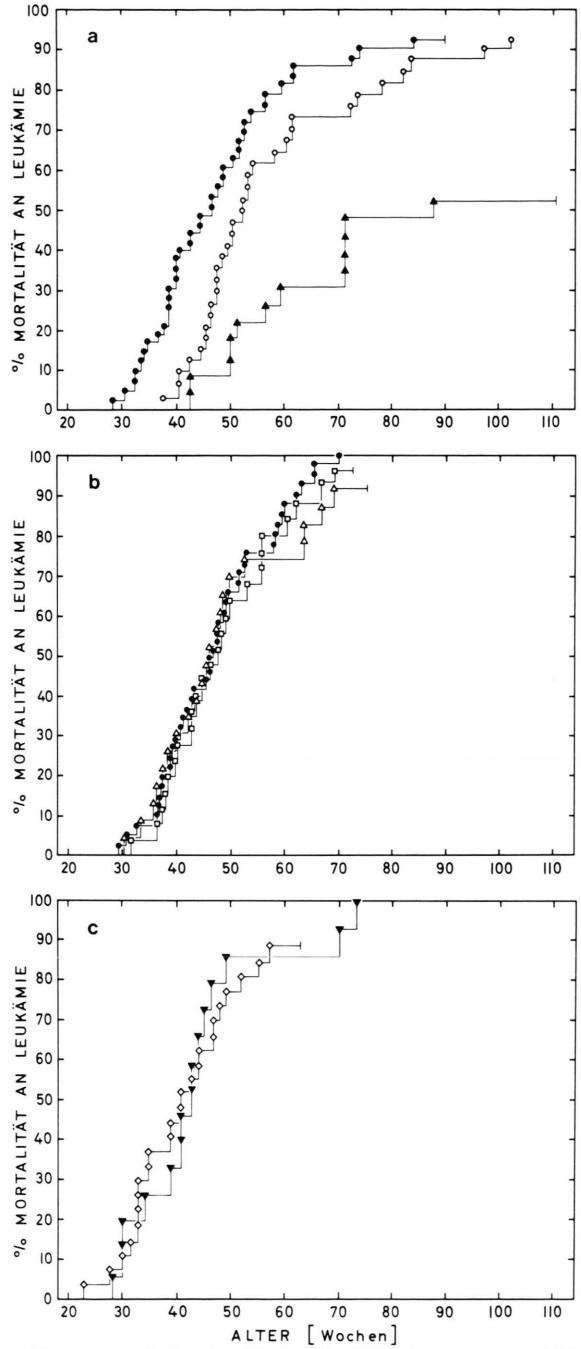


Abb. 2. Kumulative Leukämie-Mortalitätskurven von AKR-Mäusen: a) Unbehandelte Mäuse (●, 43 Tiere); Mäuse, die unmittelbar nach Geburt bis Tag 7 (▲, 23 Tiere), und solche, die von Tag 7 bis Tag 42 (○, 24 Tiere) mit gp71-Antikörper behandelt wurden. b) Unbehandelte Mäuse (●, 41 Tiere); Mäuse, die vom 39. bis 69. Lebenstag gp71-Antikörper (△, 21 Tiere) bzw. Normal-IgG (□, 23 Tiere) erhielten. c) Mäuse, die unmittelbar nach Geburt bis Tag 7 mit p15(E)-Antikörper (-, 15 Tiere) bzw. Normal-IgG (◇, 27 Tiere) geimpft wurden.

Tab. I. Gleichzeitige Behandlung älterer AKR-Mäuse ( $2\frac{1}{2}$ –4 Monate) mit gp71- und p15(E)-Antikörper.

Gruppe	Anzahl der Mäuse	Behandlung	RIP-Test Zahl der pos. Mäuse (gefunden. Titer)	Gestorben an Leukämie bis zum Alter von 42 Wochen
Kontrollen	12	Keine	0	8
Behandelte Mäuse	7	Anti-gp71 + anti-p15(E)-IgG von $2\frac{1}{2}$ –4 Mon.	7 (1/20–1/150)	0

1/20000 bis 1/50000 (anti-p15(E)). Als Versuchstiere dienten AKR-Mäuse, die wir von Frederick Cancer Research Facilities, Frederick, Maryland – USA bezogen und in Tübingen weiterzüchteten. Beide Antikörper wurden intraperitoneal injiziert (gleiche Volumina).

Wird ausschließlich gp71-Antikörper angewendet, so wird – wie bereits erwähnt – zwar bei unmittelbar nach der Geburt einsetzender Behandlung ein klarer therapeutischer Effekt erzielt, nicht aber, wenn sie 7 Tage später erfolgt und das, obwohl im ersten Falle der Antikörper nur über 7 Tage (0,5 ml total pro Maus), im zweiten aber über 35 Tage (2,1 ml pro Maus) injiziert wurde (Abb. 2 a). Autogene Antikörper wurden bei den früh behandelten Tieren in 100%, bei den vom 7. Tage ab behandelten nur in 10% der Fälle registriert (RIP-Test). Wurde gp71-Antikörper erst vom 39. bis 69. Lebenstage injiziert (3,2 ml pro Maus), war keinerlei schützende Wirkung im Vergleich zu unbehandelten oder mit Normal-Ziegen-IgG behandelten Kontrollen festzustellen (Abb. 2 b).

Wird anstelle des gp71- der p15(E)-Antikörper als alleiniger Impfstoff verwendet, so ist selbst bei unmittelbar nach der Geburt einsetzenden Injektionen (bis zum 7. Tag, insgesamt 0,6 ml IgG pro Maus) im Gegensatz zur entsprechenden Behandlung mit anti-gp71 IgG keinerlei therapeutischer Effekt zu beobachten. Wie die Kontrollmäuse, die in diesem Fall mit normalem Kaninchen-IgG in analoger Weise wie die Versuchstiere geimpft wurden, bilden sie keinen im RIP-Test nachweisbaren antiviralen Antikörper; außerdem waren die Leukämieraten beider Gruppen gleich (Abb. 2 c).

Ein Effekt des p15(E)-Antikörpers ließ sich aber feststellen, wenn dieser zusammen mit dem gegen gp71 gerichteten verabfolgt wurde. Ausgewählt wurden dafür Mäuse von einem Alter, in dem anti-gp71 allein keine Wirkung zeigte. Die kombinierte Behandlung setzte bei  $2\frac{1}{2}$  Monaten ein und dehnte

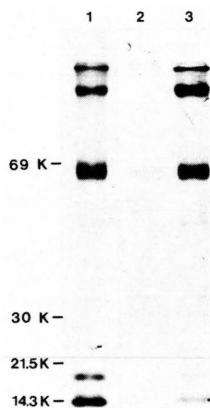


Abb. 3. Autogene Antikörper einer AKR-Maus, die gleichzeitig mit gp71 und p15(E) Antikörper behandelt wurde (Blutentnahme im Alter von 7 Monaten). Säule 1: Niedrig leukämischer Mäusesstamm (STU) (positive Kontrolle). Säule 2: Unbehandelte AKR-Mäuse (negative Kontrolle). Säule 3: AKR-Maus, die im Alter von  $2\frac{1}{2}$  bis 4 Monaten mit gp71- und p15(E)-Antikörper geimpft wurde. Technische Einzelheiten siehe Abb. 1.

sich bis zum Alter von 4 Monaten aus. Verimpft wurden dabei von jeder IgG-Präparation 1,05 ml pro Maus. Wegen Mangels von p15(E)-Serum wurden zunächst nur 7 Tiere eingesetzt. Als Kontrollen dienten 12 unbehandelte gleichaltrige Geschwister der 7 Versuchstiere. Das Ergebnis dieses Versuches faßt Tabelle I zusammen.

Bei den unbehandelten Kontrollen war im Alter von 7 Monaten kein RIP-Antikörper zu finden. Ihre behandelten Geschwister besaßen demgegenüber zu dieser Zeit sämtlich nachweisbare Mengen autogener antiviraler Antikörper, die z. T. Titer von 1/150 erreichten; sie waren gegen gp71 und p15(E) gerichtet (Abb. 3). An Leukämie gestorben waren bis zum Alter von 42 Wochen bei der behandelten

Gruppe keine, bei der Kontrollgruppe jedoch – wie nach den Mortalitätskurven zu erwarten (vgl. Abb. 2) – 66% der Mäuse.

Nach diesen ersten vorläufigen Ergebnissen scheint es also möglich zu sein, durch zusätzliche Behandlung mit p15(E) Antikörper auch ältere AKR-Mäuse zur Bildung nachweisbarer Mengen von Antikörpern gegen ihre endogenen Viren zu stimulieren und gleichzeitig ihre Überlebenschancen zu verbessern. Versuche, ob eine analoge kombinierte

Behandlung mit gp71- und p15(E)-Antikörpern auch bei bereits an Leukämie erkrankten AKR-Mäusen Erfolg hat, laufen zur Zeit.

Die an unserem Versuchstiermodell gewonnenen Erkenntnisse könnten erhebliche Bedeutung für den Menschen haben. Hier wurden inzwischen Retroviren nicht nur bei gewissen Leukämien, sondern auch bei einer Immundefekt-Erkrankung (AIDS) nachgewiesen [21–23], für die bisher keinerlei therapeutische Maßnahmen zur Verfügung stehen.

- [1] H. Schwarz, J. N. Ihle, E. Wecker, P. J. Fischinger, H.-J. Thiel, D. P. Bolognesi, and W. Schäfer, *Virology* **111**, 568 (1981).
- [2] V. Moennig, G. Hunsmann u. W. Schäfer, *Z. Naturforsch.* **28c**, 785 (1973).
- [3] V. Moennig, H. Frank, G. Hunsmann, I. Schneider u. W. Schäfer, *Virology* **61**, 100 (1974).
- [4] W. Schäfer, G. Hunsmann, V. Moennig, F. de Noronha, D. P. Bolognesi, R. W. Green u. G. Hüper, *Virology* **63**, 48 (1975).
- [5] G. Hunsmann, V. Moennig, L. Pister, E. Seifert u. W. Schäfer, *Virology* **62**, 307 (1974).
- [6] H.-J. Thiel, E. M. Broughton, T. J. Matthews, W. Schäfer u. D. P. Bolognesi, *Virology* **111**, 270 (1981).
- [7] G. Hunsmann, V. Moennig, E. Seifert u. W. Schäfer, *Z. Naturforsch.* **30c**, 309 (1975).
- [8] G. Hunsmann, V. Moennig u. W. Schäfer, *Virology* **66**, 327 (1975).
- [9] H. Schwarz, H.-J. Thiel u. W. Schäfer, *Z. Naturforsch.* **32c**, 459 (1977).
- [10] W. Schäfer, D. P. Bolognesi, F. de Noronha, P. J. Fischinger, G. Hunsmann, J. N. Ihle, V. Moennig, H. Schwarz u. H.-J. Thiel, *Med. Microbiol. Immunol.* **164**, 217 (1977).
- [11] F. de Noronha, W. Schäfer, M. Essex u. D. P. Bolognesi, *Virology* **85**, 617 (1978).
- [12] M. Essex, *Cancer Res.* **21**, 175 (1975).
- [13] J. N. Ihle, M. G. Hanna, W. Schäfer, G. Hunsmann, D. P. Bolognesi u. G. Hüper, *Virology* **63**, 60 (1975).
- [14] J. N. Ihle, J. C. Lee u. M. G. Hanna, in: *The Biology of Radiation Carcinogenesis* (J. M. Yuhas, R. W. Tennant & J. D. Regan, eds.), p. 261, Raven Press, New York 1976.
- [15] P. J. Fischinger, N. M. Dunlop, H. Schwarz, J. N. Ihle, K. J. Weinhold, D. P. Bolognesi u. W. Schäfer, *Virology* **119**, 68 (1982).
- [16] G. Hunsmann, M. Claviez, V. Moennig, H. Schwarz u. W. Schäfer, *Virology* **69**, 157 (1976).
- [17] P. J. Fischinger, W. Schäfer u. D. P. Bolognesi, *Virology* **71**, 169 (1976).
- [18] L. E. Matthes, R. G. Olsen, L. C. Hebebrand, E. A. Hoover, J. P. Schaller, P. W. Adams u. W. S. Nichols, *Cancer Res.* **39**, 950 (1979).
- [19] G. J. Cianciolo, T. J. Matthews, D. P. Bolognesi u. R. Snyderman, *J. Immunol.* **124**, 2900 (1980).
- [20] G. J. Cianciolo, M. E. Lostrum, M. Tam u. R. Snyderman, *J. Exp. Med.* **158**, 885 (1983).
- [21] Übersicht in: R. C. Gallo u. M. S. Reitz, *J. Natl. Cancer Inst.* **69**, 1209 (1982).
- [22] M. Popovic, M. G. Sarngadharan, E. Read u. R. C. Gallo, *Science* **224**, 497 (1984).
- [23] F. Barré-Sinoussi, *Science* **220**, 868 (1983).
- [24] D. P. Bolognesi, R. C. Montelaro, H. Frank u. W. Schäfer, *Science* **199**, 183 (1978).
- [25] W. Schäfer, *Z. Naturforsch.* **34c**, 306 (1979).
- [26] J. W. Hartley u. W. P. Rowe, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 789 (1977).