

852/89

17925/89

KÖZZÉTÉTEL
PÉLDÁNY

50500

NS205:
C12N15/12
C12P21/02

ELJÁRÁS HIV-MEGKÖTŐ PROTEINEK KIFEJEZÉSÉRE

Smithkline Beckman Corporation, Philadelphia, Pennsylvania,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1989.02.22.

Elsőbbsége: 1988.02.24.(160 463) AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

KIVONAT

A jelen találmány segítségével ki lehet fejezni a CD-4 receptor fehérjéből származó HIV kötő fehérjéket E. coliban, Streptomycesben és élesztőben, és az így keletkezett fehérjét E. coli és Streptomyces esetében ki lehet választani a fermentációs tápközegbe. Az E. coli esetében a kiválasztás OMPA vezető szekvenciával képzett fúziós fehérje formában történik. A jelen találmány ismerteti a rekombináns kifejezéshez szükséges vektorok előállítását és alkalmazását is, amely vektorok HIV kötő fehérjét kódoló DNS-t tartalmaznak valamely szabályozó elemmel működőképesen összekapcsolva.



852/89

A

17925/89

50500--

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

17925

Képviselő

DANUBIA SZABADALMI IRODA

NSZC₅

C12P15/12

C12P21/02

ELJÁRÁS HIV-MEGKÖTŐ PROTEINEK KIFEJEZÉSÉRE

Smithkline Bechman Corporation, Philadelphia,

Pennsylvania, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók: ARTHOS James, Ann Arbor, Michigan

BRAWNER Mary Ellen, Wayne, Pennsylvania

CLARK Philip Ernest, Wayne, Pennsylvania

DEEN Keith Charles, Paoli, Pennsylvania

FORNWALD James Allan, Norristown Pennsylvania

GORMAN Jessica Angell, Newtown Square, Pennsylvania

SATHE Ganesh Madhusudan, King of Prussia, Pennsylvania

SWEET Raymond Whitney, Bala Cynwyd, Pennsylvania

TAYLOR Dean Perron, King of Prussia, Pennsylvania

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1989.02.22.

Elsőbbsége: 1988.02.24. (160 463) AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

66047-3072-GI

A jelen találmány tárgya eljárás oldható CD-4(sCD-4) fehérjéből származó HIV kötő fehérjék előállítására. A találmány elsősorban vektorok olyan konstrukciójára vonatkozik, amelyek HIV kötő fehérjék kifejezésére alkalmasak *E. coli*-ban, *Streptomyces*-ben és élesztőben.

Az alábbiakban röviden vázoljuk a találmány szakirodalmi hátterét.

A humán T-sejt glikoprotein, a CD-4 (korábban gyakran nevezték T4-nek), egyike a számos nem polimorf T limfocita felületi receptor fehérjének, amelyek érintve vannak a hatékony T sejt-célsejt kölcsönhatás közvetítésében.

A humán CD-4(T-4) receptor cDNS szekvenciája ismert [Maddon és munkatársai: *Cell* 42, 93(1985)]. A teljes CD-4 elő-fehérje szekvencia 458 aminosav hosszúságú, amely tartalmazza a vélt 23 aminosavas kiválasztási vezető, 372 aminosavas felületi (V_1 - V_4), 23 aminosavas transzmembrán és 40 aminosavas citoplazmás tartományokat. A felületi tartomány négy, korlátozott (20-30 %) homológiájú területet mutat a változó (V) és csatlakozó (J) immunoglobulin területekhez. Az öt intron-exon határterület a felületi tartományban ezen V-J területek csatlakozásához közel található.

A humán immunhiány vírus (HIV), a szerzett immunhiány szindróma (AIDS) előidézője, határozott affinitást mutat a CD-4 limfocitákhoz. A vírus kötést a CD-4-hez a vírus burkolat gp120 glikoproteinje közvetíti. A CD-4 fehérjét lizált, HIV-vel fertőzött sejtekkel együtt lehet kicsapni anti-env antitesttel és fordítva, gp120-at anti-CD-4 monoklonális antitesttel együtt lehet kicsapni, így mutatva be, hogy a vírus-kötést CD-4-hez a vírus burok gp120 fehérjéje közvetíti.

Nemrégiben több tudományos kutató is beszámolt olyan felfedezéseiről, amelyek a CD-4 és az AIDS fertőzés kölcsönhatására vonatkoznak, emlős sejtrendszerekben kifejezett CD4 származékot alkalmazva.

Deen és munkatársai [Nature 331, 82(1988)] beszámoltak az sCD-4 izolálásáról és kifejezéséről számos celluláris környezetben. Az sCD-4 a CD-4 oldható származéka, amelyből hiányzik a CD-4 transzmembrán és citoplazmás tartománya. dfhr-hiányos kínai hörcsög petefészkek (CHO) sejtvonalat alkalmazva bemutatták, hogy a kifejezett sCD-4 megőrzi a CD-4 szerkezeti és biológiai tulajdonságait a sejtfelületen, kötődik a HIV gp110 burkolati fehérjéjéhez és gátolni képes a CD-4⁺ limfociták kötését.

Trauneker és munkatársai [Nature 331, 84(1988)] beszámolnak sCD-4 felhasználásáról a vírus célsejthez való kötődésének gátlására. A megadott adatok a HIV fertőzés in vitro gátlását mutatják az sCD-4 rekombináns formáját alkalmazva.

Fisher és munkatársai [Nature 331, 76(1988)] az sCD-4 tisztításáról számolnak be CHO-ból, valamint ennek alkalmazásáról hatásos inhibitorként.

Hussey és munkatársai [Nature 331, 78(1988)] beszámolnak a Baculovírus kifejező rendszer alkalmazásáról sCD-4 előállítására, amelyről úgy találták, hogy gátolja a vírus-indukált sejtfúziót (syncytium képződés) és a HIV fertőzést a gp120 kifejező sejtekhez való kötődéssel. Azt is kimutatták, hogy az sCD-4 fehérje, úgy tűnik, nem gátolja a II. osztály-fajlagos T-sejt kölcsönhatásokat.

Smith és munkatársai [Science 238, 1704(1987)] szintén beszámolnak a CHO emlős sejt rendszer alkalmazásáról sCD-4 termelésére.

Olyan sCD-4 fehérje termeléséről számolnak be CHO sejtekben, amelyről kimutatható, hogy HIV gp120 burkolati fehérjéhez kötődik és semlegesíti a HIV-1 fertőzőképességét in vitro. Az adatok azt jelzik, hogy az sCD-4-et lehet alkalmazni alapként AIDS fertőzés terápiás kezeléséhez.

Továbbra is igény van azonban bakteriális és alacsonyabbrendű eukarióta rendszerekre sCD-4 fehérjék kifejezéséhez.

Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a találmányt.

A jelen találmány azon a felfedezésen alapul, hogy a CD-4 fehérje HIV kötő funkcióját ki lehet fejezni *E. coliban*, és azon a felfedezésen, hogy az ilyen HIV kötő fehérjét ki lehet választani a fermentációs tápközegbe. Pontosítva tehát a jelen találmány olyan *E. coli* kifejező vektorra vonatkozik, amely HIV kötő fehérjét tartalmaz működőképesen összekapcsolva valamely szabályozó elemmel.

A jelen találmány azon a felfedezésen is alapul, hogy a CD-4 fehérje HIV kötő funkcióját ki lehet fejezni *Streptomycesben*, és azon a felfedezésen, hogy az ilyen HIV kötő fehérjét ki lehet választani a fermentációs tápközegbe. Pontosítva tehát a jelen találmány olyan *Streptomyces* kifejező vektorra vonatkozik, amely HIV kötő fehérjét tartalmaz működőképesen összekapcsolva valamely szabályozó elemmel.

A jelen találmány azon a felfedezésen is alapul, hogy a CD-4 fehérje HIV kötő funkcióját ki lehet fejezni élesztőben. Pontosítva tehát a jelen találmány olyan élesztő kifejező vektorra vonatkozik, amely HIV kötő fehérjét tartalmaz működőképesen összekapcsolva valamely szabályozó elemmel.

A jelen találmány azon a felfedezésen is alapul, hogy az OMPA vezető szekvenciát lehet alkalmazni a heterológ fehérjék

kivitelére E. coliból. Részletesebben tehát a jelen találmány olyan E. coli kifejező vektorra is vonatkozik, amely E. coliban képzett, kivihető fehérjéket fejez ki; ez a vektor egy kódoló DNS szekvenciát tartalmaz valamely szabályozó elemmel operatíván összekapcsolva, ahol a kódoló DNS szekvencia az X-Y fehérjét kódolja, ahol X egy OMPA vezető szekvencia és Y egy heterológ fehérje.

Az alábbiakban a találmány részletes leírását adjuk meg.

A jelen találmány szerint CD-4 receptorból származó HIV kötő fehérjét fejezünk ki alkalmas mennyiségben gyógyászati és/ vagy megelőző szerként való felhasználásra, hogy meggátoljuk a kezdeti HIV fertőzést és meggátoljuk a HIV sejtől sejtbe való átjutását a gazdaszervezet fertőzését követően; a HIV-limfocita kötés gátlóanyagainak átvizsgálásában való felhasználásra; CD-4⁺ limfocita funkciók gátlóanyagaként való felhasználásra; vagy más célú felhasználásra, amint ezt a későbbiekben leírjuk. A fehérjék mind rendelkeznek a CD-4-ből való HIV kötő funkcióval. Az ilyen fehérjékre előnyös példák az sCD-4 fehérjék és ennek származékai. Az sCD-4 fehérjék a CD-4 származékai, amelyekből hiányzik a CD-4 transzmembrán és citoplazmás tartománya. Az sCD-4 fehérjékre példákat írnak le különböző közleményekben [Fisher és munkatársai és Hussey és munkatársai: Nature 331, 76-88 (1988); Smith és munkatársai: Science 238, 1704(1987)].

Az itt példaként felhozott sCD-4 fehérjéről, amelyet SKBsCD-4-nek is neveznek, Deen és munkatársai számolnak be a fentebb idézett munkában, a 83. oldalon. Ezt az alábbi aminosav- és nukleotid szekvenciával mutatjuk be. A szekvencia mutat egy 5'-nem transzlatált területet és egy CD-4 cDNS-ből származó vezető szek-

venciát, amelyről Maddon és munkatársai számolnak be [Cell 42, 93 (1985)]. Az érett SKBsCD-4 első aminosava, ahogyan CHO sejtek révén kifejeződik és kiválasztódik, a 151-153 bázispárok által kódolt lizin. A transzmembrán tartomány ki van iktatva a CD-4 cDNS restrikciós hasításával HpaII-vel az 1252 bázispárnál és egy kapcsoló (linker) beiktatásával ide, amely helyreállítja az 1253-1257 bázispárokat és amely transzlációs stop kodont, TAA-t vezet be a C-terminális valin után. Amint erről Maddon és munkatársai beszámolnak, az érett CD-4 első három aminosava glutamin [amely itt (-)2 aminosavként van bemutatva] -glicin [amely itt (-)1 aminosavként szerepel] -aszparagin [amely itt lizinként jelentkezik (+)1 aminosavként]. Egyébként az alább bemutatott szekvencia azonos azzal, amelyről Maddon és munkatársai beszámoltak.

10 30 50
CAAGCCCAGAGCCCTGCCATTTCTGTGGGCTCAGGTCCCTACTGCTCAGCCCCTTCCTCC

70 90 110
CTCGGCAAGGCCACAATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAA
MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGln

130 150 170
CTGGCGCTCCTCCCAGCAGCCACTCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAGGGGAT
LeuAlaLeuLeuProAlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAsp

190 210 230
ACAGTGGAAGTACCTGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAAAC
ThrValGluLeuThrCysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsn

250 270 290
TCCAACCAGATAAAGATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTCTTAATAAGGTCCATCCAAG
SerAsnGlnIleLysIleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLys

310 330 350
CTGAATGATCGCGCTGACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTCCCCCTGATC
LeuAsnAspArgAlaAspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheProLeuIle

370 390 410
ATCAAGAATCTTAAGATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGGACCAGAAG
IleLysAsnLeuLysIleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAspGlnLys

430 450 470
GAGGAGGTCCAATTGCTAGTGTCGGATTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTTCAG
GluGluValGlnLeuLeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGln

104

490 510 530
GGGCAGAGCCTGACCCTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCCTCAGTGCAATGT
GlyGlnSerLeuThrLeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCys

550 570 590
AGGAGTCCAAGGGGTAAAAACATACAGGGGGGAAGACCCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAG
ArgSerProArgGlyLysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGlu

610 630 650
CTTCAGGATAGTCCCACCTGGACATCCACTGTCTTGCAGAACCAGAAGAAGGTGGAGTTC
LeuGlnAspSerGlyThrTrpThrCysThrValLeuGlnAsnGlnLysLysValGluPhe
151

670 690 710
AAAATAGACATCGTGGTGCTAGCTTTCCAGAAGGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAGAG
LysIleAspIleValValLeuAlaPheGlnLysAlaSerSerIleValTyrLysLysGlu
183

730 750 770
GGGGAACAGGTGGAGTTCTCCTTCCCACTCGCCTTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGT
GlyGluGlnValGluPheSerPheProLeuAlaPheThrValGluLysLeuThrGlySer

790 810 830
GGCGAGCTGTGGTGGCAGGCGGAGAGGGCTTCCTCCTCCAAGTCTTGGATCACCTTTGAC
GlyGluLeuTrpTrpGlnAlaGluArgAlaSerSerSerLysSerTrpIleThrPheAsp

850 870 890
CTGAAGAACAAGGAAGTGTCTGTAAAACGGGTTACCCAGGACCCTAAGCTCCAGATGGGC
LeuLysAsnLysGluValSerValLysArgValThrGlnAspProLysLeuGlnMetGly

910 930 950
AAGAAGCTCCCGCTCCACCTCACCTGCCCCAGGCCTTGCCCTCAGTATGCTGGCTCTGGA
LysLysLeuProLeuHisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGly

970	990	1010
AACCTCACCCCTGGCCCTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTGGTG		
AsnLeuThrLeuAlaLeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuVal		
1030	1050	1070
GTGATGAGAGCCACTCAGCTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGGACCCACCTCC		
ValMetArgAlaThrGlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSer		
1090	1110	1130
CCTAAGCTGATGCTGAGCTTGAACTGGAGAACAAGGAGGCAAAGGTCTCGAAGCGGGAG		
ProLysLeuMetLeuSerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGlu		
1150	1170	1190
AAGGCGGTGTGGGTGCTGAACCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGA		
LysAlaValTrpValLeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSer		
1210	1230	1250
GGACAGGTCCTGCTGGAATCCAACATCAAGGTTCTGCCCACATGGTCCACCCCGGtgtaa		
GlyGlnValLeuLeuGluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValVége		
351		369
1270		
tggcgcctctaga		

Csonkított sCD-4-ek és ezek származékai, amelyek lényegében megőrzik az sCD-4 HIV kötő affinitását, szintén kifejezhetők a jelen találmány szerint. Ezek közül a csonkított származékok közül előnyösek azok a fehérjék vagy polipeptidek, amelyek a V1 és

V2 területek HIV kötő területét tartalmazzák, amelyek mintegy az 1-182 aminosavakon belül vannak. A fentebb bemutatott szekvenciára utalva egyik adott példa az itt V1J4-nek nevezett fehérje, amely a (-)2-104(N-glutamin-glicin-lizin-átkötő rész-alanin-aszparagin-szerin-C) aminosavakkal bír a 351-369(-glicin-glutamin-valin-átkötő rész-treonin-prolin-valin-C) aminosavakhoz fuzionálva. Egy második példa az itt V1V2J4-nek nevezett fehérje, amely a (-)2-183(N-glutamin-glicin-lizin-átkötő rész-lizin-alanin-szerin-C) aminosavakkal bír a 351-369 aminosavakkal fuzionálva. Egy harmadik példa az itt YV1-nek nevezett fehérje, amely a (-)9-151(N-alanin-leucin-átkötő rész-leucin-glutaminsav-leucin-C) aminosavakat tartalmazza. Egy negyedik példa az itt SKBYsCD-4-nek nevezett fehérje, amely a (-)9-369 aminosavakkal bír. Ezen HIV kötő fehérjéknek mindegyike, pl. OKT4A kötésre alapozva, rendelkezik az sCD-4 fehérjék, különösen az SKBsCD-4 HIV kötő tulajdonságával, és méginkább rendelkezik az sCD-4 fehérjék, főleg az SKB sCD-4 V1 és V2 területeinek HIV kötő tartományával.

Azokon a fehérjéken kívül, amelyeket itt speciális példaként megadunk, azok, akik a szakterületen jártasak, könnyen meg tudnak alkotni DNS kódoló szekvenciákat további sCD-4 származékokhoz. Az ilyen származékok lényegében megőrzik az sCD-4 fehérjék HIV kötő funkcióját, azaz a fehérje kötődése a gp120 HIV env fehérjéhez nincs jelentősen károsítva. Így pl. bárki alkothat olyan származékot, amely csak a V1 területtel bír, pl. a mintegy 1-94 aminosavakat vagy származékait, amelyek a CD-4 V1 területének csak egy részével bírnak. Bárki megalkothatja ezeknek a fehérjéknek olyan származékait is, amelyek lényegében az itt példaként felhozottakkal azonosak, csak éppen egy vagy alig néhány amino-

sav ki- vagy be van iktatva, vagy helyettesítve van.

Egy másik módszer szerint egy hibrid fehérjét, pl. egy transzlációs fúziós fehérjét alkothatunk meg egy sCD-4 fehérje és hordozó fehérje, másik antigén vagy valamely másik sCD-4 molekula között, hogy poli-sCD-4 molekulát alkossunk meg. Egy még további módszer szerint az sCD-4 kiiktatásos (deléciós) mutánst szintetikus konjugálhatunk egy hordozó molekulához.

Az sCD-4 molekulák affinitását HIV-hez versengő kötési vizsgálattal mutathatjuk ki olyan sCD-4 molekulát alkalmazva, amely ismert aktivitással bír, vagy olyan antitesteket alkalmazva, amely felismeri a CD-4 receptort, mint pl. az OKT-4 és OKT4A. A jelen találmány alkalmas sCD-4 fehérjéi szelektíven kicsapódnak kondicionált tápközegből OKT4A-val, amint ezt a későbbi példákban bemutatjuk. A CD-4 fragmentumait és származékait kémiai úton is előállíthatjuk kifejeződés után, vagy genetikailag állíthatjuk elő a kifejeződés előtt a kódoló szekvencia manipulálásával a vezető és/vagy extracelluláris területnél.

Az sCD-4-et vagy az ebből származó, HIV kötő fehérjét kódoló DNS szekvenciát megkaphatjuk pl. a gén szintetizálásával az ismert DNS szekvenciát alkalmazva, a szekvencián alapuló standard klónozási technikákkal és újra izolálással a fehérje kimutatásával; pl. CD-4 kifejező sejtvonalakból való cDNS klónok átfertőzése és azonosítás a fehérje ellen irányuló antitestekkel (lásd Maddon és munkatársai fentebb idézett munkáját).

Az adott sCD-4 fehérje kódoló szekvenciáját hordozó cDNS klónokat oligonukleotid hibridizációs vizsgáló minták alkalmazásával azonosíthatjuk. Ezeket a vizsgáló mintákat a fehérje adott szekvenciájára alapozva tervezhetjük. Amikor azonosítottunk egy

szóban forgó kódoló szekvenciát hordozó klónt, a fehérje kódoló szekvenciáját kimetszhetjük restrikciós enzimek alkalmazásával és beiktathatjuk klónozó és/vagy kifejező vektorokba. Egy kifejező vektorban az sCD-4 fehérje kódoló szekvenciája operatíván össze van kapcsolva az átíráshoz, transzlációhoz és a kódoló szekvencia feldolgozásához szükséges vagy kívánatos szabályozó funkciókkal.

A jelen találmány kivitelezésénél *E. coli*-ban egy DNS kódoló szekvencia, amely a HIV kötő fehérjét, pl. az sCD-4-et vagy származékait kódolja, operatíván össze van kapcsolva egy szabályozó elemmel egy DNS vektoron belül az *E. coli* transzformálásához. Számos gram negatív, ilyen szabályozó elemeket tartalmazó bakteriális kifejező vektor áll rendelkezésre. A szabályozó elem magában foglal egy promotort, amely hat az RNS polimeráz kötésre és átírássra. Szabályozható, pl. indukálható vagy depresszállható promotorok az előnyösek. Használható promotorok széles választéka áll rendelkezésre heterológ polipeptidek kifejezésére *E. coli*-ban. Ezek között találjuk a *trp* promotort és a lambda PL promotort [lásd pl. a 4,578,355 lajstromszámú amerikai egyesült államok-beli szabadalmi leírást, valamint Courtney és munkatársai közleményét: *Nature* 313, 149 (1985)]. A szabályozó elem legelőnyösebben magában foglal egy vezető szekvenciát a HIV kötő fehérje szállításához a sejtmembránra vagy azon keresztül, mivel a jelen találmány szerint felfedeztük, hogy a HIV kötő fehérjét ki lehet választani. Az egyik vezető szekvencia, amelyről kimutatjuk, hogy fehérjét szállít és az *E. coli* külső membránon a *Bacillus licheniformis* penicillináz génjének vezető szekvenciája [lásd Sarvas és munkatársai: *J. Bacteriol.* 155, 657(1983)].

Példaként itt elsősorban a külső membrán "A" poliszacharid-

hoz tartozó vezető szekvenciát hozzuk fel, amelyet OMPA vezető szekvenciának vagy szignál szekvenciának neveznek [lásd Mo.vva és munkatársai: J. Molec. Biol. 143, 317(1980)]. Az OMPA kódoló szekvencia tartalmaz egy olyan vezető szekvenciát, amely alkalmas a HIV kötő fehérje kiválasztására a fermentációs közegbe. Azt már korábban felismerték, hogy az OMPA vezető szekvenciát lehet alkalmazni sokféle kis molekulatömegű fehérje vagy polipeptid kiválasztására a tenyésztő tápközegbe. Így pl. az OMPA szignál szekvenciát alkalmazhatjuk, hogy az SKBsCD-4-en, V1J4-en és V1V2J4-en kívül nagy mennyiségű (pl. több, mint 1-10 mg/l) aktív humán transzformáló növekedési faktor-alfa (TGF-alfa), tumor nekrozis faktor (TNF) és interleukin-1-béta (IL-1-béta) kiszállítását is elérhessük.

Az OMPA szignál lényegében az alábbi 21 aminosavat foglalja magában: N-met-lys-lys-thr-ala-ile-ala-ile-ala-val-ala-leu-ala-gly-phe-ala-thr-val-ala-glu-ala-C. Egy ilyen vezető szekvenciához való DNS kódoló szekvenciát szintetizálhatunk úgy, hogy egy vagy több restriktációs helyet helyezünk el a C-terminális aminosavval szomszédosan egy kívánt DNS kódoló szekvencia beiktatásához és úgy, hogy egy terminátor legyen elhelyezve a kívánt kódoló szekvenciától lefelé. A későbbi példákban bemutatunk egy szintetikus kódoló szekvenciát illusztrálás céljából.

A HIV kötő fehérje mini-génen kívül, vagyis a szabályozó elemhez operatíván kötött kódoló szekvencián kívül a transzformáláshoz alkalmazott vektor előnyösen tartalmaz legalább egy fenotípusos transzformációs markert, pl. genetikai szelekciós markert, úgymint egy antibiotikum rezisztencia gént, egy kromogén szert vagy egy olyan gént, amely auxotróf mutációt egészít ki.

A vektor tartalmaz még autonóm replikációhoz szükséges területeket is.

sCD-4 fehérjék *E. coliban* való kifejezéséhez alkalmas vektorok bemutatására szolgáló konstrukciókat részletesen írunk le a példákban. A fehérjék e tápközegekbe fejeződnek ki és láthatóan megfelelően vannak tekeredve.

A jelen találmány kivitelezésénél *Streptomycesben* egy DNS kódoló szekvencia, amely a HIV kötő fehérjét, pl. az sCD-4-et vagy származékait kódolja, operatíván össze van kapcsolva egy szabályozó elemmel egy DNS vektoron belül a *Streptomyces* transzformációjához. A szabályozó elem magában foglal egy promotort, amely hat az RNS polimeráz kötésre és átírássra. Szabályozható, pl. indukálható vagy derepresszálnak promotorok az előnyösek. Sokféle alkalmas promotor áll rendelkezésre heterológ polipeptidek kifejezésére *Streptomyceshez*. Erre példaként említhetjük a *Streptomyces galaktóz operon galaktóz-indukálható promotorját* [Fornwald és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2130(1987)], a *S. lividans* β -galaktozidáz gén konstitutív promotorját [Eckhardt és munkatársai: *J. Bacteriol.* 169, 4249(1987); Brawner és munkatársai: 4,717,666 lajstromszámú amerikai egyesült államok-beli szabadalmi leírás], és a *S. longisporus* tripszin inhibitor gént (87 307 260.7 számú európai szabadalmi bejelentés), vagy egy időlegesen szabályozott promotort, pl. azt, amelyről *M. echinosporával* kapcsolatban számoltak be [Baum és munkatársai: *J. Bacteriol.* 170, 71(1988)]. Az átírás befejezéséhez szolgáló területek *Streptomycesben* számos *Streptomyces* gén 3' végéről származhatnak, pl. lehet a *Streptomyces galaktóz operon* végénél levő terminációs szignál vagy az a szignál, amely a *S. fradiae* neomicin foszfo-

transzferáz gén végénél található [Thompson és Gray: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 8190(1983)]. A fehérje kivételére szolgáló szekvenciák Streptomycesben lehetnek azok, amelyeket *S. lividans* β -galaktozidáz génből, a *S. lividans* LEP-10 génből (87 307 260.7 számú európai szabadalmi bejelentés) és a *S. longisporus* tripszin inhibitor génből izoláltak.

Az sCD-4 gén be van építve egy nagyobb DNS molekulába, amely egy genetikai szelekciós marker rendszert tartalmaz. A szelekciós marker rendszer lehet a nagyszámú ismert marker rendszerek bármelyike, úgy, hogy a marker gén szelektálható új fenotípust ad át a transzformált sejtnak. Példák lehetnek a Streptomyces gyógyszer-rezisztencia gének, pl. a tiosztrepton rezisztencia riboszomális metiláz [Thompson és munkatársai: Gene 20, 51(1982)], neomicin foszfortranszferáz (Thompson és munkatársai, fentebb idézett munka), és eritromicin rezisztencia riboszomális metiláz (Thompson és munkatársai, fentebb idézett munka). A DNS molekula tartalmazhat egy Streptomycesben való autonóm replikálódást szolgáló szekvenciát, pl. a pIJ101 származékait [Keiser és munkatársai: Mol. Gen. Genet. 185, 223(1982)], vagy egy SLP1 származék-vektort [Bibb és munkatársai: Mol. Gen. Genet. 184, 230(1981)]. A DNS molekula tartalmazhat egy olyan markert is, amely lehetővé teszi a gén-sokszorozódást. Az ilyen markerek, amelyek a gén kópiaszám sokszorozását szolgálják Streptomycesben, magukban foglalják a streptomycin rezisztencia génjét [Hornemann és munkatársai: J. Bacteriol. 169, 2360(1987)] és az arginin auxotrófiát [Altenbuchner és munkatársai: Mol. Gen. Genet. 195, 134(1984)].

A kiindulási kifejezési tanulmányoknál a CD-4 kódoló szekvenciát, amint az alábbi példákban részletesen leírjuk, a β gal

szignál szekvenciához fuzionáljuk a β gal szignál peptid hasítási helytől 8 aminosavhelyre lefelé elhelyezkedő helynél. A Streptomyces replikációs funkciókat ehhez a kifejező vektorhoz a pIJ702 plazmid szolgáltatja [Katz és munkatársai: J. Gen. Microbiol. 129, 2703(1983)], amely a pIJ101 származéka [Keiser és munkatársai: Mol. Gen. Genet. 185, 223(1982)]. Az alkalmazott gazdatörzs vad típusú S. lividans 1326 [Bibb és munkatársai: Mol. Gen. Genet. 184, 230(1981)]. A β gal-sCD-4 fúziós fehérjét kimutatjuk mind a tenyészet felülúszóban, mind az ép sejtekben. A kísérletek egy másik sorozata azt mutatja, hogy az LTI promotort használhatjuk, hogy az sCD-4 fehérjék hatékonyabb kifejezését kapjuk meg.

Az LTI kifejező/kiválasztó vektorok analógok a β gal rendszerrel, amennyiben a gén kifejeződést az LTI promotor irányítja és a fehérje kijutást az LTI szignál peptid könnyíti meg. Egy sor HIV kötő fehérje kódoló szekvenciáit klónozzuk az LTI vektorba, ideértve a $V_1V_2J_4$ -et és V_1J_4 -et. Ezen fehérjék mindegyikének kódoló szekvenciáit az LTI szignál peptid hasítási helytől 8 aminosavval lefelé levő helynél iktatjuk be. A β gal fúziókhoz hasonlóan az sCD-4 fehérjéket átvihetjük a tenyészet felülúszóba az LTI szignál peptid révén. A Streptomyces replikációs funkciókat ismét csak a pIJ101 származékok: a pIJ702 és pIJ351 szolgáltatják (Keiser és munkatársai fentebb idézett munkája).

Az SKBsCD-4, V_1J_4 és $V_1V_2J_4$ kifejezést az LTI kifejező rendszerből először S. lividans 1326-ban vizsgáljuk. Mind az SKBsCD-4, mind a $V_1V_2J_4$ egyformán oszlik meg a tenyészet felülúszó és az ép sejtek között. Bár ezek a fehérjék nem szállítódnak ki tökéletesen, az intra- és extracelluláris formák, úgy tűnik, azonos molekulatömeggel bírnak SDS-poliakrilamid gélen való mozgékonyasá-

guk alapján megítélve. Nem világos, vajon a szignál peptid proteolitikusan el van-e távolítva az intracelluláris formából. Az SKBsCD-4 maximális szintjeit 30 mg/l-re becsüljük a tenyészet felülúszóban és az ép sejtekben. A V_1V_2J4 szinteket legalább 30 mg/l-re becsüljük (tenyészet felülúszó és ép sejtek).

Az sCD-4 kifejezésénél *S. lividans*-ban szemben találjuk magunkat egy problémával: ennek fogékonyságával proteáz aktivitásokra. Ezt a problémát ki lehet küszöbölni vagy legalábbis jelentősen csökkenteni lehet az sCD-4 kifejezésével más *Streptomyces* fajokban. Az sCD-4 fehérjét kifejezhetjük pl. *S. coelicolor*-ban, *S. longisporus*-ban és *S. albus*-ban. Várható, hogy a molekula stabilitása fokozódik ezeket a megváltozott gazdaszervezeteket alkalmazva. Az sT4 fehérje kifejezése *S. longisporus*-ban előnyös lehet, mivel ez a gazdaszervezet lényegesen kevesebb fehérjét választ ki a tenyészet felülúszóba, amely tény segít a tisztítási lépésben.

A jelen találmány kivitelezésénél élesztőben egy DNS kódoló szekvencia, amely a HIV kötő fehérjét, pl. az sCD-4-et vagy származékait kódolja, operatíván össze van kapcsolva egy szabályozó elemmel egy DNS vektoron belül az élesztő transzformálásához. Bármilyen élesztő gazdaszervezetet, amely a transzformáló, klónozó és kifejező rendszerekhez hozzáférhető, alkalmazható. A megfelelő példák között találjuk a *Hansenula*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida* és *Saccharomyces* nemzetségek élesztőit. Az előnyös élesztő gazdaszervezet a *Saccharomyces cerevisiae*.

A szabályozó elem magában foglal egy promotort, amely hatással van az RNS polimeráz kötésre és átírássra. Előnyök a szabá-

lyozható, vagyis indukálható vagy derepresszálható promotorok. Sokféle alkalmas promotor áll rendelkezésre heterológ fehérjék kifejezésére élesztőben. Ezek között találjuk a rézzel indukálható metallothionein gén (CUP1) promotort és a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (TDH3) és alkohol dehidrogenáz (ADH) glikolitikus gének konstitutív promotorát. Az átírás befejezéséhez szolgáló területek az élesztőben sokféle élesztő gén bármelyikének 3' végéről származnak, ilyen pl. az izo-1-citokróm C (CYC1) génje.

Az sCD-4 gén egy nagyobb DNS molekulába van beépítve, amely egy genetikai szelekciós marker rendszert tartalmaz. A szelekciós marker rendszer lehet egy sor ismert marker rendszer bármelyike, pl. olyan marker gén, amely szelektálható új fenotípust ad át a transzformált sejtnak. A példák közt találjuk a bioszintetikus enzimekhez tartozó élesztő géneket, pl. a foszfo-ribozil antranilát izomerázt (TRP1) vagy orotidin-5'-foszfát dekarboxilázt (URA3) vagy a heterológ gyógyszer-rezisztencia géneket, mint a G419 rezisztencia vagy benomil rezisztencia (BEN1) géneket. A DNS molekula tartalmazhat továbbá egy szekvenciát élesztőben való autonóm replikációhoz, pl. az élesztő 2 mikronos köralakú ori területét; vagy egy kromoszomális autonóm replikációs területet (ARS), pl. ARS1-et, és egy élesztő centromérát (CEN), pl. CEN3-at, hogy lehetővé váljék a plazmid autonóm replikációja.

Az előnyös kifejező rendszerben a HIV kötő fehérje kódoló szekvencia egy olyan kódoló szekvenciához van fuzionálva, amely stabilizálja a kifejeződést, mivel azt már korábban felfedezték, hogy az SKBsCD-4 egyedül gyengén fejeződik ki; az ilyen gyenge kifejeződés a nem eléggé hatékony átírásnak és transzlációnak vagy a gyors fehérjelebomlásnak tulajdonítható. Bármely esetben

kimutatjuk, hogy egy gén-fúzió terméke, amelyben egy ubikvitin kódoló szekvenciája az SKBsCD-4 kódoló szekvenciájához van fuzionálva az 5' végnél, viszonylag magas szinten fejeződik ki és elhasad, ubikvitint és az sCD-4 génterméket termelve.

Egy ubikvitin DNS kódoló szekvenciát izolálhatunk élesztőből vagy más eukarióta sejtéből, beleértve az emlős sejteket, standard gén klónozó technikákkal. Egy másik módszer szerint ezt ismert technikákkal szintetizálni lehet. A moduláris ubikvitin gén, amelyet a szóban forgó találmány bemutatására alkalmazunk, nukleotid szekvenciája az, amelyet Ecker és munkatársai írnak le [J. Biol. Chem. 262, 3524(1987)]. A szekvencia lényegében az alábbi:

AATTCATTATGCAGATCTTCGTCAAGACGTTAACCGGTAAAACCATAACTCTAGA
 AGTTGAATCTTCCGATACCATCGACAACGTTAAGTCGAAAATTCAAGACAAGGAA
 GGCATTCCACCTGATCAACAAAGATTGATCTTTGCCGGTAAGCAGCTCGAGGACG
 GTAGAACGCTGTCTGATTACAACATTCAGAAGGAGTCGACCTTACATCTTGTCTT
 AAGACTAAGAGGTGGTTGAGGTAC

Egy szignál peptid DNS szekvenciáját beiktatva a HIV kötő fehérje 5' végénél elérhetjük a fehérje kiválasztását a tenyésztő tápközegbe. Az erre a célra használható szignál szekvenciák pl. az élesztő párosodási faktor szignál szekvenciája, az alfa faktor [Kurjan és Herskowitz: Cell 30, 933(1982)]. Ezen kívül kifejeződést érhetünk el az sCD-4 élesztő sejt kifejező modul integrálásával élesztő kromoszómába, amelyet sokszorozás követ, olyan markereket alkalmazva, mint pl. az élesztő DHFR gén, a megnövekedett kópiaszám szelektálására.

Általában a jelen találmány sCD-4 fehérjéit a felhasznált tenyészközegből tisztíthatjuk, különböző fehérjetisztítási technikákat alkalmazva, így pl. affinitáskromatográfiát, ion-

cserélő kromatográfiát, hidrofób kromatográfiát vagy fordított fázisú kromatográfiát.

Az sCD-4-et, fragmentumait és származékait affinitáskromatográfiával tisztíthatjuk általános csoport-specifikus adsorbenseket alkalmazva, pl. szénhidrát kötést vagy festék affinitás ligandumokat; vagy olyan ligandumokat alkalmazva, amelyek fajlagosan kötődnek sCD-4-hez, pl. monoklonális antitest vagy HIV gp120 fehérje vagy ezek részei.

A tisztítás a sejtek szelektív tápközegeken 28-45°C hőmérsékleten végzett növesztése után az alábbiakból áll: a fermentációs tápközeg derítése, majd a HIV kötő fehérje elkülönítése a tápközegben jelen levő többi fehérjétől. Az előnyös eljárásban az sCD-4 fehérjéket a tenyészközegből kromatográfiás lépések sorozatát alkalmazva tisztítjuk, amelyek az sCD-4 molekula tulajdonságain alapulnak.

Az sCD-4 fehérjék tisztításának egy másik módszere magában foglalja az sCD-4 ellen irányuló monoklonális antitestek alkalmazását. A fehérjét egy lépésben tisztíthatjuk a derített tenyésztő tápközeg átengedésével egy affinitás gél rögzítőanyagon, amelyre a fehérje ellen irányuló monoklonális antitest kötve van. A szóban forgó fehérje az antitest kötőhelynél az oszlopra kötődik, míg a szennyező fehérjék keresztülhaladnak az oszlopon. A fehérjét azután eluáljuk az oszlopról olyan körülmények között, hogy az inaktiválást megakadályozzuk.

Az sCD-4 fehérjék in vitro biológiai és immunológiai tulajdonságainak jellemzése azt jelzi, hogy a fehérjék értékesek az AIDS megelőzésében és kezelésében. A tanulmányok azt jelzik, hogy az sCD-4 fehérjék úgy működnek, mint a vírus extracelluláris és

vírusról-vírusra való terjedésének inhibitorai. Mivel a jelen tá-
lálmányban leírt sCD-4-ről, fragmentumairól és származékairól ki-
mutatjuk, hogy gátolja a vírus kötését a $CD-4^+$ célsejtekhez te-
nyészetben, úgy véljük, hogy ezeknek a fehérjéknek a beadása fer-
tőzött személyeknek úgy működik, hogy gátolja a vírus extracel-
luláris elterjedését. Ennek megfelelően az sCD-4 fehérjék érté-
kesek mind megelőző, mind terápiás szerként AIDS vagy AIDS-sel
kapcsolatos komplex (ARC) kezelésében.

Megelőző (profilaktikus) szerként az sCD-4 fehérjét azok-
nak az egyéneknek adjuk be akiknek nagy kockázata van ehhez a
betegséghez, vagy olyan egyéneknek, akikről kimutatjuk a HIV-nek
való kitettséget a vírus elleni antitestek jelenlétével. A fehér-
je hatékony mennyiségének beadása a betegség korai stádiumában
vagy ennek megjelenése előtt úgy működik, hogy gátolja a $CD-4^+$
limfociták HIV általi fertőzését. Terápiás anyagként alkalmazva
az sCD-4 beadása HIV-vel fertőzött személyeknek gátolja a vírus
extracelluláris elterjedését.

A fúzió a HIV-vel fertőzött sejtek és más $CD-4^+$ limfociták
között, úgy tűnik, szintén útja lehet a vírus elterjedésének. Sőt,
a fúzió lehet felelős részben a $CD-4^+$ limfocita funkció csökkené-
sért és végül a $CD-4^+$ limfociták elfogyásáért a fertőzött egyé-
nekben. A sejtfúzió függ mind a vírus burkolat géntermékektől,
mind a CD-4 receptortól és gátolva lehet az OKT-4A-val, vagy ha-
sonló monoklonális antitestekkel (Mab) [Sattentau és munkatársai:
Science 234, 1120(1986)]. Az itt leírt sCD-4 fehérjék akadályoz-
zák a sejtfúziót és ezáltal csökkentik a vírus sejtről-sejtre
terjedését és a $CD-4^+$ limfocita funkció veszteségét.

A CD-4 receptor monomorf és így az sCD-4 fehérjéről úgy

véljük, hogy mindazoknak a vírusoknak univerzális gátlóanyagai, amelyek felismerik a CD-4 receptor felületi tartományát, tehát a HIV-nek is.

Az sCD-4 fehérjéket alkalmazhatjuk más szerekkel kombinálva is, pl. más, HIV fehérje ellen irányuló szerekkel összekapcsolva, pl. reverz transzkriptázzal, proteázzal vagy tat-tal. Egy HIV elleni hatásos terápiás szer megelőzheti a fertőzés vírus-közvetítette, valamint sejtről-sejtre való áttérjedését. Az sCD-4 fehérjéket alkalmazhatjuk más antivirális szerekkel pl. azidotimidinnel (AZT) kombinálva is.

A jelen találmány szerinti sCD-4 fehérjék hasznosítást nyerhetnek CD-4⁺ sejt működés gátlóanyagaiként is extracelluláris célmolekulákhoz kötődve, amelyek normálisan kölcsönhatásba lépnek a CD-4 receptor felületi tartományával. Számos tanulmány sugallja a CD-4-receptor kritikus szerepét az immun-tűrőképességben, főleg az autoimmun betegségek patogenezisében és kifejlődésében és a gazdaspecifikus átültetés visszautasításában.

Profilaktikus vagy terápiás szerként az sCD-4 fehérjéket beadhatjuk parenterálisan, előnyösen intravénásan. A szert beadhatjuk infúzióval vagy injekcióval, pl. naponta, hetenként vagy hónaponként. A beadás mennyiségét és gyakoriságát úgy választjuk ki, hogy sCD-4 fehérje hatékony mennyisége maradjon fenn a vérkeringésben. A beadás egy másik módja lehet a testen kívüli kezelés, az sCD-4 fehérjéket dializálószerként alkalmazva.

A jelen találmány szerinti sCD-4 fehérjét alkalmazhatjuk reagensként is, hogy azonosítsuk azokat a természetes, szintetikus vagy rekombináns molekulákat, amelyek terápiás szerként vagy a CD-4⁺ sejt kölcsönhatások gátlóanyagaiként működnek.

Így pl. az sCD-4 fehérjét alkalmazhatjuk átvizsgáló vizsgálatokban, pl. fehérje kölcsönhatási vizsgálatokban ELISA-n alapuló módszerekkel mérve, hogy biokémiaailag tiszta, vizes oldható reagenst kapjunk, amelyet más reagensekkel kombinálva alkalmazhatunk, hogy megvizsgáljuk a CD-4 receptor felületi tartomány kölcsönhatások versengő anyagait. Így pl. mivel az sCD-4 fehérjék a HIV env fehérjéhez vagy HIV env fehérjét tartalmazó keverékekhez kötődnek, a fehérjét alkalmazhatjuk a vírus-kötés gátlóanyagainak átvizsgálásához.

Az in vitro adatokra alapozva, amelyek azt mutatják, hogy az sCD-4 fehérjék kötődnek HIV env fehérjéket kifejező sejtekhez, ezek a fehérjék szolgálhatnak szelektív célzó molekulákként is HIV-vel fertőzött sejtekhez in vivo. Célspecifikus hordozó fehérjeként az sCD-4 fehérjék szolgálhatnak pl. hordozó fehérjeként citotoxikus szerek szolgáltatására a fertőzött sejtekhez.

Ezen kívül azokra az adatokra alapozva, amelyek azt mutatják, hogy a CD-4 receptor fajléagosan társul az MHC II. osztályú antigénekkal az antigén-szolgáltató sejteken, amint ezt a CD-4⁺ sejtek osztály-restrikciója sugallja, az sCD-4 fehérjét alkalmazhatjuk a II. osztályú antigénekkal kombinálva, hogy megvizsgáljuk CD-4 limfocita-célsejt kölcsönhatások inhibitorait. Ezen a példákon kívül, amelyek a közvetlen kötési vizsgálatokon alapulnak a fehérje és célmolekulái között, komplexebb vizsgálatokat is tervezhetünk, amelyek a fehérje felismerésre való biokémiai válaszokon alapulnak. A kiiktatásos (deléciós) mutánsokat alkalmazhatjuk diagnosztikai vizsgálatokban CD-4 fehérjék kimutatására vagy olyan molekulák kimutatására, amellyel ezek kölcsönhatásba lépnek. Így pl. CD-4 és CD-4⁺ sejtek és CD-4 elleni an-

titestek mennyiségi becslése diagnosztikus értékű az AIDS-nél.

Ezen kívül az sCD-4 fehérjéket alkalmazhatjuk új diagnosztikus reagensek kialakítására, pl. Mab-k vagy más típusú molekulák kialakítására standard immunológiai vizsgálatokban való felhasználáshoz, pl. ELISA-ban, befogásos immunassay-ban, radioimmunassayban. Mivel az sCD-4 mutatja az OKT-4-et, az OKT-4A-t és a CD-4 legtöbb, ha nem éppen összes felületi epitópját, a fehérjék különösen hasznosak immundiagnosztikai vizsgálatokban a CD-4 szint abszolút mennyiségének megállapítására a rendszerben.

A CD-4 receptorban három eltérő kémiai környezet található: az oxidáló, hidrofil sejtfelület; a hidrofób membrán; és a redukáló, hidrofil citoplazma. Ezek az eltérő környezetek a legvalószínűbben kizárják a receptor izolálását teljesen natív állapotában. Az sCD-4 fehérjék, amelyek az extracelluláris tartománynak csupán kiválasztott szegmenseit tartalmazzák, oldható fehérjeként válnak ki a sejt felülűszóba és konformációjuk, úgy tűnik, jelentős mértékben utánozza a receptor felületi tartomány felületét. Így az sCD-4 fehérjék alkalmasak a részletes szerkezeti elemzésre, főleg röntgensugár krisztallográfiához. Az sCD-4 fehérjék három dimenziós szerkezetének meghatározása egyedül vagy komplex formában más kölcsönható molekulákkal alapot szolgáltathat sCD-4-re való szelektív antagonisták vagy agonisták racionális tervezéséhez.

Példák

Az itt következő példák bemutató jellegűek és nem korlátozó jellegűek a találmányra vonatkozóan. A genetikai manipulációkhoz alkalmazott enzimeket kereskedelmi forrásból szerezzük be és lényegében a kereskedő útmutatásai szerint alkalmazzuk. Hacsak más-

képpen nem jelezzük, az eljárásokat lényegében úgy hajtjuk végre, amint azt Maniatis és munkatársai leírták [Molecular Cloning; Cold Spring Harbor Laboratory (1982)].

1. példa: E. coli kifejező vektorok megalkotása

Rekombináns DNS manipulációkat alkalmazva a teljes hosszúságú SKBsCD-4 és a V1V2J4 vagy V1J4 kiiktatásos mutánsok kódoló szekvenciáját, amelyeket azonos keretben levő TAA terminációs kodon követ (lásd a fentebbi szekvenciát) egy E. coli kifejező vektorban helyezünk el az OMPA szignál szekvenciától lefelé, hogy megalkossuk az OMPAST4BBV1, OMPAV1V2 és OMPAV1 plazmidokat. Ezeknek a vektoroknak a konstrukciója az alábbi:

A JRT4 plazmid megalkotása. Abból a célból, hogy a JRT4 plazmidot megalkossuk, a DSP1 plazmidot [Pfarr és munkatársai: DNS 4, 461 (1985)] elhasítjuk XhoI-gyel, az SV40 poliA korai területet kiiktatjuk, és az XhoI helyeket betöltjük DNS polimeráz Klenow fragmentumot alkalmazva. A szarvasmarha növekedési hormon (BGH) poliadenilező területet [Pfarr és munkatársai: DNA 5, 115 (1986)] elhasítjuk PvuII-vel és KpnI-gyel és a KpnI helyet tompa végűvé tesszük T4 DNS polimerázzal végzett kezeléssel. Ezt a 230 bp-s fragmentumot DSP1-hez ligáljuk, hogy megalkossuk a DSP1 BGH-t.

A DSP1BGH-t SmaI-gyel és SalI-gyel elhasítjuk és a galk kassetát (amely az SV40 korai promotort, a galk kódoló területet és a BGH poliA területet tartalmazza), pUC19-be [Yanisch-Perron és munkatársai: Gene 33, 103(1985)] ligáljuk a SalI helynél egy SalI véget, egy BglII helyet és egy SmaI véget tartalmazó szintetikus kapcsolót alkalmazva. Ez a három részes ligálás eredményezi a DSP1BZBGH.JT plazmidot.

A DSP1BZBGH.JT-t, amelyet StuI-gyel és BclI-gyel hasítunk, hogy a galK kódoló területet kiiktassuk, egy 1,7 kb-s EcoRI (be-töltött) BamHI fragmentumba ligáljuk, amely tartalmazza pT4B plazmidből eredő CD-4 cDNS-t [Maddon és munkatársai: Cell 42, 93(1985)], így alkotjuk meg a JRT4 plazmidot.

A pUCsT4 megalkotása. Abból a célból, hogy a pUCsT4 plazmidot megalkossuk, a pT4b-ből való CD-4 cDNS egy HaeII-HpaII fragmentumát (1125 bp) ligáljuk szintetikus kapcsolók alkalmazása segítségével a pUC18 vektorhoz, amelyet előzőleg KpnI-gyel és XbaI-gyel hasítottunk. A CD-4 cDNS HaeII végét a pUC18 KpnI helyéhez ligáljuk KpnI és HaeII végekkel rendelkező szintetikus kapcsolót alkalmazva. A CD-4 cDNS HpaII végét a pUC18 XbaI helyéhez ligáljuk egy HpaII véggel és XbaI véggel rendelkező szintetikus kapcsolót alkalmazva. Ez a kapcsoló beiktat egy TAA stop kodont is a CD-4 kódoló terület 1257. nukleotidja után. Az így létrejövő plazmid a pUCsT4.

A pST4sal megalkotása. Abból a célból, hogy a pST4sal plazmidot megalkossuk, a JRT4 plazmidot BglII-vel és SacI-gyel hasítjuk és egy 959 bp-s fragmentumot (amely az SV40 korai promotort és a CD-4 cDNS első 602 nukleotidját tartalmazza) izoláljuk. A pUCsT4 plazmidot SacI-gyel és XbaI-gyel hasítjuk és egy 660 bp-s fragmentumot (amely a CD-4 cDNS-t tartalmazza a 603.-1257. nukleotidok között, ezt követi a szintetikus kapcsolónál a TAA kodon) izolálunk. Ezt a két fragmentumot DSP1BZBGH.JT-be ligáljuk, amelyet előzőleg BglII-vel és XbaI-gyel hasítottunk, hogy kiiktassuk az SV40 korai promotort és a teljes hosszúságú CD-4 kódoló területet. Az így létrejövő plazmid a pST4sal.

pST4DHFR megalkotása. Abból a célból, hogy a pST4DHFR plaz-

midot megalkossuk, egy β -globin DHFR kifejező kazettát tartalmazó BglIII-BamHI fragmentumot ligálunk a pST4sal BamHI helyébe. A β -globin-DHFR kifejező kazetta az alábbiakat tartalmazza: az egér β -globin promotort (550 bp-s HincII fragmentum a pPK288 plazmidből)[Berg és munkatársai: Mol. Cell. Biol. 3, 1246(1983)], 5' végén egy szintetikus kapcsolóval módosítva, hogy tartalmazzon egy BglIII helyet; az egér DHFR kódoló területet [735 bp-s HindIII (betöltött) fragmentum a pSVL-DHFR plazmidből, lásd Subramani és munkatársai: Mol. Cell. Biol. 1, 854(1981)]; NheI (betöltött)-BamHI (betöltött) SV40 poliA korai terület a DSP1-ből [Pfarr és munkatársai: DNA 4, 461(1985)]; és az egér DHFR terminális területet [907 bp-s HindIII(betöltött) fragmentum az mDH9 plazmidből, lásd Fragne és munkatársai: Mol. Cell. Biol. 4, 2921(1984)] 3' végén egy szintetikus kapcsolóval módosítva, hogy BamHI hely alakuljon ki.

pST4BBV1DHFR megalkotása. Abból a célból, hogy megalkossuk a pST4BBV1DHFR plazmidot, a pST4DHFR plazmidot EcoRI-gyel és XbaI-gyel hasítjuk és a kisebb fragmentumot, amely az sCD-4 kódoló területet tartalmazza, kiiktatjuk. Az sT4sal plazmidot XbaI-gyel és BbvI-gyel hasítjuk és egy 1120 bázispáros kódoló fragmentumot, amely az oldható CD-4 minusz a vezető terület szekvenciáját tartalmazza, izolálunk. Ezt a fragmentumot az EcoRI/XbaI-gyel hasított pST4DHFR-hez ligáljuk egy EcoRI véggel, egy KpnI helylyel és egy BbvI véggel bíró szintetikus kapcsolót alkalmazva. Ez a fragmentum a fentebb izolált sCD-4 fragmentumon levő BbvI túlnyúlással hasonlítható össze. Az így létrejövő plazmidot pST4BRV1DHFR-nek nevezzük.

Az OMPAST4 megalkotása. Abból a célból, hogy megalkossuk az

OMPAST4 plazmidot, az OMPA.GS plazmidot NcoI-gyel és Sall-gyel emésztjük és a kapcsoló területet tartalmazó kisebb fragmentumot kiiktatjuk. Az OMPA.GS a pAS1 származéka [Rosenberg és munkatársai Meth. Enzymol. 101, 123(1993); 4,578,355 lajstromszámú amerikai egyesült államok-beli szabadalmi leírás], amely egy szintetikus szekvenciával bír a cII riboszóma kötő szekvencia 3' végénél levő NdeI helynél beiktatva. A szintetikus kapcsoló tartalmazza az OMPA vezetőt, amelyet egy többcélú kapcsoló (polilinker) szekvencia követ.

A szintetikus szekvencia lényegében a következő:

```
5' -T ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG GCA CTG GCT
      GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GGC TCT AGA GTC GAC CTA
      GTT AAC TAG-3'
```

A pUCsT4 plazmidot NcoI-gyel és Sall-gyel hasítjuk és az sCD-4 szekvenciát (124.-1257. CD-4 nukleotidok) tartalmazó 1149 bázispáros fragmentumot izoláljuk. Ezt a fragmentumot az NcoI/Sall-gyel hasított OMPA.GS-be ligáljuk, hogy megalkossuk az OMPA ST4-et

Az OMPAST4BbvI megalkotása. Abból a célból, hogy megalkossuk az OMPAST4BbvI plazmidot, az OMPAST4-et hasítjuk NaeI-gyel és XbaI-gyel. A kisebb fragmentumot, amely ebből a hasításból származik, és amely az sCD-4 kódoló területet tartalmazza, kiiktatjuk. Az ST4BBV1DHFR plazmidot KpnI-gyel hasítjuk és a létrejövő 3' túlnyúlást tompa végűvé tesszük T4 DNS polimerázzal. A tompa végű DNS-t azután XbaI-gyel hasítjuk és az 1124 bázispáros fragmentumot, amely a CD-4 cDNS 145.-1257. nukleotidjait tartalmazza, izoláljuk. Az izolált fragmentumot a NaeI/XbaI-gyel hasított OMPAST4 plazmidhoz ligáljuk, hogy megalkossuk az OMPAST4BbvI plazmidot.

A pucST4184 megalkotása. Abból a célból, hogy a pucST4184 plazmidot megalkossuk egy, a CD-4 cDNS-ből származó EcoRI-NheI fragmentumot [egy 682 bp-s fragmentum, amely a (-25)-től (+176)-ig terjedő aminosavakat kódolja] sk727/725 szintetikus kapcsolóhoz (NheI és AvaI végekkel) ligáljuk az NheI helynél. Az sk727/725 a CD-4(177.-183.) aminosavait kódolja. Az sk727/725 AvaI végét a pucST4 AvaI-XbaI fragmentumához ligáljuk (amely a humán cDNS 1198.-1257. bázispárjait tartalmazza és a CD-4 receptor 351.-369. aminosavait kódolja; ezt egy TAA terminációs kodon követi). Ezt a szekvenciát, amelyet EcoRI és XbaI végek követnek, beiktatjuk pUC19-be a pUC19 polilinkerben levő EcoRI és XbaI végeknél (sk727/725). Az sk727/725 lényegében az alábbi:

5'-ctagctttccagaagggcc-3'

3'-gaaaggtcttccggagcc-5'.

A pucST4106 megalkotása. Abból a célból, hogy a pucST4106 plazmidot megalkossuk, a CD-4 cDNS EcoRI-AvaII fragmentumát [amely az 1.-413. bázispárokat tartalmazza és a (-)25-97 aminosavakat kódolja] egyesítjük az sk791/792 szintetikus kapcsolóval (AvaII-AvaI végek) az AvaII helynél. Az sk791-792 a CD-4 88.-104. aminosavait kódolja. Az sk 791/792 AvaI végét a pucST4 AvaI-XbaI fragmentumához ligáljuk (amely a humán cDNS 1198-1257 bázispárjait tartalmazza, és a CD-4 receptor 351.-369. aminosavait kódolja, amelyet egy TAA terminációs kodon követ). Ez a szekvencia, amelyet EcoRI és XbaI végek szegélyeznek, pUC19-be van beiktatva az EcoRI és XbaI végeknél a pUC19 polilinkerben. Az sk791/792 lényegében az alábbi:

5'-gaccagaaggaggaggtgcaattgctagtgttcggattgactgccaac

gtcttcctcctccacgttaacgatcacaagcctaactgacggttgagc-3'.

sT4184.DHFR megalkotása. Abból a célból, hogy az sT4184.DHFR-t megalkossuk, a pucST4184 EcoRI-XbaI fragmentumát (amely a -25.-183. aminosavakat kódolja a 351.-369.-hez fuzionálva) ligáljuk a pst4.DHFR EcoRI és XbaI végeihez az SKBCD-4-et kódoló EcoRI-XbaI fragmentum helyébe.

Az sT4106.DHFR megalkotása. Abból a célból, hogy az sT4106.DHFR plazmidot megalkossuk, a pucST4106 EcoRI-XbaI fragmentumát (amely a -25.-104. aminosavakat kódolja a 351.-369.-hez fuzionálva) ligáljuk a pst4.DHFR EcoRI és XbaI végeihez az SKBcCD-4-et kódoló EcoRI-XbaI fragmentum helyett.

Az OMPAV1 megalkotása. Abból a célból, hogy az OMPAV1-et megalkossuk, az OMPAST4BbvI plazmidot AflIII-vel és XbaI-gyel hasítjuk és a CD-4 cDNS kódoló terület 371.-1257. nukleotidjait tartalmazó kisebb fragmentumot kiiktatjuk. A pst4106.DHFR plazmidot AflIII-vel és XbaI-gyel hasítjuk és egy 160 bázispáros fragmentumot, amely a CD-4 cDNS szekvencia 371.-459 és 1198.-1257. nukleotidjait tartalmazza, izolálunk. A két fragmentumot ligáljuk, így alkotjuk meg az OMPAV1 plazmidot.

Az OMPAV1V2 megalkotása. Abból a célból, hogy az OMPAV1V2-t megalkossuk, az OMPAST4BbvI plazmidot SacI-gyel és XbaI-gyel hasítjuk és a kisebbik fragmentumot, amely a CD-4 cDNS szekvencia 603.-1257. nukleotidjait tartalmazza, kiiktatjuk. Az ST4184.DHFR plazmidot SacI-gyel és XbaI-gyel hasítjuk és egy 164 bázispáros fragmentumot, amely a CD-4 cDNS szekvencia 603.-696. és 1198.-1252. nukleotidjait tartalmazza, izolálunk. A két fragmentumot ligáljuk, hogy megalkossuk az OMPAV1V2 plazmidot.

2. példa. sCD-4 fehérjék kifejezése E. coliban

Az OMPAV1 és OMPAV1V2 konstrukciókat AR58 (cI857) és AR120

defektív E. coli lambda lizogénekbe transzformáljuk standard eljárásokat alkalmazva. Hőindukciót [Rosenberg és munkatársai: Meth. Enzymol. 101, 123(1983)] vagy nalidixinsavas indukciót [Mott és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 88(1995)] alkalmazunk, amint az alábbiakban leírjuk.

Hőindukció. Az AR58 sejtvonalnál 200 ml LB tápközeget (amely 50 μ g/ml ampicillint is tartalmaz) beoltunk OMPAST4Bbv1, OMPAV1 vagy OMPAV1V2 plazmidot tartalmazó AR58 sejtek egy éjszakán át nőtt 7 ml-es tenyészetével, és rázó inkubátorban növesztjük 32°C hőmérsékleten. 650 nm-nél mért 0,8 abszorbancia egységnél (OD_{650}) 200 ml 35°C hőmérsékletre felmelegített LB tápközeget adunk a tenyészethez és a lombikot 42°C hőmérsékletű rázó inkubátorba visszük át. A tenyészet 1 ml-es mintáit vesszük ki elemzésre a 30., 60. és 90. percben a hőmérséklet váltástól számítva. A 90. percben a sejteket 15 percen át hűtjük jeges vízben és azután üledékbe visszük 3500 fordulat/perccel 15 percen át 4°C hőmérsékleten centrifugálva J-6 Beckman centrifugában (Beckman Instruments, Fullerton, Kalifornia). A sejttöledékeket -20°C hőmérsékleten tároljuk a feldolgozásig. A kondicionált tápközeget -20°C hőmérsékleten fagyasztva tároljuk.

Nalidixinsavas indukció. Az AR120 sejtvonalnál 400 ml LB tápközeget (amely 50 μ g/ml ampicillint is tartalmaz) beoltunk OMPAST4Bbv1, OMPAV1 vagy OMPAV1V2 plazmidot tartalmazó AR120 sejtek egy éjszakán át nőtt 20 ml-es, tenyészetéből vett 13 ml sejttel, és rázó inkubátorban növesztjük 37°C hőmérsékleten. 0,4 OD_{650} értéknél 400 ml nalidixinsavat (50 mg/ml) adunk a tenyészethez. A tenyészetet 37°C hőmérsékleten tartjuk rázó inkubátorban és 1 ml-es mintákat veszünk a nalidixinsav beadásától számított 1., 3. és 5. órában. Az 5. órában a sejteket 15 percig hűtjük jeges vízben, majd 3500

fordulat/percnél üledékbe visszük 15 perc alatt 4°C hőmérsékleten J6 Beckman centrifugában. A sejtüledéket fagyasztva tároljuk -20°C hőmérsékleten feldolgozásig. A kondicionált tápközeget -20°C hőmérsékleten fagyasztva tároljuk a feldolgozásig.

Az indukciót követően a sejteket 1 ml-es mintákból üledékbe visszük és elemezzük a teljes hosszúságú és mutáns sT4 fehérjék (SKBsCD-4, V1J4 és V1V2J4) jelenlétére Western-folt elemzéssel, baktériumokban termelt oldható T4 denaturált formája elleni nyúl poliklonális antitestet alkalmazva. Megfelelő méretű fehérjéket mutatunk ki mind a hővel, mind a nalidixinsavval indukált minták sejt-lizátumaiban. A kimutatott szintek a teljes fehérje 1-5 %-át képviselik.

A kondicionált tápközeg feldolgozása. A fagyasztott kondicionált tápközeget szobahőmérsékleten felengedtetjük és 30 ml alikvotokat veszünk, majd 4°C hőmérsékleten 1 órán át centrifugáljuk 24000 fordulat/percnél Beckman SW28 rotorban. A centrifugálást követően a felülúszókat összegyűjtjük és 10-20-szorosra koncentrálnak 4°C hőmérsékleten membrános nyomószűrővel.

A koncentrált tápközeget teljes hosszúságú SKBsCD-4, V1J4 vagy V1V2J4 fehérjékre vizsgáljuk Western folt elemzéssel (akár csak fentebb), versengő ELISA-val és immun-kicsapással.

Az egyes mintákban a megfelelő méretű fehérjét a koncentrált, kondicionált tápközegben Western-folt elemzéssel mutatjuk ki olyan szinten, amely 1-5 %-át képviseli (0,1-0,5 ng/ml nem koncentrált tápközeg) a sejt belsejében kimutatott fehérjének. Mind a három fehérje kötődik OKT4A-hoz a versengő ELISA vizsgálatban. A V1J4 és V1V2J4 fehérjéket tovább elemezzük CD-4 elleni monoklonális antitestek paneljével (Ortho, Rariton, New Jersey) végzett immun-

kicsapással. Az OMPAV1 által kifejezett fehérjét, a V1J4-et az OKT4A és OKT4D kicsapja, de az OKT4, OKT4B, OKT4C, OKT4E vagy OKT4F nem csapja ki. Az OMPAV1V2 által kifejezett fehérjét, a V1V2 J4-et az összes OKT4 monoklonális antitest kicsapja az OKT4 kivételével. Ezen kívül ennek a fehérjének az affinitása az OKT4C-hez kisebb, mint a többi monoklonális antitesteké.

Sejtüledék feldolgozás. Az OMPAST4Bbv1/AR58 hőindukció 90 perces időpontjából származó sejtüledékeket jégen felengedtetünk, pufferban [100 mmól/l trisz.HCl(pH 8), 0,5 mmól/l EDTA és 0,5 mmól/l szacharóz] újra szuszpendáljuk 4°C hőmérsékleten 100 OD₆₅₀/ml üledék/puffer arányban. Lizozimot [10 mg/ml 0,5 mól/l trisz.HCl-ben (pH 8)] adunk hozzá 0,2 mg/ml végső koncentrációban és a szuszpenziót jégen inkubáljuk 15 percen át. Azonos térfogatú jéghideg vizet adunk hozzá és a szuszpenziót jégen inkubáljuk 15 percen át. PMSF-et (50 mmól/l) adunk hozzá 1 mmól/l végső koncentrációban, ezt követi MgCl₂ (1 mól/l) hozzáadása 2 mmól/l végső koncentrációra. A sejtszuszpénziót háromszor átengedjük egy 18. kaliberű tűn, hogy a viszkozitást csökkentsük, majd 20 000 g-nél, 4°C hőmérsékleten centrifugáljuk.

A centrifugálást követően az üledéket újra szuszpendáljuk 20 mmól/l trisz.HCl-t (pH 8), 5 mmól/l EDTA-t és 5 mmól/l β ME-t tartalmazó oldatban olyan térfogatban, amely a centrifugálás előtti térfogattal ekvivalens. A szuszpenziót ultrahangos kezelésnek vetjük alá 60 másodpercig (10 másodperces löketek, köztük 30 másodperccel hűtés mellett), majd 20000 g-nél centrifugáljuk 15 perccig 4°C hőmérsékleten. Az így létrejövő üledék és felülúszó Western folt vizsgálata azt jelzi, hogy az SKBsCD-4 fehérje 70 %-a a felülúszó frakcióban van. A felülúszó frakciót 100000 g-nél

centrifugáljuk 60 percen át. Az így létrejövő üledék és felülúszó Western folt vizsgálata azt jelzi, hogy az SKBsCD-4 fehérje $< 5\%$ -a marad az oldatban. A felülúszó frakciót azonos térfogatú 40 mmól/l-es MES-sel (pH 6,0) higitjuk és 1 ml S Sepharose oszlopra (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) terheljük, amely oszlop előzőleg 2 mmól/l MES-sel (pH 6,0) van kiegyensúlyozva. Az oszlopot 10 ml 20 mmól/l-es MES-sel (pH 6,0) mossuk. A kötött SKBsCD-4-et 20 mmól/l MES-t (pH 6,0) és 0,5 mól/l NaCl-t tartalmazó oldattal eluáljuk, 1 ml-es frakciókat gyűjtve. Az átmenő folyadék, a mosófolyadék és az eluált frakciók Western folt elemzése azt jelzi, hogy az SKBsCD-4 kevesebb, mint 5 %-a kötődik az oszlopra, és a 2. és 3. frakciókban eluálódik.

Az átmenő folyadékot, mosófolyadékot és az eluált frakciókat megvizsgáljuk funkcionális SKBsCD-4-re ELISA versengéssel. Mind az átmenő folyadék, mind a 2. frakció olyan SKBsCD-4-et tartalmaz, amely kötődik OKT4A-hoz.

Immun-kicsapás. Koncentrált tápközeget (100 μ l) higitunk azonos térfogatú kicsapó pufferral [10 mmól/l nátrium-foszfát (pH 7,5), 100 mmól/l NaCl, 0,1 % NP-40, 0,5 % nem zsíros tejpor] és elő-derítjük 3 μ g nyúl IgG-vel 15 percig 4°C hőmérsékleten, ezt követi 30 ml (csomagolt térfogat) "A" fehérje-Sepharose gyöngy hozzáadása (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) 30 percig 4°C hőmérsékleten. Az előderített felülúszókat 5 μ g OKT4, 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F, OKT8 monoklonális antitestekkel (Ortho Pharmaceuticals), egér IgG-vel (Cooper Biomedical, Malvern, Pennsylvania), vagy nyúl anti-egér IgG-vel (Cooper, Biomedical) inkubáljuk 30 percen át 4°C hőmérsékleten. Az OKT4-et, 4A-t, 4C-t, OKT8-at, egér IgG-t és nyúl anti-egér IgG-t kicsapjuk 20 μ l (csomagolt

térfogat) "A" fehérje-Sepharose gyöngyökkel 30 percen át végzett inkubálással. Az OKT4B-t, 4D-t, 4E-t és 4F-et 10 μ g nyúl anti-egér IgG-vel inkubáljuk 4°C hőmérsékleten 30 percen át az "A" fehérje Sepharose gyöngyök hozzáadása előtt. A kicsapás előtt a gyöngyöket kétszer mossuk 200 ml kicsapó pufferral és egyszer 200 ml, NP-40-et és nem zsíros tejport nem tartalmazó kicsapó pufferral. A mosott gyöngyöket 5 percen át forraljuk 20 ml mintapufferban [125 mmól/l trisz-HCl (pH 6,8), 20 % glicerin, 1,4 mól/l β ME (béta-merkapto-etanol)]. A forralást követően a felülúszókat elektroforézisnek vetjük alá 12,5 %-os SDS- poliakrilamid gélen, és Western-folt elemzéssel elemezzük, amint fentebb leírtuk.

Mind a V1J4, mind a V1V2J4 fehérjék immun-kicsapódnak OKT4A-val. Az OMPAV1-gyel kifejezett fehérje OKT4A-val és OKT4D-vel kicsapódik, de OKT4-gyel, OKT4B-vel, OKT4C-vel, OKT4E-vel vagy OKT4F-fel nem. Az OMPAV1V2-vel kifejezett fehérjét az össze OKT4 monoklonális antitest kicsapja az OKT4 kivételével. Ezen kívül ennek a fehérjének az affinitása OKT4C-hez kisebb, mint a többi monoklonális antitesthez.

Versengő ELISA. Mikrotitráló lemezeket (Flow Laboratories, McLean, Virginia) burkolunk egy éjszakán át szobahőmérsékleten 100 μ l/üreg 0,1 mól/l-es $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ oldattal (pH 9,4), amely 150 ng tisztított sCD-4-et is tartalmaz.

Koncentrált tápközeg vagy sejtkivonat alikvotjait (2,5-80 μ l) inkubáljuk 5 ng OKT4A-val 1 mg/ml szarvasmarha szérum albumin (BSA) jelenlétében 100 μ l végső térfogatban egy éjszakán át szobahőmérsékleten. A kevesebb, mint 100 μ l-t tartalmazó mintákat 100 μ l-re higitjuk foszfáttal puffertolt fiziológiás sóoldattal (PBS). Az inkubálás után a lemezekről a folyadékot leöntjük, há-

romszor öblítjük PBS-sel és szárazra veregetjük. Az egyes üregekhez 380 μ l PBS/0,5 % zselatint adunk. A lemezeket 37°C hőmérsékleten inkubáljuk 1 órán át.

A 37°C hőmérsékleten végzett inkubálás után a lemezekről a folyadékot leöntjük, háromszor öblítjük PBS-sel és szárazra veregetjük. A monoklonális antitestet tartalmazó 100 μ l-es inkubált mintákat az előkészített lemezek egyes üregeihez adjuk és 5 órán át inkubálunk 37°C hőmérsékleten.

Az inkubálás után a lemezekről a folyadékot leöntjük, ötször öblítjük PBS-sel és szárazra veregetjük. Az egyes üregekhez 100 μ l, biotinilezett ló/anti-egér IgG-t tartalmazó oldatot adunk. Ezt az antitest-készítményt úgy állítjuk elő, hogy egy csepp ló/anti-egér IgG-t (Vector Labs, Burlingame, Kalifornia) hozzáadunk 10 ml, 1 % lószérumot tartalmazó PBS-hez. A lemezeket 30 percen át inkubáljuk 37°C hőmérsékleten.

Az inkubálást követően a lemezekről a folyadékot leöntjük, ötször öblítjük PBS-sel és szárazra veregetjük. Az egyes üregekhez 100 μ l ABC komplexet adunk (Vector Labs, Burlingame, Kalifornia). A lemezeket ezután szobahőmérsékleten inkubáljuk 30 percig.

A lemezekről a folyadékot ismét leöntjük, PBS-sel ötször öblítjük és szárazra veregetjük. 100 μ l p-nitrofenil-foszfát keveréket [2 mg/ml p-nitrofenil-foszfát (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) 0,1 mól/l nátrium-bikarbonátot (pH 9,4) és 10 mmól/l $MgCl_2$ -t tartalmazó oldatban] adunk az egyes üregekhez. A lemezeket 37°C hőmérsékleten inkubáljuk 30 percen át sötétben. Az inkubálást követően a lemezeket 405 nm abszorbanciánál leolvassuk. Az sCD-4 koncentrációkat egy standard görbéhez viszonyítva határozzuk meg, amely görbét tisztított sCD-4 ismert mennyiségé-

nek OKT4 antitesttel való inkubálásával alakítunk ki. Mindkét fehérjéről (V1J4 és V1V2J4) úgy találjuk, hogy kötődik OKT4A monoklonális antitesthez.

3. példa. Élesztő kifejező vektorok megalkotása

Az élesztőkben sCD-4 fehérjék kifejezéséhez alkalmas kifejező vektorok megalkotására alkalmazott plazmidok az alapvető nagy kópiaszámú élesztő ingázó ("shuttle") vektoron alapulnak [Rosenberg és munkatársai: Genetic Engineering 8, 151(1986)]. Az összes ilyen plazmid tartalmazza az élesztő TRP1 gén [Tsumper és Carbon: Gene 10, 157(1980)] 823 bázispáros EcoRI-PstI fragmentumát, amely egy szelektálható markert szolgáltat; az élesztő 2 mikronos kör alakú plazmidjának [Hartley és Donaldson: Nature 286, 860(1980)] 2,0 kb-s EcoRI-PstI fragmentumát, amely egy replikációs origót szolgáltat élesztőben; a pBR322 egy részét (BamHI-től PvuII-ig kiktatva) [lásd Pouwels, Enger és Valk szerkesztésében a "Cloning Vectors" című szakkönyvet(1985)], amely egy élesztő promotor-terminátor modult szolgáltat a pBR322 HindIII és BamHI helyei közé beiktatva. A promotor vagy a CUP1 431 bázispáros BamHI-RsaI fragmentuma, ahol a CUP1 BamHI-EcoRI fragmentumként pYSK12-ből származik [Butt és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3332(1984); Rosenberg és munkatársai: Genetic Engineering 8, 151(1986); Gorman és munkatársai: Gene 48, 13(1986)], vagy egy 1,1 kb-s TDH3 promotor szekvencia [Holland és munkatársai: J. Biol. Chem. 255, 2596(1980)], amely BamHI-EcoRI fragmentumként a pYSK18 plazmidból származik (Rosenberg és munkatársai, fentebb idézett munka; Gorman és munkatársai, fentebb idézett munka). A terminátor a CYC1 gén 361 bázispáros KpnI-HindIII fragmentuma [Smith és munkatársai: Cell 16, 753(1979)]. A promotor és a CYC1 fragmentum

közé különböző szintetikus szekvenciákat lehet beiktatni, amint ezt az alábbiakban leírjuk.

A pYSK147 és pYSK148 megalkotása. A pYSK137 (CUPI promotor) és pYSK138 (TDH3 promotor) plazmidok egy szintetikus oligonukleotid szekvenciát tartalmaznak a promotor szekvencia 3' végénél levő EcoRI hely és a terminátor 5' végénél levő KpnI hely között. Ez a szintetikus szekvencia tartalmazza az egyedi XhoI, NcoI és SalI restriktációs helyeket a transzlációs terminációs kodontól felfelé mindhárom leolvasó keretben. Ennek a szintetikus kapcsolónak a szekvenciája az alábbi:

GAATTCTCGAGCCATGGCAGTCGACGTAGTTAAGTAGGTACC

A pUCsT4 plazmid egy NcoI-SalI fragmentumát, amely az sCD-4 szekvencia 124.-1257. bázisait tartalmazza, az NcoI-gyel és KpnI-gyel hasított pYSK137-be vagy pYSK138-ba iktatjuk, hogy megkapjuk a pYSK147-et illetve pYSK148-at.

A pYSK154 és pYSK155 megalkotása. Az ubikvitin fúziós gén kifejezésére való vektorok egy, a szintetikus élesztő ubikvitin ^{tartalmaznak} génhez adoptált kazettát [Ecker és munkatársai: J. Biol. Chem. 262, 3524(1987)] a promotor és a CYC1 terminátor között. Az ubikvitin szekvencia azonos azzal, amelyet Ecker és munkatársai publikáltak, azzal a kivétellel, hogy a terminális AflIII-KpnI fragmentumot egy olyan oligonukleotid szekvencia helyettesíti, amely egy NcoI restriktációs helyet tartalmaz a 3' végen. A pYSK147 NcoI-KpnI fragmentumát, amely a kívánt sCD-4 szekvenciát tartalmazza, beiktatjuk e közé az NcoI hely és a CYC1 fragmentum 5' végénél levő KpnI hely közé, így kapjuk meg a pYSK154-et. A pYSK154 egy származékát, amelyben az sCD-4 szekvencia első két amino-terminális aminosavához (ezek a vezető peptid szekvenciák) tartozó szek-

vencia a pYSK154-ben ki van iktatva, alkotjuk meg olyan módon, hogy a pYSK154-et KpnI-gyel elhasítjuk, ezt követi a betöltés E. coli DNS polimeráz I Klenow-fragmentumával (polIK), és egy psT4B BV1DHFR-ből való KpnI-XbaI sCD-4 szekvencia (az sCD-4 145.-1257. bázisai) beiktatása, amely szekvenciát előzőleg polIK-val kezeltünk, hogy a tapadós végeket betöltsük. Ezt a plazmidot pYSK155-nek nevezzük.

pYSK159 és pYSK161 megalkotása. Egy csonkított sCD-4 szekvenciát (124.-603. bázisok) tartalmazó vektorokat alkotunk meg az sCD-4 szekvencia SacI helyénél (602. bázis) egy terminációs kodont tartalmazó szintetikus oligonukleotid beiktatásával. A szintetikus kapcsoló (kétszálú) szekvenciája az alábbi:

CTAAGCGGC

TCGAGATTCGCCGGC

Ezt a szintetikus szekvenciát SacI-gyel és NarI-gyel hasított pYSK148-ba és pYSK154-be iktatjuk, hogy megkapjuk a pYSK159-et illetve pYSK161-et. Így a CD-4 DNS a pYSK159-ben a -9 aminosavtól (alanin) a 151. aminosavig (leucin) terjedő szekvencia (YV1) aminosavaihoz szolgáló kodonokkal bír.

4. példa. sT4 kifejezése élesztőtenyészetekben

Plazmid DNS-t (2-10 µg/ml) alkalmazunk élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) transzformálására standard technikákat alkalmazva [Sherman és munkatársai: *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor (1986)], triptofán prototrófiára szelektálva. Az alkalmazott törzsek az F762 (Mata, trp1Δ1, ura3-52) vagy PEC1-8B (Mata, proAΔ::URA3, ura3-52, trp1-289, his3). Szelektált transzformánsok tenyészeit növesztjük élesztő nitrogén bázison [Yeast Nitrogen Base (YNB), Difco, Detroit, Michigan], amely megfelelő kiegészí-

téseket is (2 % glükóz, 20 μ g/ml uracil, 20 μ g/ml hisztidin) tartalmaz. A CUP1 promotort hasznosító plazmidoknál a tápközeg tartalmaz réz-szulfátot is 100 mikromól/l koncentrációban. A tenyészeteket a késői log fázisban nyerjük ki centrifugálással, majd mossuk és összeüzük. A sejt-lizátumot elemezzük sCD-4-re standard fehérje immun-folt vizsgálattal.

A pYSK147-et és pYSK148-at tartalmazó *S. cerevisiae*-ban az sCD-4 fehérje és az SKBYsCD-4 (-9.-369. aminosavak) alacsony szinten (kevesebb, mint mintegy 0,5 ng/l) fejeződik ki. Az aktivitásról úgy találjuk, hogy a részecske frakcióval társul, de könnyen szolubilizálható nem-ionos detergenssekkel végzett extrahálással. Az SKBYsCD-4 (-9.-369. aminosavak) mennyisége a pYSK154-et tartalmazó *S. cerevisiae* tenyészeiben 2-6 mg/liter között van ($2 \cdot 10^8$ sejt/ml-nél). Ez mintegy ötszörös javulás a pYSK147-tel és pYSK148-cal kifejezett CD-4 fehérje mennyiségéhez viszonyítva, azaz a stabilizáló ubikvitin szekvencia jelenléte nélküli eredményekhez viszonyítva. A szintetizált sCD-4 fehérje becsült mérete minden esetben azonos, jelezve, hogy a fehérje ubikvitin része lehadt az SKBsCD-4-ről. Ezt immunfolt eljárásokkal igazoljuk, élesztő ubikvitin elleni antitestet alkalmazva.

A csonkított sCD-4 fehérje (YV1) kifejeződésének szintje pYSK159-ben és pYSK161-ben hasonló az sCD-4 fehérje kifejeződési szintjéhez, amikor ubikvitin fúziós termékként fejeződik ki. A kimutatott sCD-4 mennyisége hasonló az összes megvizsgált gazdaszervezetben.

A pYSK154-et tartalmazó F762 törzsből származó SKBsCD-4-et tisztítjuk S-Sepharose oszlopon való átengedéssel. 10 mmól/l trisz puffert (pH 6,0) és 1 % Tween 20-at tartalmazó oldatban

készített nyers extraktumot centrifugálunk 30000 g-nél. A felülszót pH 4,0-ra állítjuk be és 50 mmól/l acetát pufferral kiegyensúlyozott S-Sepharose oszlopra terheljük. A mintát 50 mmól/l 0,5 mól/l NaCl-t tartalmazó MES [2-(N-morfolino)-etánszulfonsav(pH 6,0)] pufferral eluáljuk. Az SKBYsCD-4 jelenlétét az eluátumban immunfolt-elemzéssel igazoljuk. Az anyag, amint ezt versengő ELISA alapú vizsgálattal meghatározzuk CHO sejtekből származó tisztított SKBsCD-4-et és OKT4A antitestet hasznosítva, aktív, azt sugallva, hogy az élesztő eredetű SKBsYCD-4 konformációja utánozza az emlősejt (CHO) eredetű anyag konformációját.

5. példa. Streptomyces vektorok megalkotása

Rekombináns DNS manipulációkat alkalmazva a humán CD-4 cDNS szekvencia szegmenseit fuzionáljuk a *S. longisporus* tripszin inhibitor (CTI) gén szignál szekvenciájához és az *S. lividans* β -galaktozidáz (β gal) génhez. Az sCD-4 minigéneket összekapcsoljuk pIJ702 (Katz és munkatársai, fentebb idézett munka) és pIJ351 (Kieser és munkatársai, fentebb idézett munka) *Streptomyces* plazmidokkal, hogy megalkossuk a pLTI:sT4/1, pLTI:sT4/7, pLTI:V1V2 és p β gal:sT4/7 plazmidokat. A vektorokat az alábbi módon alkotjuk meg.

pLTI:sT4/1 megalkotása. A pLTI:sT4/1 plazmidot három másik plazmidból: a pUCsT4-ből, pIJ351-ből és pLTI450-ből alkotjuk meg. A pLTI450 plazmidot az alábbi módon alkotjuk meg.

pLTI450 megalkotása. Az LTI gént tartalmazó, 0,92 kb-s SacI-KpnI fragmentumot beiktatjuk pUC18-ba, amelyet előzőleg SacI-gyel és KpnI-gyel emésztettünk. Ezt a plazmidot, a pLTI520-at, részlegesen emésztjük EagI-gyel és teljes mértékben emésztjük SallI-gyel, majd egy szintetikus (kétszálú) kapcsolóhoz ligáljuk, amely EagI

és SalI végekkel bír.

5'-GGCCGCCGCCCCCGCG

CGGCGGGGGCGCAGCT-5'

Az ebből a ligálásból kapott plazmidokat átvizsgáljuk a szintetikus kapcsoló beiktatására az EagI helybe mintegy 0,5 kb-vel a SacI helytől elhelyezve. Ezt az EagI helyet a 86. bázispárnál helyezzük el az LTI gén 5' végéhez viszonyítva. Az így létrejövő plazmid tartalmazza az LTI promotort és a szignál peptidhez, valamint a szignál peptid hasítási helyhez tartozó kódoló szekvenciát. Mind az EagI, mind a SalI helyek alkalmazhatók az sCD-4 minigének fúziójához az LTI szignál-szekvenciához.

A pLTI:sT4/1 megalkotása. Abból a célból, hogy a pLTI:sT4/1 plazmidot megalkossuk, az sCD-4 kódoló szekvenciát izoláljuk egy mintegy 1,1 kb-s BbvI-PstI fragmentumban a pUCsT4-ből. Ez a fragmentum tartalmazza a humán CD-4 cDNS szekvencia 149.-1257. bázispárjait. A pUCsT4 plazmidot BbvI-gyel emésztjük, majd reverz transzkriptázzal kezeljük, hogy az 5' túlnyúló végeket betöltsük. A DNS-t azután PstI-gyel emésztjük. Ezt az 1,1 kb-s BbvI(RT)-PstI fragmentumot, amely az SKBsCD-4-et kódolja, pLTI450-be ligáljuk, amelyet előzőleg SalI-gyel és reverz transzkriptázzal kezeltünk, majd PstI-gyel emésztettünk. Ez a ligálás eredményezi a pLTI450sT4/1 plazmidot. A végső lépés a pLTI:sT4/1 megalkotásában igényli a Streptomyces replikációs funkció beiktatását pLTI450sT4/1-be. Ezt úgy hajtjuk végre, hogy pIJ351-et (Kieser és munkatársai, fentebb idézett munka) emésztünk PstI-gyel és ezt PstI-gyel emésztett pLTI450sT4/1-be ligáljuk.

pLTI:sT4/7 megalkotása. A pLTI:sT4/7 plazmidot három másik plazmidból alkotjuk meg: a pUCsT4, pIJ702 és pLTI450 plazmidokból.

Abból a célból, hogy a pLTI:sT4/7 plazmidot megalkossuk, az sCD-4 kódoló szekvenciát izoláljuk egy mintegy 1,1 kb-s NcoI-PstI fragmentumon pUCsT4-ből. Ez a fragmentum a humán CD-4 cDNS szekvencia 124.-1257. bázispárjait tartalmazza. Ezeket a bázispárokat egy ATG iniciációs kodon és egy TAA terminációs kodon közé helyezzük, amint ezt korábban az 1. példában leírtuk. Az iniciációs kodon az NcoI felismerő szekvencia részét képezi. Az sCD-4 kódoló szekvencia, amelyet ez a fragmentum tartalmaz, 9 aminosavat tartalmaz a CD-4 vezető szekvenciájából. A pUCsT4-et NcoI-gyel és reverz transzkriptázzal kezeljük, ezt követi az emésztés PstI-gyel. Ezt a fragmentumot azután pLTI450-nel ligáljuk, amelyet előzőleg HincII-vel és PstI-gyel kezeltünk. Ez a ligálás eredményezi a pLTI450sT4/7 plazmidot. A Streptomyces replikont a pIJ702 plazmid (Katz és munkatársai, fentebb idézett munka) szolgáltatja. Ezt a pLTI450sT4/7-be iktatjuk a mindkét plazmidon meglevő egyedi PstI helyek révén, így alkotjuk meg a pLTI:sT4/7 plazmidot.

A pLTI:V1V2 plazmid megalkotása. A pLTI:V1V2 plazmidot a psT4.184, pLTI450 és pIJ351 plazmidokból alkotjuk meg. Egy 0,54 kb-s XbaI-EcoRI fragmentumot izolálunk psT4.184-ből. Ezt a fragmentumot BbvI-gyel és reverz transzkriptázzal kezeljük. A BbvI vég megfelel a humán CD-4 149. bázispárjának. Ezt a tompa végű fragmentumot azután pLTI450-hez ligáljuk, amelyet előzőleg SalI-gyel és reverz transzkriptázzal kezeltünk, hogy megalkossuk a pLTI450V1V2-t. A Streptomyces replikációs funkciót a pIJ351 szolgáltatja. Ezt a plazmidot a pLTI450V1V2-be klónozzuk a mind a pIJ351-en, mind a pLTI450V1V2-n meglevő egyedi PstI hely révén. Az így létrejövő plazmid a pLTI:V1V2.

A p β galsT4/7 megalkotása. A p β galsT4/7-et a pUCsT4, pIJ702

és p3SSxMCP plazmidokból alkotjuk meg. A p3SSxMCP egy pUC9 [Vieira és Messing: Gene 19, 259(1987)] származék, amely tartalmazza a β -galaktozidáz promotort és szignál szekvenciát. A szignál peptid hasítási helyet kódoló szekvenciától 26 bázispárral lefelé van egy XmnI hely [Eckhardt és munkatársai: J. Bacteriol. 169, 4249 (1987)]. Ebbe a helybe beiktatva van egy szintetikus kapcsoló, amely tartalmaz egy BamHI felismerő szekvenciát (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts), hogy kialakuljon a p3SSx10 plazmid. Ezt a vektort kezeljük BamHI-gyel és reverz transzkriptázzal, majd XhoI-gyel emésztjük. Ehhez a vektorhoz ligálva van egy olyan fragmentum, amelynek NcoI vége van reverz transzkriptázzal kezelve, hogy egy tompa véget és egy SalI véget kapjunk. A betöltött BamHI hely ligálása a betöltött végű NcoI hellyel helyreállítja mind a BamHI, mind az NcoI helyeket. Az így létrejövő plazmid a p3SSxMCP. A pUCsT4-et XbaI-gyel és reverz transzkriptázzal kezeljük, amelyet NcoI emésztés követ. Ezt az 1,1 kb-s NcoI-XbaI(RT) fragmentumot azután beiktatjuk a p3SSxMCP-be, amelyet előzőleg SacI-gyel és T4 DNS polimerázzal kezeltünk, amelyet NcoI emésztés követ. A Streptomyces replikációs funkciót a pIJ702 szolgáltatja, amelyet a p3SSxsT4-be iktatunk a mindkét plazmidon jelen levő egyedi BglII hely révén. Az így létrejövő plazmid p β galST4/7.

6. példa. sCD-4 minigének kifejezése Streptomycesben

A pLTI:sT4/1, pLTI:sT4/7, pLTI:V1V2 és p β gal:sT4/7 plazmidokat S. lividans 1326-ba ^{transzformáljuk} (Bibb és munkatársai, fentebb idézett munka). Ezen kívül a pLTI:sT4/1-et, pLTI:sT4/7-et, pLTI:V1V2-t bevezetjük S. coelicolor M124-be [Hopwood és munkatársai: "Genetic Manipulation of Streptomyces - A Laboratory Manual", kiadó: Crowe F. és fiai, Norwich, Anglia (1985)], és a S. longi-

sporus fehér származékába (ATCC 23931). Az összes plazmidot különböző gazdaszervezetekbe vezetjük be azt a munkamenetet alkalmazva, amelyet korábban Thompson és munkatársai írtak le [J. Bacteriol. 151, 668(1982)]. A transzformánsokat a transzformációs lemezek felülrétegezésével szelektáljuk 3 ml, 100 μ g/ml tiosztrep-tont tartalmazó 0,4 %-os agarral.

Azokat a klónokat, amelyek CD-4 minigéneket fejeznek ki, tiosztrepton rezisztens transzformánsok 48-72 órán át végzett szaporításával azonosítjuk 10 ml triptikáz szója tápközeget és 5 μ g/ml tiosztrep-tont tartalmazó tápközegben. A tenyészet felülúszókat és a sejtlizátumokat 12 %-os poliakrilamid (30:0,8 akrilamid:bisz-akrilamid)-1 % nátrium-dodecil-szulfát gélen szeparáljuk, majd nitrocellulózra visszük át [Towbin és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350(1979)]. A nitrocellulóz szűrőt átvizsgáljuk a nyúl sCD-4 antiszérumot alkalmazva, amint ezt Deen és munkatársai leírták (fentebb idézett munka).

A pLTI:sT4/1, pLTI:sT4/7 és p β gal:sT4 *S. lividans* transzformánsok mind egy mintegy 45 kD-s fehérjét fejeznek ki, amely az ezekkel a plazmidokkal kódolt sCD-4 fehérje előre várt mérete. Hasonlóképpen a pLTI:V1V2 *S. lividans* transzformánsok mintegy 20 kD-s fehérjét fejeznek ki, amely a V1V2 fehérje előre várt mérete. Az SKBsCD-4 és V1V2J4 kifejezést vizsgáljuk *S. coelicolor*-ban, *S. albus*-ban, és *S. longisporus*-ban is. A *S. lividans*-hoz hasonlóan a 45 kD-s (a pLTI:sT4/1 és pLTI:sT4/7 transzformánsok) és 20 kD-s (a pLTI:V1V2 transzformánsok) fehérjéket fejezik ki a többi *Streptomyces* transzformánsok is.

A *S. lividans* tenyészet felülúszóban és sejtlizátumban jelen levő SKBsCD-4 ezt követő mennyiségi vizsgálata 1-5 mg/l szintet

mutat. A V1V2J4 2-10 mg/l-ben van jelen mind a tenyészet felülúszóban, mind a sejtlizátumban. 1 mg/l-nél kevesebb fejeződik ki p_{gal}:sT4 S. lividans transzformánsok révén.

pLTI:sT4/7 S. lividans sejtvonalat alkalmazva vizsgáljuk az SKBsCD-4 kifejezést 12 literes fermentorban is. A kis léptékű kifejezési tanulmányokhoz hasonlóan a sejteket triptikáz szója tápközeg +5 µg/ml tiosztrepton tápközegben növesztjük. Mind a tenyészet felülúszókat, mind a sejt-lizátumokat elemezzük SKBsCD-4 kifejeződésre 7,5; 24; 31,5; 54; és 72 órával az inokulálás után. A maximális térfogati kifejeződési szint 60 mg/l és 24 órával az inokulálás után érjük el. Az SKBsCD-4 azonos mértékben oszlik meg a tenyészet felülúszó és az ép sejtek között.

V1V2J4-et és SKBsCD-4-et tartalmazó részben tisztított felülúszókról mutatjuk ki versengő ELISA-val, hogy kötődnek OKT4A-hoz, jelezve, hogy ezek a Streptomyces-eredetű fehérjék HIV kötő fehérjék.

A V1J4-et, amely HIV kötő fehérje, hasonlóképpen ligáljuk az LTI promotorhoz és Western-folt elemzéssel kimutatjuk, hogy kifejeződik S. lividans-ban.

A fenti példák azt demonstrálják, hogy a CD-4-ből származó HIV kötő fehérjék, pl. az SKBsCD-4, SKBYsCD-4, V1J4, V1V2J4 és YV1, amelyek a jelen találmány szerinti rekombináns organizmusok által fejeződnek és választódnak ki, olyan HIV kötő fehérjék, amelyek az sCD-4 HIV kötő funkciójával bírnak. Részletesebben, ezek az SKBsCD-4 V1 területének HIV kötő tartományával bírnak.

A fenti leírás és kiviteli példák teljes mértékben ismertetik a találmányt, beleértve ennek előnyös kiviteli módjait.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

- 1.) Eljárás HIV kötő fehérje előállítására azzal jellemezve, hogy olyan vektorral transzformált E. coli sejteket, amelyek a HIV kötő fehérjéjét kódoló szekvenciát tartalmazzák egy szabályozó elemmel operatíván összekapcsolva, tenyésztünk és a HIV kötő fehérjét ebből összegyűjtjük.
- 2.) Eljárás HIV kötő fehérje előállítására azzal jellemezve, hogy olyan vektorral transzformált ^{Streptomyces} sejteket, amelyek a HIV kötő fehérjéjét kódoló szekvenciát tartalmazzák egy szabályozó elemmel operatíván összekapcsolva, tenyésztünk és a HIV kötő fehérjét ebből összegyűjtjük.
- 3.) Eljárás HIV kötő fehérje előállítására azzal jellemezve, hogy olyan vektorral transzformált élesztősejteket, amelyek a HIV kötő fehérjéjét kódoló szekvenciát tartalmazzák egy szabályozó elemmel operatíván összekapcsolva, tenyésztünk és a HIV kötő fehérjét ebből összegyűjtjük.
- 4.) HIV kötő fehérje azzal jellemezve, hogy ez sCD-4 fehérje vagy származéka, amely egy sCD-4 fehérje HIV kötő funkciójával rendelkezik és amelyet rekombináns E. coliban termelünk gyógyszerként való felhasználásra.
- 5.) HIV kötő fehérje azzal jellemezve, hogy ez sCD-4 fehérje vagy származéka, amely egy sCD-4 fehérje HIV kötő funkciójával rendelkezik és amelyet rekombináns élesztőben termelünk gyógyszerként való felhasználásra.
- 6.) HIV kötő fehérje azzal jellemezve, hogy ez sCD-4 fehérje vagy származéka, amely egy sCD-4 fehérje HIV kötő funkciójával rendelkezik és amelyet rekombináns Streptomycesben termelünk gyógyszerként való felhasználásra.