

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE**

(10) FI 890874 A7

**(12) JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **890874**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C12N 15/63
C12P 21/00**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **23.02.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **23.02.1989**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **25.08.1989**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

24.02.1988 US 160463

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Smithkline Beckman Corporation, One Franklin Plaza, Philadelphia, PA 19103, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

**1 •Arthos, James, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Brawner, Mary Ellen, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •Clark, Philip Ernest, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •Deen, Keith Charles, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 •Fornwald, James Allan, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
6 •Gorman, Jessica Angell, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
7 •Sathe, Ganesh Madhusudan, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
8 •Sweet, Raymond W., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
9 •Taylor, Dean Perron, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

**HIV-sitoutumisproteiinien ekspressio
Expresssion av HIV-bindningsproteiner**

HIV-sitoutuvien proteiinien ilmentyminen

Tämä keksintö liittyy HIV-sitoutuvien proteiinien, jotka on johdettu liukoisista CD-4 (sCD-4)-proteiineista, tuotantoon. Tarkemmin sanottuna se liittyy HIV-sitoutuvien proteiinien ilmentymiseen *E. coli*ssa, *Streptomyces*issä ja hiivassa tarkoitettujen vektoreiden valmistukseen.

Ihmisen T-solun glykoproteiini, CD-4 (joskus aikaisemmin nimitetty "T4":ksi), on yksi useista ei-polymorfisista T-lymfosyytin pintareseptoriproteiineista, joiden on havaittu liittyvän tehokkaan T-solun ja kohdesolun välisen vuorovaikutuksen syntymiseen.

Ihmisen CD-4 (T-4)-reseptorin cDNA-sekvenssi tunnetaan (Maddon ym., *Cell* 42:93 (1985)). Täydellinen CD-4-preproteiinisekvenssi on 458:n aminohapon pituinen käsittäen oletetun 23 aminohapon pituisen erityksen johtosekvenssin, 372:n aminohapon pituisen pinta(V₁-V₄)-, 23:n aminohapon pituisen välimembraani- ja 40 aminohapon pituisen sytoplasma-alueen. Pinta-alueessa erottuu neljä aluetta, jotka ovat osittain, 20-30-%:sesti, homologisia immunoglobuliinin muuttuja-alueelle (V) ja liittymäalueelle (J). Neljä viidestä pinta-alueen introni-eksoni-raja-alueista ovat lähellä näiden V-J-alueiden liittymäkohtia.

Ihmisen immuunikatovirus (HIV), joka on hankitun immuunikaato-oireyhtymän (AIDS) etiologinen aiheuttaja, kiinnittyy huomattavan voimakkaasti CD-4-lymfosyytteihin. Viruksen kiinnittymistä CD-4:ään välittää viruskuoren gp120-glykoproteiini. CD-4-proteiini voidaan saostaa hajotetuista HIV-infektoituneista soluista anti-env-vasta-aineella ja, toisin päin, gp120 voidaan saostaa anti-CD-4 - monoklonaalisella vasta-aineella, mikä osoittaa, että viruksen sitoutumista CD-4:ään välittää viruskuoren gp120-glykoproteiini.

Hiljattain useat tutkijat ovat julkaisseet löytöjensä, jotka liittyvät CD-4:n ja AIDS-infektion väliseen vuorovaikutuk-

seen, jossa on käytetty nisäkkäiden solusysteemeissä ilmentyvää CD4-johdannaisista.

Deen ym., Nature 331:82 (1988) tekevät selkoa sCD-4:n eristämisestä ja ilmentymisestä useissa solu ympäristöissä. sCD-4 on liukoinen johdannainen CD-4:stä, josta puuttuvat CD-4:n välimembraani- ja sytoplasma-alueet. Käyttämällä dfhr-vajaata Kiinan hamsterin munasolulinjaa (CHO) he ovat osoittaneet ilmentyvän sCD-4:n säilyttävän CD-4:n rakenteelliset ja biologiset ominaisuudet solupinnalla, sitoutuvan HIV - gp 110 -kuoriproteiiniin ja voivan estää CD-4⁺-lymfosyyttien sitoutumista.

Trauneker ym., Nature 331:84 (1988) selostavat sCD-4:n käyttöä estämään viruksen kiinnittymisen kohdesoluun. Esi-tetty aineisto osoittaa HIV-infektion estymisen in vitro, kun käytetään sCD-4:n rekombinanttimuotoa.

Fisher ym., Nature 331:76 (1988) selostavat sCD-4:n puhdistusta (CHO):sta ja sen käyttöä sekä virusreplikaation että viruksella indusoitujen solujen yhdistymisen mahdollisena estäjänä.

Hussey ym., Nature 331:78 (1988) selostavat baculoviruksen ilmentymissysteemin käyttöä tuottamaan sCD-4:ää, jonka havaittiin estävän viruksella indusoitujen solujen yhdistymistä (solusitoksen muodostuminen) ja HIV-infektiota sitoutumalla gp120:tä ilmentäviin soluihin. Oli myös osoitettu, että sCD-4-proteiini ei näytä estävän II-luokalle spesifisiä T-soluvuorovaikutussuhteita.

Smith ym., Science 238:1704 (1987) selostavat myös CHO-nisäkässolusysteemin käyttöä sCD-4:n tuottamiseen. He selostavat CHO-soluissa tapahtuvan sCD-4-proteiinin tuottamista, jonka proteiinin voidaan osoittaa sitoutuvan HIV - gp 120-kuoriproteiiniin ja neutraloivan HIV-1:n infektiivisyyttä in vitro. Aineisto osoittaa, että sCD-4:ää voidaan käyttää AIDS-infektion terapeuttiseen hoitoon.

Edelleen kuitenkin on olemassa bakteeri- ja alempien eukaryoottisysteemien tarvetta s-CD-4-proteiinien ilmentämiseen.

Tämä keksintö perustuu siihen havaintoon, että CD-4-proteiinin HIV-sitoutuminen voi ilmentyä *E. coli*ssa ja siihen havaintoon, että sellainen HIV-sitoutuva proteiini voi erittyä kasvatusalustaan. Erityisesti tämän vuoksi tämä keksintö on *E. coli*n ilmentämisvektori, joka käsittää sääätelyalueeseen toimivasti liitetyn HIV-sitoutuvan proteiinin.

Tämä keksintö perustuu myös siihen havaintoon, että CD-4-proteiinin HIV-sitoutuminen voi ilmentyä *Streptomyces*issä ja siihen havaintoon, että sellainen HIV-sitoutuva proteiini voi erittyä kasvatusalustaan. Erityisesti tämän vuoksi tämä keksintö on *Streptomyces*in ilmentämisvektori, joka käsittää sääätelyalueeseen toimivasti liitetyn HIV-sitoutuvan proteiinin.

Tämä keksintö perustuu myös siihen havaintoon, että CD-4-proteiinin HIV-sitoutuminen voi ilmentyä hiivassa ja siihen havaintoon, että sellainen HIV-sitoutuva proteiini voi erittyä kasvatusalustaan. Erityisesti tämän vuoksi tämä keksintö on hiivan ilmentämisvektori, joka käsittää sääätelyalueeseen toimivasti liitetyn HIV-sitoutuvan proteiinin.

Tämä keksintö perustuu myös siihen havaintoon, että OMPA-johtosekvenssiä voidaan käyttää heterologisen proteiinin uloskuljetukseen *E. coli*sta. Erityisesti tämän vuoksi tämä keksintö on *E. coli*n ilmentämisvektori uloskuljetettujen proteiinien ilmentämiseksi *E. coli*ssa käsittäen DNA:ta koodaavan sekvenssin, joka on toimivasti liitetty sääätelyalueeseen ja joka DNA:ta koodaava sekvenssi koodaa proteiini X-Y:tä, jossa X on OMPA-johtosekvenssi ja Y on heterologinen proteiini.

Tämän keksinnön mukaisesti HIV-sitoutuvat proteiinit, jotka on johdettu CD-4-reseptorista, ilmentyvät hyödyllisessä määrin käytettäväksi hoitavina tai suojaavina tekijöinä estämään HIV-alkuinfektiota ja estämään HIV:n solusta soluun

kulkeutumista, mitä seuraa isännän infektoituminen; käytettäväksi HIV-lymfosyyttisitoutumisen estäjien erottelijoihin; tai muihin tarkoituksiin, kuten jäljempänä kuvattuihin. Kaikilla proteiineilla on HIV:iin sitoutumisominaisuus, joka on peräisin CD-4:ltä. Parhaita esimerkkejä sellaisista proteiineista ovat sCD-4-proteiinit ja niiden johdannaiset. sCD-4-proteiinit ovat CD-4:n johdannaisia, joilta puuttuu CD-4:n välimembraani- ja sytoplasma-alueet. Esimerkkejä sCD-4-proteiineista on kuvattu Naturen numeron 331:76-88 (1988) erillisissä artikkeleissa, jotka Deen ym., Trauneker ym., Fisher ym. ja Hussey ym. ovat laatineet ja Smithin ym. artikkelissa, Science 238:1704 (1987).

Tässä esimerkkinä esitetyn sCD-4-proteiinin, joka on nimetty SKBsCD-4:ksi, ovat esittäneet Deen ym., mainittu edellä, sivulla 83. Se on esitetty seuraavassa aminohappo- ja nukleotidisekvenssissä. Sekvenssissä erottuu 5'-transloimaton alue ja johtosekvenssi, joka on johdettu Maddonin ym., Cell 42:93 (1985) esittämästä CD-4-cDNA:sta. Valmiin SKBsCD-4:n, sellaisena kuin se CHO-soluissa ilmentyy ja niistä erittyy, ensimmäinen aminohappo on lysiini, jota emäsparit 151-153 koodaavat. Välimembraanialue poistettiin avaamalla cDNA HpaII:lla emäspari 1252:n kohdalta ja liittämällä siihen liittäjämolekyyli, joka liitti paikalleen emäsparit 1253-1257 ja joka liitti päatekodonin, TAA, C-pään valiinin jälkeen. Kuten Maddon ym. ovat esittäneet, valmiin CD-4:n kolme ensimmäistä aminohappoa ovat glutamiini (tässä esitetty aminohappona (-)2) - glysiini (tässä esitetty aminohappona (-)1) - asparagiini (tässä esitetty aminohappona (+)1). Muuten seuraavassa esitetty sekvenssi on sama kuin Maddonin ym. esittämä.

5

10 30 50
CAAGCCCAGAGCCCTGCCATTTCTGTGGGCTCAGGTCCCTACTGCTCAGCCCCTTCCTCC

70 90 110
CTCGGCAAGGCCACAATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAA
MetAsnArgGlyValProPheArgHisLeuLeuLeuValLeuGln

130 150 170
CTGGCGCTCCTCCCAGCAGCCACTCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAGGGGAT
LeuAlaLeuLeuProAlaAlaThrGlnGlyLysLysValValLeuGlyLysLysGlyAsp
-9 -1 +1

190 210 230
ACAGTGGAAGTACCTGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAAAC
ThrValGluLeuThrCysThrAlaSerGlnLysLysSerIleGlnPheHisTrpLysAsn

250 270 290
TCCAACCAGATAAAGATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTCTTAATAAGGTCCATCCAAG
SerAsnGlnIleLysIleLeuGlyAsnGlnGlySerPheLeuThrLysGlyProSerLys

310 330 350
CTGAATGATCGCGCTGACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTCCCCCTGATC
LeuAsnAspArgAlaAspSerArgArgSerLeuTrpAspGlnGlyAsnPheProLeuIle

370 390 410
ATCAAGAATCTTAAGATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGGACCAGAAG
IleLysAsnLeuLysIleGluAspSerAspThrTyrIleCysGluValGluAspGlnLys

430 450 470
GAGGAGGTGCAATTGCTAGTGTTTCGGATTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTTCAG
GluGluValGlnLeuLeuValPheGlyLeuThrAlaAsnSerAspThrHisLeuLeuGln
104

490 510 530
GGGCAGAGCCTGACCCTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCCTCAGTGCAATGT
GlyGlnSerLeuThrLeuThrLeuGluSerProProGlySerSerProSerValGlnCys

550 570 590
AGGAGTCCAAGGGGTAAAAACATACAGGGGGGAAGACCCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAG
ArgSerProArgGlyLysAsnIleGlnGlyGlyLysThrLeuSerValSerGlnLeuGlu

610 630 650
CTCCAGGATAGTGGCACCTGGACATGCCTGTCTTGCAGAACCAGAAGAAGGTGGAGTTC
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
AAGAAGCTCCCGCTCCACCTCACCTGCCCCAGGCCTTGCCTCAGTATGCTGGCTCTGGA
LysLysLeuProLeuHisLeuThrLeuProGlnAlaLeuProGlnTyrAlaGlySerGly

970 990 1010
AACCTCACCTGGCCCTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAAcCTGGTG
AsnLeuThrLeuAlaLeuGluAlaLysThrGlyLysLeuHisGlnGluValAsnLeuVal

1030 1050 1070
GTGATGAGAGCCACTCAGCTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGGACCCACCTCC
ValMetArgAlaThrGlnLeuGlnLysAsnLeuThrCysGluValTrpGlyProThrSer

1090 1110 1130
CCTAAGCTGATGCTGAGCTTGAAACTGGAGAACAAGGAGGCAAAGGTCTCGAAGCGGGAG
ProLysLeuMetLeuSerLeuLysLeuGluAsnLysGluAlaLysValSerLysArgGlu

1150 1170 1190
AAGGCGGTGTGGGTGCTGAACCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAgTGAActCG
LysAlaValTrpValLeuAsnProGluAlaGlyMetTrpGlnCysLeuLeuSerAspSer

1210 1230 1250
GGACAGGTCCTGCTGGAATCCAACATCAAGGTTCTGCCCACATGGTCCACCCCGGtgtaa
GlyGlnValLeuLeuGluSerAsnIleLysValLeuProThrTrpSerThrProValEnd
351 369

1270
tggcgcctctaga

Lyhennetyt sCD-4-sekvenssit ja niiden johdannaiset, jotka olennaisilta osiltaan säilyttävät sCD-4:n HIV-sitoutumiskykynsä, voivat myös ilmentyä tämän keksinnön mukaisesti. Parhaita tällaisten pätkien joukossa ovat proteiinit tai polypeptidit, jotka sisältävät V1- ja V2-alueiden HIV-sitoutumisalueen, joka käsittää osapuilleen aminohapot 1-182. Yksi nimenomainen esimerkki edellä esitetystä sekvenssistä on proteiini, jota tässä kutsutaan V1J4:ksi, joka käsittää aminohapot (-)2-104 (N-glutamiini-glysiini-lysiini- kautta -alaniini-asparagiini-seriini-C), liitettynä aminohappoihin 351-369 (-glysiini-glutamiini-valiini- kautta -treoniini-proliini-valiini-C). Toinen esimerkki on proteiini, jota tässä kutsutaan V1V2J4:ksi, joka käsittää aminohapot (-)2-183 (N-glutamiini-glysiini-lysiini- kautta -lysiini-alaniini-seriini-C) liitettynä aminohappoihin 351-369. Kolmas esimerkki on proteiini, jota tässä kutsutaan YV1:ksi, joka käsittää aminohapot (-)9-151 (N-alaniini-leusiini-leusiini- kautta -leusiini-glutamiinihappo-leusiini-C). Neljäs esimerkki on proteiini, jota tässä kutsutaan SKBYsCD-4, joka käsittää aminohapot (-)9-369. Jokaisella näistä HIV-sitoutuvista proteiineista, jotka perustuvat esim. OKT4A-sitoutumiseen, on sCD-4-proteiinien HIV-sitoutumiskyky, erityisesti SKBsCD-4:n, ja, nimenomaan, sisältävät sCD-4-proteiinien V1- ja V2-alueiden HIV-sitoutumisalueen, erityisesti SKBsCD-4:n.

Tässä esimerkkeinä esitettyjen proteiinien lisäksi alaan tavanomaisesti perehtynyt voi helposti valmistaa muiden sCD-4-johdannaisten DNA:ta koodaavia sekvenssejä. Sellaiset johdannaiset säilyttävät olennaisilta osiltaan sCD-4-proteiinien HIV-sitoutumiskykynsä, toisin sanoen, proteiinin sitoutuminen HIV-env-proteiiniin, gp120:een, ei merkitsevän haitallisessa määrin esty. Esimerkiksi voidaan valmistaa johdannainen, joka käsittää vain V1-alueen, esim. osapuilleen aminohapot 1-94 tai johdannainen, joka käsittää vain osan CD-4:n V1-alueesta. Voidaan myös valmistaa tässä erityisesti esimerkkeinä esitettyjen proteiinien johdannaisia, kuten johdannaisia, jotka eroavat vain yhden tai muutaman aminohappopoiston, -lisäyksen tai -korvauksen suhteen.

Vaihtoehtoisesti voidaan valmistaa hybridiproteiini, esim. translaatioyhdistymä, sCD-4-proteiinin ja kantajaproteiinin, toisen antigeenin tai toisen sCD-4-proteiinin väliin polysCD-4-molekyylin valmistamiseksi. Vielä toisessa vaihtoehdossa voidaan sCD-4-deleetiomutantti synteettisesti konjugoida kantajaproteiiniin.

sCD-4-molekyylien kiinnittymistä HIV:iin voidaan havainnollistaa kilpailevalla kiinnittymismenetelmällä, jossa käytetään sCD-4-molekyyliä, jonka sitoutuminen on tunnettu tai käyttämällä vasta-aineita, jotka tunnistavat CD-4-reseptorin, kuten OKT-4 ja OKT4A. Hyödylliset keksinnön mukaiset sCD-4-proteiinit saostetaan valikoidusti OKT4A:ta sisältävästä alustasta niin kuin jäljempänä olevissa esimerkeissä on esitetty. CD-4, fragmentit ja johdannaiset voidaan valmistaa kemiallisesti, ilmentymisen jälkeen, tai geneettisesti, ennen ilmentymistä, muuttamalla johtosekvenssin ja/tai solun ulkopuolisen alueen koodaussekvenssiä.

sCD-4:n DNA:ta koodaava sekvenssi tai siitä johdettu HIV-sitoutuva proteiini voidaan valmistaa, esimerkiksi syntetisoidulla geenillä käyttämällä tunnettua DNA-sekvenssiä, sekvenssiin perustuvilla tunnetuilla kloonaustekniikoilla ja eristämällä uudestaan paikallistettu proteiini, toisin sanoen, transfektoimalla cDNA-kloonit CD-4:ää ilmentävistä solulinjoista ja tunnistamalla proteiinia vastaan kohdistetuilla vasta-aineilla (Katso Maddon ym., supra).

cDNA-kloonit, joilla on tietyn sCD-4-proteiinin koodaussekvenssi, voidaan identifioida käyttämällä oligonukleotidi-hybridisaatiokoettimia. Koettimet voidaan suunnitella proteiinin tietyn sekvenssin pohjalta. Sen jälkeen kun kiinnostuksen kohteena olevan koodaussekvenssin sisältämä kloni on identifioitu, proteiinia koodaava sekvenssi voidaan avata restriktioendonukleaaaseja käyttäen ja siirtää kloonauksella ja/tai ilmentämisvektoreihin. Ilmentämisvektorissa sCD-4-proteiinin koodaussekvenssi on toimivasti liitetty säätelytoimintoihin, jotka ovat tarpeellisia tai toivottavia trans-

kriptiolle, translaatiolle ja koodaussekvenssin muokkaamiselle.

Kun esillä oleva keksintö toteutetaan *E. coli*ssa, DNA:ta koodaava sekvenssi, joka koodaa HIV-sitoutuvaa proteiiniaan, esim. SCD-4:ää tai sen johdannaisia, on toimivasti liitetty DNA-vektorin säätelyosaan, joka vektori on tarkoitettu *E. coli*n transformoimiseen. Saatavilla on lukuisia gram-negatiivisten bakteerien ilmentämisvektoreita, jotka sisältävät kyseiset säätelyosat. Säätelyosa käsittää promoottorin, joka vaikuttaa RNA-polymeraasin sitoutumiseen ja transkriptioon. Säädeltävät, toisin sanoen indusoitavat tai repressoitavat promoottorit ovat suositeltavimpia. Saatavilla on lukuisia hyödyllisiä promoottoreita heterologisten polypeptidien ilmentämiseen *E. coli*ssa. Näihin sisältyvät *trp*-promoottori ja *lambda*-PL-promoottori. Katso esim. US-patentti 4 578 355; Courtney ym., *Nature* 313:149 (1985). Mieluimmin säätelyosa käsittää johtosekvenssin HIV-sitoutuvan proteiinin kuljettamiseksi solukalvoon tai sen läpi, koska tämän keksinnön yhteydessä on havaittu, että HIV-sitoutuva proteiini voidaan erittää ulos. Johtosekvenssi, jonka on osoitettu kuljettavan proteiinia *E. coli*n ulkokalvolle, on *Bacillus licheniformis*en penisillinaasigeeni. Katso Sarvas ym., *J. Bacteriol.* 155:657 (1983).

Erityisenä esimerkkinä tässä esitetään ulkokalvon polysakkaridi-A:n johtosekvenssi, jota tässä nimitetään OMPA-johtosekvenssiksi tai signaalisekvenssiksi. Katso Movva ym., *J. Molec. Biol.* 143:317 (1980). OMPA-koodaussekvenssi käsittää johtosekvenssin, joka on hyödyllinen HIV-sitoutuvan proteiinin eritykseen kasvatusalustaan. Nyt on havaittu, että OMPA-johtosekvenssiä voidaan käyttää useiden pienimolekyylisten proteiinien tai polypeptidien täydelliseen eritykseen kasvatusalustaan. Esimerkiksi OMPA-signaalisekvenssiä on käytetty tuottamaan suuria määriä (esim. enemmän kuin 1 - n. 10 mg/l) aktiivista ihmisen kasvutekijä-alfaa (TGF-alfa), kasvaimen nekroositekijää (TNF) ja interleukiini-1-beetaa (IL-1-beeta), SKBsCD-4:n, V1J4:n ja V1V2J4:n lisäksi.

OMPA-signaalisekvenssi käsittää olennaisilta osiltaan seuraavat 21 aminohappoa: N-met-lys-lys-thr-ala-ile-ala-ile-ala-val-ala-leu-ala-ala-gly-phe-ala-thr-val-ala-gln-ala-C. Sellaisen johtosekvenssin DNA:ta koodaava sekvenssi voidaan syntetoida, mieluiten niin, että yksi tai useampi restriktiokohta liitetään C-pään viimeisen aminohapon viereen toivotun DNA:ta koodaavan sekvenssin liittämiseksi ja niin, että terminaattori liitetään alaspäin toivotusta koodaussekvenssistä. Asiaa valaiseva synteettinen koodaussekvenssi on esitetty jäljempänä esimerkeissä.

HIV-sitoutuvan proteiinin minigeenin, toisin sanoen koodaussekvenssin, joka on toimivasti liitetty säätelyosaan, lisäksi transformaatioon käytetty vektori mielellään sisältää ainakin yhden fenotyyppisen transformaatiomarkkerin, toisin sanoen geneettisen selektiomarkkerin, kuten antibioottiresistenssigeenin, kromogeenisen tekijän tai geenin, joka käsittää auksotrofisen mutaation. Vektori sisältää myös autonomisen replikaation edellyttämiä alueita.

Kuvaavia malleja hyödyllisistä ilmentämisvektoreista, jotka on tarkoitettu sCD-4-proteiinien ilmentymiseen *E. coli*ssa, on esitetty yksityiskohtaisesti esimerkeissä. Proteiinit ilmentyivät alustaan ja ilmeisesti kiertyivät kunnolla.

Esillä olevaa keksintöä toteutettaessa *Streptomyces*issä DNA-koodaussekvenssi, joka koodaa HIV-sitoutuvaa proteiinia, esim. sCD-4:ää tai sen johdannaisia, liitetään toimivasti *Streptomyces*in transformatiokäyttöön tarkoitettun DNA-vektorin säätelyosaan. Säätelyosa käsittää promoottorin, joka vaikuttaa RNA-polymeraasisitoutumiseen ja transkriptioon. Säädeltävät, toisin sanoen indusoitavat tai repressoitavat promoottorit ovat parhaita. Käytettävissä on lukuisia hyödyllisiä promoottoreita heterologisten proteiinien ilmentämiseen *Streptomyces*issä. Esimerkit käsittävät *Streptomyces*in galaktoosioperonin galaktoosilla indusoitavan promoottorin (Fornwald ym., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2130 (1987)), *S. lividans*in β -galaktosidaasigeenin konstitutiivisen promoottorin (Eckhardt ym. *J. Bacteriol.* 169:4249 (1987));

Browner ym., US-patentti 4 717 666) ja *S. longisporuksen* trypsiiniä inhiboivan geenin (EP-patenttihakemus 87 307 260.7), tai lämpösäätöisen promoottorin kuten *M. echinospor-*sasta raportoitu (Baum ym., *J. Bacteriol.* 170:71 (1988)). Transkription lopetuksen alueet *Streptomyces*issä on johdettu useiden *Streptomyces*in geenien 3'-päästä, esimerkkinä *Streptomyces*in galaktoosioperonin loppupäässä oleva päätesignaali tai *S. fradiae*in neomysiinifosfotransferaasigeenin päässä havaittu alue (Thompson ja Gray, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:5190 (1983)). *Streptomyces*in proteiinin uloskuljetuksesta vastaaviin sekvensseihin sisältyvät *S. lividans*in β -galaktosidaasigeenistä, *S. lividans*in LEP-10-geenistä (EP-patenttihakemus 87 307 260.7) ja *S. longisporuksen* trypsiinin inhibiittorigeenistä eristetyt sekvenssit.

sCD-geeni sisältyy suurempaan DNA-molekyyliin, joka käsittää geneettisen selektiomarkkerisysteemin. Selektiomarkkerisysteemi voi olla mikä tahansa lukuisista tunnetuista markkerisysteemeistä, joiden markkerigeeni antaa selektoitavan uuden fenotyyppin transformoituun soluun. Esimerkit käsittävät *Streptomyces*in lääkeresistenssigeenit kuten tiostreptoniresistenssin ribosomaalinen metylaasi (Thompson ym., *Gene* 20:51 (1982)), neomysiinifosfotransferaasi (Thompson ym., *supra*) ja erytromysiiniresistenssin ribosomaalinen metylaasi (Thompson ym. *supra*). DNA-molekyyli voi myös sisältää *Streptomyces*in autonomisen replikaation sekvenssin, kuten pIJ101-johdannaiset (Keiser ym., *Mol. Gen. Genet.* 185:223 (1982)) tai SLP1-johtoinen vektori (Bibb ym., *Mol. Gen. Genet.* 184:230 (1981)). DNA-molekyyli voi myös sisältää markkerin, joka laajentaa geeniä. Markkereihin, jotka lisäävät geenin kopiolukua *Streptomyces*issä, sisältyvät spektinomysiiniresistenssigeeni (Hornemann ym. *J. Bacteriol.* 169:2360 (1987)) ja arginiiniauksotrofiageeni (Altenbuchner ym., *Mol. Gen. Genet.* 195:134 (1984)).

Alustavia ilmentämiskokeita varten, CD-4-koodausjakso, joka on tarkemmin kuvattu esimerkeissä jäljempänä, liitettiin β gal-signaalisekvenssiin paikkaan, joka oli 8 aminohapon päässä β gal-signaaliptidin katkaisukohdan alapuolella.

Plasmidi pIJ702:lta saatiin tälle ilmentämisvektorille *Streptomyces*in replikaatiotoiminnot (Katz ym., *J. Gen. Microbiol.* 129:2703 (1983)), joka plasmidi on pIJ101:n johdannainen (Keiser ym., *Mol. Gen. Genet.* 184:230 (1981)). Käytetty isäntäkanta oli villin tyypin *S. lividans* 1326 (Bibb ym., *Mol. Gen. Genet.* 184:230 (1981)). β gal-sCD-4-fuusioproteiini havaittiin sekä viljelmän supernatantissa että koskemattomissa soluissa. Toinen koesarja osoitti, että LTI-promoottoria voitiin käyttää sCD-4-proteiinien tehokkaampaan ilmentämiseen.

LTI-ilmentämis/eritysvektorit ovat analogisia gal-systeemille siinä, että geenin ilmentämistä johtaa LTI-promoottori ja proteiinin uloskuljetusta helpottaa LTI-signaalipeptidi. Useiden HIV-sitoutuvien proteiinien koodaussekvenssejä on kloonattu LTI-vektoriin, sisältäen $V_1V_2J_4$:n ja V_1J_4 :n. Kaikkien näiden proteiinien koodaussekvenssit oli liitetty 8 aminohapon päähän LTI-signaalsekvenssin katkaisukohtasta alaspäin. Niin kuin gal-fuusiotkin, sCD-4-proteiinit voidaan kuljettaa viljelmäsupernatanttiin LTI-signaalipeptidin kautta. *Streptomyces*in replikaatiotoiminnot saatiin taas pIJ101-johdannaisilta: pIJ702:lta ja pIJ351:ltä (Keiser ym. supra).

SKBsCD-4:n, V_1J_4 :n ja $V_1V_2J_4$:n ilmentyminen LTI-ilmentämissysteemistä tutkittiin aluksi *S. lividans*-1326:ssa. Sekä SKBsCD-4:ää että $V_1V_2J_4$:ää esiintyi yhtä paljon viljelmäsupernatantissa ja koskemattomissa soluissa. Vaikka nämä proteiinit kuljetetaankin epätäydellisesti ulos solusta, solun sisäpuoliset ja ulkopuoliset muodot näyttävät olevan molekyyllipainoltaan samanlaisia määritettynä niiden liikkuvuutena SDS-polyakryyliamidigeeleissä. Epäselvää on, poistetaanko signaalipeptidi proteolyttisesti sisäpuolisesta muodosta. SKBsCD-4:n maksimipitoisuudet arvioitiin 30 mg:ksi/l viljelmäsupernatantissa ja myös koskemattomissa soluissa. $V_1V_2J_4$ -pitoisuudet arvioitiin ainakin 30 mg:ksi/l (viljelmäsupernatantissa ja koskemattomissa soluissa).

Yksi sCD-4:n ilmentymiseen liittyvä ongelma *S. lividans*issa on sen herkkyys proteaasiaktiivisuuksille. Tämä ongelma voidaan eliminoida tai ainakin merkittävästi vähentää ilmentämällä sCD-4:ää toisissa *Streptomyces*-lajeissa. sCD-4-proteiineja voidaan ilmentää esimerkiksi *S. coelicolor*issa, *S. longisporuksessa* ja *S. albuksessa*. Molekyylin stabiiliisuuden odotetaan lisääntyvän, kun käytetään näitä vaihtoehtoisia isäntiä. sT4-proteiinien ilmentyminen *S. longisporuksessa* lienee edullista, koska tämä isäntä erittää suhteellisesti vähemmän proteiineja viljelmäsupernatanttiin, josta on hyötyä puhdistusprosessissa.

Kun tätä keksintöä toteutetaan hiivassa, DNA:ta koodaava sekvenssi, joka koodaa HIV-sitoutuvaa proteiinia, esim. sCD-4:ää tai sen johdannaisia, liitetään toimivasti säätelyosaan DNA-vektorissa joka on tarkoitettu hiivan transformoimiseen. Mitä tahansa hiivaisäntää, jolle on olemassa transformointi-, kloonaus- ja ilmentämissysteemit, voidaan käyttää. Erityisesti esimerkeiksi sopivat hiivat, jotka kuuluvat sukuihin *Hansenula*, *Pichia*, *Kluveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida* ja *Saccharomyces*. Suositeltava hiivaisäntä on *Saccharomyces cerevisiae*.

Säätelyosa käsittää promoottorin, joka vaikuttaa RNA-polymeraasi-sitoutumiseen ja transkriptioon. Säädeltävät, toisin sanoen indusoitavat tai repressiosta uudelleen aktivoitavat promoottorit ovat parhaita. Tarjolla on useita hyödyllisiä promoottoreita heterologisten polypeptidien ilmentämiseksi hiivassa. Näihin sisältyvät kuparilla indusoitavan metalotioneiinigeenin (CUP1) promoottori ja glykolyyttisten geenien glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasin (TDH3) ja alkoholidehydrogenaasin (ADH) konstitutiivinen promoottori. Transkription päätealueet hiivassa on johdettu mistä tahansa monien hiivageenien 3'-päästä, esim. iso-1-sytokromi C:n geenistä (CYC1).

sCD-4-geeni on liitetty suurempaan DNA-molekyylin, joka käsittää geneettisen selektiomarkkerisysteemin. Selektiomarkkerisysteemi voi olla mikä tahansa useista tunnetuista

markkerisysteemeistä, jossa markkerigeeni antaa selektoitavissa olevan uuden fenotyypin transformoidulle solulle. Esimerkit sisältävät hiivan biosynteesisten entsyymien geenit kuten fosforibosyyli-antranilaatti-isomeraasi (TRP1) tai orotidiini-5'-fosfaattidekarboksylaasi (URA3) tai heterologiset lääkeresistenssigeenit kuten G418-resistenssin tai benomyyliresistenssin (BEN1). DNA-molekyyli voi myös sisältää hiivan autonomisen replikaation sekvenssin kuten hiivan 2-mikroni-rengas-ori-alueen tai kromosomaalisen autonomisen replikaation alueen (ARS), kuten ARS1:n, ja hiivan sentromeerin (CEN) kuten CEN3:n, jotta plasmidin autonominen replikaatio olisi mahdollinen.

Suosittelavassa ilmentämissysteemissä HIV-sitoutuvan proteiinin koodaussekvenssi on liitetty koodaussekvenssiin, joka stabiloi ilmentymistä, koska on huomattu, että SKBsCD-4 yksin ilmentyy huonosti; tällainen heikko ilmentyminen voi johtua tehottomasta transkriptiosta ja translaatiosta tai nopeasta proteiinin hajoamisesta. Joka tapauksessa on osoitettu, että geenifuusion tuote, jossa ubikitiinin koodaussekvenssi on liitetty SKBsCD-4:n koodaussekvenssin 5'-päähän, ilmentyy suhteellisen korkeilla tasoilla ja pilkkoutuu jolloin tuloksena on ubikitiiniä ja sCD-4-geenituote.

Ubikitiinin DNA:ta koodaava sekvenssi voidaan eristää hiiva- tai muusta eukaryoottisolusta, sisältäen nisäkässolut, tavanomaisilla geenin kloonaustekniikoilla. Vaihtoehtoisesti se voidaan syntetoida tavanomaisilla tunnetuilla tekniikoilla. Ecker ym., J. Biol. Chem. 262:3524 (1987) ovat kuvanneet tämän keksinnön kuvaamiseen käytetyn ubikitiinigeenin nukleotidisekvenssin. Sekvenssi on olennaisilta osiltaan seuraavanlainen:

```
AATTCATTATGCAGATCTTCGTCAAGACGTTAACCGGTAAAACCATAACTCTAGA
AGTTGAATCTTCCGATACCATCGACAACGTTAAGTCGAAAATTCAAGACAAGGAA
GGCATTCCACCTGATCAACAAAGATTGATCTTTGCCGGTAAGCAGCTCGAGGACG
GTAGAACGCTGTCTGATTACAACATTCAGAAGGAGTCGACCTTACATCTTGTCTT
AAGACTAAGAGGTGGTTGAGGTAC
```

Kun signaali-peptidin DNA-sekvenssi liitetään HIV-sitoutuvan proteiinin sekvenssin 5'-päähän, seurauksena on proteiinin erittyminen kasvatusalustaan. Tähän tarkoitukseen sopivia signaali-sekvenssejä ovat esimerkiksi hiivan yhdistymistekijän, alfa-tekijän, signaali-sekvenssit (Kurjan ja Herskowitz, Cell 30:933 (1982)). Lisäksi ilmentyminen voidaan saada aikaan liittämällä hiivan sCD-4-ilmentämiskappale hiivan kromosomiin, mitä seuraa kertautuminen käyttämällä markkereita kuten hiivan DHFR-geeniä lisääntyneen kopioluvun selektoinniseksi.

Yleisesti ottaen keksinnön mukaiset sCD-4-proteiinit voidaan puhdistaa käytetystä kasvatusalustasta käyttäen useita proteiinin puhdistustekniikoita, esimerkiksi affiniteettikromatografia; ioninvaihtokromatografia; kokoekskluusio-kromatografia; hydrofobinen kromatografia tai käänteinen faasikromatografia.

sCD-4, sen fragmentit ja johdannaiset voidaan puhdistaa affiniteettikromatografialla käyttämällä yleisiä ryhmäspesifisiä adsorbentteja, esim. hiilihydraatti-sitoisia tai väriaffiniteetti-ligandeja; tai käyttämällä ligandeja, jotka spesifisesti sitoutuvat sCD-4:ään, esimerkiksi monoklonaalisia vasta-aineita tai HIV gp120-proteiinia tai sen osia.

Puhdistus käsittää, sen jälkeen kun soluja on kasvatettu selektiivisellä kasvualustalla noin 28:sta noin 45°C:een, fermentointialustan kirkastamisen ja sitten HIV-sitoutuvan proteiinin erotuksen muista alustassa olevista proteiineista. Parhaassa menetelmässä sCD-4-proteiinit puhdistetaan kasvualustasta käyttämällä kromatografiavaiheitten sarjaa, joka perustuu sCD-4-molekyylin fysikaalisiin ominaisuuksiin.

Vaihtoehtoinen menetelmä sCD-4-proteiinien puhdistukseen käsittää sCD-4:ää vastaan kohdistettujen monoklonaalisten vasta-aineiden käytön. Proteiini voidaan puhdistaa yhdellä kertaa antamalla kirkastetun kasvualustan kulkea affiniteettigeelin läpi, johon geeliin proteiinia vastaan kohdistettu monoklonaalinen vasta-aine on sidottu. Kiinnostuksen

kohteena oleva proteiini sitoutuu pylvääseen vasta-aineen sitoutumiskohtaan kun taas kontaminoivat proteiinit huuhtoutuvat pylvään läpi. Proteiini eluoidaan sen jälkeen pylväästä sellaisissa olosuhteissa, jotka estävät kontaminoitumisen.

sCD-4-proteiinien in vitro biologisten ja immunologisten ominaisuuksien karakterisointi osoittaa, että proteiineilla on merkitystä AIDS:in estossa ja hoidossa. Tutkimukset osoittavat, että proteiinit toimivat solunulkopuolisen ja solusta soluun leviämisen estäjänä. Koska sCD-4:n ja sen fragmenttien ja johdannaisten, jotka on kuvattu tässä keksinnössä, on osoitettu estävän viruksen sitoutumista CD-4⁺-kohdesoluihin viljelmässä, uskotaan, että näiden proteiinien antaminen infektoituneille henkilöille estäisi viruksen solun ulkopuolista leviämistä. Sen vuoksi sCD-4-proteiineilla on arvoa sekä estävänä että hoitavana tekijänä AIDS:n tai AIDS:iin liittyvän kompleksin (ARC) hoidossa.

Suojaajana sCD-4-proteiineja annetaan henkilöille, joilla on suuri riski sairastua tai henkilöille, joilla on HIV näkyy viruksen vasta-aineita käytettäessä. Proteiinin tehokkaan määrän antaminen sairauden alkuvaiheessa tai ennen sen alkamista estää CD-4⁺-lymfosyyttien infektoitumista HIV:lla. Hoitavana tekijänä sCD-4:n antaminen henkilöille, jotka ovat infektoituneet HIV:lla, estää viruksen solun ulkopuolista leviämistä.

HIV:lla infektoituneiden solujen ja toisten CD-4⁺-lymfosyyttien välinen fuusio näyttää myös olevan viruksen leviämisen väylä. Lisäksi fuusio voi osittain olla syynä CD-4⁺-lymfosyytti-toiminnan heikkenemiseen ja voi lopulta johtaa CD-4⁺-lymfosyyttien katoamiseen infektoituneissa henkilöissä. Solufuusio on riippuvainen sekä viruksen kuorigeenin tuotteista että CD-4-reseptorista ja voidaan estää OKT-4A:lla tai samanlaisella monoklonaalisella vasta-aineella (Mabs) (Sattentau ym., Science 234:1120 (1986)). Tässä kuvattut sCD-4-proteiinit häiritsevät solufuusiota ja sen vuoksi

vähentävät viruksen solusta soluun leviämistä ja CD-4⁺-lymfosyytti-toiminnon vähenemistä.

CD-4-reseptori on monomorfinen ja täten sCD-4-proteiinien uskotaan olevan viruksen yleinen estäjä, joka tunnistaa CD-4-reseptorin pinta-alueen käsittäen kaikki HIV:t.

sCD-4-proteiineja voidaan käyttää yhdessä muiden tekijöiden kanssa, esimerkiksi yhdessä muita HIV-proteiineja vastaan valmistettujen tekijöiden kanssa, kuten käänteisen transkriptaasin, proteaasin tai tat:n. Tehokkaan hoitavan tekijän HIV:a vastaan pitäisi estää virusvälitteistä sekä myös infektion solusta soluun siirtymistä. sCD-4-proteiineja voidaan myös käyttää yhdessä muiden antiviraalisten tekijöiden, esimerkiksi atsidotymidiinin (AZT) kanssa.

Tämän keksinnön sCD-4-proteiineilla on myös käyttöä CD-4⁺-solutoiminnan estäjinä sitoutumalla solun ulkopuolisiin kohdemolekyyleihin, jotka normaalisti toimivat CD-4-reseptorin pinta-alueen kanssa. Lukuisten tutkimusten mukaan CD4-reseptorilla olisi tärkeä osuus immunologisessa sietokyvyssä, erityisesti autoimmuunisairauksien patogeenisyydessä ja etenemisessä ja isäntäspesifisessä siirännäisen hylkimisessä.

Suojaavana tai hoitavana tekijänä sCD-4-proteiinit annetaan parenteraalisesti, mielellään suonensisäisesti. Tekijä voidaan antaa infuusiona tai injektiona, esim. päivittäin, viikottain tai kuukausittain. Tekijän määrä ja antamisen tiheys on valittu niin, että tehoava määrä sCD-4-proteiinia säilyy verenkierrossa. Vaihtoehtoinen tapa antaa proteiinia olisi kehon ulkopuolisesti antamalla sCD-4-proteiineja dialyysin muodossa.

Tämän keksinnön sCD-4-proteiinia voidaan myös käyttää reagenssina tunnistamaan luonnollisia, synteettisiä tai rekombinanttimolekyylejä, jotka toimivat hoitavina tai estävinä tekijöinä CD-4⁺-solun vuorovaikutussuhteissa.

Esimerkiksi sCD-4-proteiineja voidaan käyttää seulonta-analyyseissä, kuten proteiinien vuorovaikutusanalyyseissä, joita määritetään ELISA-menetelmillä, jotta saataisiin aikaan biokemiallisesti puhdas, nestemäinen liukoinen reagenssi, jota voidaan käyttää yhdessä muiden reagenssien kanssa analysoimaan CD-4-reseptorin pinta-alueen vuorovaikutussuhteiden kilpailijoita. Esimerkiksi koska sCD-4-proteiinit sitoutuvat HIV-env-proteiiniin tai seoksiin, jotka sisältävät HIV-env-proteiineja, proteiineja voidaan käyttää seulomaan virus-sitoutumisen estäjiä.

Koska in vitro -tulokset osoittavat, että sCD-4-proteiinit sitoutuvat HIV-env-proteiineja ilmentäviin soluihin, nämä proteiinit voivat myös toimia HIV:lla infektoiduneiden solujen kohdemolekyyleinä in vivo. Kohdespesifisenä kantajaproteiininä sCD-4-proteiinit voivat toimia esimerkiksi kantajana sytotoksisille tekijöille, jotka on tarkoitettu vapautettavaksi infektoiduneissa soluissa.

Lisäksi, koska on osoitettu, että CD-4-reseptori sitoutuu erityisesti luokan II MHC-antigeeneihin antigeeniä tuottavien solujen pinnalla, mitä on ehdotettu CD-4⁺-solujen luokkajon perusteella, sCD-4-proteiineja voidaan käyttää yhdessä II-luokan antigeenien kanssa testaamaan CD-4-lymfosyytti - kohdesolu -vuorovaikutussuhteita. Näiden esimerkkien lisäksi, jotka esimerkit perustuvat suoriin sitoutumisanalyyseihin proteiinin ja sen kohdemolekyylien välillä, voidaan myös kehittää monimutkaisempia analyysimenetelmiä, jotka perustuvat proteiinitunnistuksen biokemiallisiin vasteisiin. Deleetiomutantteja voidaan käyttää diagnostisissa analyyseissä CD-4-proteiinien tai niiden kanssa reagoivien molekyylien tunnistamiseen. Esimerkiksi CD-4:n ja CD-4⁺-solujen sekä CD-4:n vasta-aineiden määrittämisellä olisi diagnostista arvoa AIDS:n hoidossa.

Lisäksi sCD-4-proteiineja voidaan käyttää uusien diagnostisten reagenssien, esimerkiksi Mabs:n tai muuntotyypisten molekyylien valmistamiseen käytettäväksi immunologisissa standardianalyyseissä, toisin sanoen ELISA:ssä, -immunoana-

lyyseyssä ja radioimmuunianalyysissä. Koska sCD-4 osoittaa OKT-4-, OKT-4A- ja, jollei kaikkia niin lähes kaikki muutkin CD-4-reseptorin pintaepitoot, proteiinit ovat erityisen käyttökelpoisia CD-4-pitoisuuksien absoluuttiseen määrittämiseen systeemissä immunodiagnostisin menetelmin.

CD-4-reseptori esiintyy kolmessa erilaisessa kemiallisessa ympäristössä: hapettuneella hydrofiilisella solupinnalla; hydrofobisella kalvolla; ja pelkistyneessä hydrofiilisessä solulimassa. Nämä erilaiset ympäristöt melko varmasti estäisivät reseptorin eristämisen sen täysin alkuperäisessä muodossa. sCD-4-proteiinit, jotka koostuvat ainoastaan valikoiduista solun ulkopuolisen alueen segmenteistä, eritetään liukoisina proteiineina solusupernatanttiin ja niiden konformaatio näyttää jäljittelevän merkittävässä määrin reseptorin pinta-alueen pintaa. Näin ollen sCD-4-proteiinit sopivat yksityiskohtaiseen rakenneanalyysiin, erityisesti röntgenkristallografiaan. sCD-4-proteiinien kolmiulotteisen rakenteen määrittäminen yksin tai yhdistelmämuodossa muiden vaikuttavien molekyylien kanssa voisi tarjota perustan SCD-4:n valikoitujen antagonistien ja agonistien järkevälle suunnittelulle.

Esimerkit

Tässä seuraavat esimerkit ovat asiaa kuvaavia eivätkä rajoita keksintöä. Geneettisissä manipulaatioissa käytetyt entsyymit saatiin kaupallista lähteistä ja niitä käytettiin pääpiirteissään myyjän ohjeiden mukaan. Ellei toisin ole mainittu, kokeet suoritettiin pääpiirteissään Maniatiksen ym., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, mukaan.

Esimerkki 1: E. colin ilmentämisvektorien valmistaminen

Käyttämällä rekombinantti-DNA-manipulaatioita täyspitkän SKBsCD-4:n koodaussekvenssi ja deleetiomutantit V1V2J4 tai V1J4, joita seurasi oikeassa lukujaksossa TAA-päätetekodoni (katso sekvenssiä edellä), liitettiin alaspäin E. colin ilmentämisvektorin OMPA-signaalisekvenssistä plasmidien

OMPAST4BBV1, OMPAV1V2 ja OMPAV1 luomiseksi. Vektorit valmistettiin seuraavalla tavalla:

Plasmidi JRT4:n valmistaminen: Plasmidi JRT4:n valmistamiseksi plasmidi DSP1 (Pfarr, ym., DNA 4:461 (1985)) avattiin XhoI:llä, SV40-polyA:n alkualue poistettiin ja XhoI-kohdat täytettiin DNA-polymeraasin Klenow-fragmentillä. Naudan kasvuhormonin (BGH) polyadenylaatioalue (Pfarr, ym., DNA 5:115 (1986)) avattiin PvuII:lla ja KpnI:llä ja KpnI-kohta tasoitettiin käsittelemällä sitä T4-DNA-polymeraasilla. Tämä 230 emäsparin fragmentti liitettiin DSP1:een DSP1BGH:n valmistamiseksi.

DSP1BGH avattiin SmaI:llä ja SalI:llä ja galk-kasetti (joka käsittää SV40:n alkuvaiheen promoottorin, galk:ta koodaavan alueen ja BGH-polyA-alueen) liitettiin pUC19:ään (Yanisch-Perron ym., Gene 33:103 (1985) SalI-kohtaan käyttämällä synteettistä liittäjämolekyyliä, joka koostuu SalI-päästä, BglII-kohdasta ja SmaI-päästä. Tämän kolmiosaisen liitoksen tuloksena oli plasmidi DSP1BZBGH.JT.

DSP1BZBGH.JT, joka avattiin StuI:llä ja BclI:llä galk:ta koodaavan alueen poistamiseksi, liitettiin 1,7 ke:n EcoRI-(täytetty)-BamHI-fragmenttiin, joka sisälsi CD-4-cDNA:n plasmidista pT4B (Maddon ym., Cell 42:93 (1985)), plasmidin JRT4:n luomiseksi.

Plasmidi pUCsT4:n valmistaminen: Plasmidin pUCsT4:n valmistamiseksi plasmidin pT4b:n CD-4-cDNA:n HaeII-HpaII-fragmentti (1125 emäsparia) liitettiin synteettisten liittäjämolekyylien avulla vektoriin pUC18, joka oli avattu KpnI:llä ja XbaI:llä. CD-4-cDNA:n HaeII-pää liitettiin pUC18:n KpnI-kohtaan käyttämällä synteettistä liittäjämolekyyliä, jolla oli KpnI- ja HaeII-pää. CD-4-cDNA:n HpaII-pää liitettiin pUC18:n XbaI-kohtaan käyttämällä synteettistä liittäjämolekyyliä, jossa oli HpaII- ja XbaI-pää. Tämän liittäjämolekyylin mukana liitettiin myös TAA-päätekodoni CD-4-koodausalueen nukleotidin 1257 jälkeen. Tuloksena oli plasmidi pUCsT4.

pST4sal:n valmistaminen: Plasmidin pST4sal valmistamiseksi plasmidi JRT4 avattiin BglII:lla ja SacI:llä ja 959 emäsparin fragmentti (joka koostui SV40:n alkuvaiheen promoottorin ja CD-4-cDNA:n 602 ensimmäisestä nukleotidista) eristettiin. Plasmidi pUCsT4 avattiin SacI:llä ja XbaI:llä ja 660 emäsparin fragmentti (joka käsitti CD-4-cDNA:n nukleotidit 603-1257, joita seurasi synteettisen liittäjämolekyylin TAA-kodoni) eristettiin. Nämä kaksi fragmenttia liitettiin DSP1BZBGH.JT:hen, joka oli avattu BglII:lla ja XbaI:llä SV40:n alkuvaiheen promoottorin ja täyspitkän CD-4-koodausalueen poistamiseksi. Tuloksena oli plasmidi pST4sal.

pST4DHFR:n valmistaminen: Plasmidin pST4DHFR:n valmistamiseksi BglII-BamHI-fragmentti, joka sisälsi β -globiinin DHFR-ilmentymiskasetin, liitettiin pST4sal:n BamHI-kohtaan. β -globiini-DHFR-ilmentämiskasetti koostuu: hiiren β -globiini-promoottorista (550 emäsparin HincII-fragmentti plasmidista pPK288 (Berg ym., Mol. Cell. Biol. 3:1246 (1983)), joka on muokattu 5'-päästään synteettisellä liittäjämolekyyllillä BglII-kohdan valmistamiseksi; hiiren DHFR-koodausalueen (735 emäsparin HindIII-(täytettävä)-fragmentin plasmidista pSV2-DHFR:stä (Subramani ym., Mol. Cell. Biol. 1:854 (1981))); DSP1:stä NheI-(täytettävä)-SV40-polyA:n alkuvaiheen alue (Pfarr ym., DNA 4:461 (1985)); ja hiiren pätealueen (907 emäsparin HindIII (plasmidin mDH9:n täytettävä fragmentti (Frayne ym., Mol. Cell. Biol. 4:2921 (1984))), joka on muokattu 3'-päästään synteettisellä liittäjämolekyyllillä BamHI-kohdan luomiseksi.

pST4BBV1DHFR:n valmistaminen: Plasmidin pST4BV1DHFR:n luomiseksi plasmidi pST4DHFR avattiin EcoRI:llä ja XbaI:llä ja pienempi fragmentti, joka sisälsi sCD-4:ää koodaavan jakson, poistettiin. Plasmidi sT4sal avattiin XbaI:llä ja BbvI:llä ja 1120 emäsparin koodausfragmentti, joka sisälsi liukoisen CD-4:n sekvenssin, josta puuttui johtoalue, eristettiin. Tämä fragmentti liitettiin EcoRI:llä ja XbaI:llä avattuun pST4DHFR:ään käyttämällä synteettistä liittäjämolekyyliä, jossa oli EcoRI-pää, KpnI-kohta ja BbvI-pää. Tämä fragmentti

sopii edellä eristetyn sCD-4-fragmentin BbvI-päähän. Tuloksena ollutta plasmidia kutsuttiin pST4BBV1DHFR:ksi.

OMPAST4:n valmistaminen: Plasmidin OMPAST4 valmistamiseksi plasmidi OMPA.GS avattiin NcoI:llä ja SalI:llä ja liittämölekyylialueen sisältävä pienempi fragmentti poistettiin. OMPA.GS on pAS1:n johdannainen (Rosenberg ym., Meth. Enzymol. 101:123 (1983); US-patentti 4 578 355), jolla on sekvenssi, joka on liitetty cII-ribosomisitoutumissekvenssin 3'-pään NdeI-kohtaan. Synteettinen sekvenssi käsittää OMPA-johtosekvenssin, jota seuraa moniliittämölekyylisekvenssi. Synteettinen sekvenssi on pääpiirteissään seuraavanlainen:

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'

Plasmidi pUCsT4 avattiin NcoI:llä ja SalI:llä ja 1149:n emäsparin fragmentti, joka sisälsi sCD-4-sekvenssin (CD-4-nukleotidit 124-1257), eristettiin. Tämä fragmentti liitettiin NcoI:llä ja SalI:llä avattuun OMPA.GS:ään OMPAST4:n valmistamiseksi.

OMPAST4BbvI:n valmistaminen: Plasmidin OMPAST4BbvI valmistamiseksi plasmidi OMPAST4 avattiin NaeI:llä ja XbaI:llä. Pienempi fragmentti, joka syntyi tämän avauksen tuloksena ja joka sisälsi sCD-4:ää koodaavan alueen, poistettiin. Plasmidi ST4BBVIDHFR avattiin KpnI:llä ja tuloksena ollut 3'-riippuva pää tasoitettiin T4-DNA-polymeraasilla. Päästään tasoitettu DNA katkaistiin sen jälkeen XbaI:llä ja 1124:n emäsparin fragmentti, joka sisälsi CD4-cDNA:n nukleotidit 145-1257, eristettiin. Eristetty fragmentti liitettiin NaeI:llä ja XbaI:llä katkaistuun OMPAST4-plasmidiin plasmidin OMPAST4BbvI:n valmistamiseksi.

pucST4184:n valmistaminen: Plasmidin pucST4184 valmistamiseksi CD-4-cDNA:n EcoRI-NheI-fragmentti [682:n emäsparin fragmentti, joka koodaa aminohappoja (-25)-(+176)] liitettiin synteettiseen liittämölekyyliin sk727/725 (NheI ja

AvaI-päät) NheI-kohtaan. sk727 koodaa CD-4:n aminohappoja 177-183. sk727/725:n AvaI-pää liitettiin pucST4:n (joka käsittää ihmisen cDNA:n emäsparit 1198-1257 ja joka koodaa CD-4-reseptorin aminohappoja 351-369, joita seuraa TAA-päätetekodoni) AvaI-XbaI-fragmenttiin. Tämä sekvenssi, jolla on EcoRI- ja XbaI-pää, liitettiin pUC19:ään pUC19:n moniliittäjämolekyyliin (sk727/725) EcoRI- ja XbaI-päihin. sk727/725 on pääpiirteissään seuraavanlainen:

```
5' ctagctttccagaaggcc 3'
   3' gaaaggtcttccggagcc 5'
```

pucST4106:n valmistaminen: Plasmidin pucST4106 valmistamiseksi CD-4-cDNA:n EcoRI-Ava II-fragmentti (joka käsitti emäsparit 1-413 ja joka koodaa aminohappoja (-)25-87) liitettiin synteettiseen sk791-792-liittäjämolekyyliin (Ava II-AvaI-päät) AvaII-kohtaan. sk791-792 koodaa CD-4-aminohappoja 88-104. sk791/792:n AvaI-pää liitettiin pucST4:n (joka käsittää ihmisen cDNA:n emäsparit 1198-1257 ja joka koodaa CD-4-reseptorin aminohappoja 351-369, joita seuraa TAA-päätetekodoni) AvaI-XbaI-fragmenttiin. Tämä sekvenssi, jolla on EcoRI- ja XbaI-päät, liitettiin pUC19:ään pUC19-moniliittäjämolekyyliin EcoRI- ja XbaI-päihin. sk791/792 on pääpiirteissään seuraavanlainen:

```
5' gaccagaaggaggaggtgcaattgctagtgttcggattgactgccaac
   gtcttcctcctccacgttaacgatcacaagcctaactgacgggttgagc 5'
```

st4184.DHFR:n valmistaminen: Plasmidin st4184.DHFR:n valmistamiseksi pucST4184:n (joka koodaa aminohappoja -25 - 183, jotka on liitetty 351-369:ään) EcoRI-XbaI-fragmentti liitettiin pst4.DHFR:n EcoRI-XbaI-päihin SKBsCD-4:ää koodaavan EcoRI-XbaI-fragmentin paikalle.

st4106.DHFR:n valmistaminen: Plasmidin st4106.DHFR:n valmistamiseksi pucST4106:n (joka koodaa aminohappoja -25 - 104, jotka on liitetty aminohappoihin 351-369) EcoRI-XbaI-fragmentti liitettiin pst4.DHFR:n EcoRI- ja XbaI-päihin SKBsCD-4:ää koodaavan EcoRI-XbaI-fragmentin paikalle.

OMPAV1:n valmistaminen: OMPAV1:n valmistamiseksi plasmidi OMPAST4BbvI katkaistiin AflII:lla ja XbaI:llä ja pienempi fragmentti, joka sisälsi CD-4-cDNA:n koodausalueen nukleotidit 371-1257, poistettiin. Plasmidi pst4101.DHFR katkaistiin AflII:lla ja XbaI:llä ja 160 emäsparin fragmentti, joka sisälsi nukleotidit 371-459 ja 1198-1257 CD-4-cDNA-sekvenssistä, eristettiin. Nämä kaksi fragmenttia liitettiin toisiinsa plasmidi OMPAV1:n valmistamiseksi.

OMPAV1V2:n valmistaminen: OMPAV1V2:n valmistamiseksi plasmidi OMPAST4BbvI katkaistiin SacI:llä ja XbaI:llä ja pienempi fragmentti, joka sisälsi nukleotidit 603-1257 CD-4-cDNA-sekvenssistä, poistettiin. Plasmidi ST4184.DHFR katkaistiin SacI:llä ja XbaI:llä ja 164 emäsparin fragmentti, joka sisälsi nukleotidit 603-696 ja 1198-1257 CD-4-cDNA-sekvenssistä, eristettiin. Nämä kaksi fragmenttia liitettiin yhteen plasmidin OMPAV1V2:n valmistamiseksi.

Esimerkki 2: sCD-4-proteiinien ilmentyminen E. colissa
OMPAV1- ja OMPAV1V2-rakenteet transformoitiin heikennettyihin E. colin lambda-lysogeeneihin AR58 (c1857) ja AR120 tavanomaisin menetelmin. Lämpö- (Rosenberg ym., Meth. Enzymol. 101:123 (1983)) tai nalidiksiinihappoinduktioita (Mott ym. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:88 (1985)) käytettiin kuten jäljempänä on kuvattu.

Lämpöinduktio: Solulinjan AR58 osalta 200 ml LB:tä (joka sisälsi 50 µ/ml ampillisiinia) siirrostettiin 7 ml:lla 10 ml:n yli yön (O.N.) inkuboitua AR58-solu - viljelmää, joka sisälsi OMPAST4Bbv1-, OMPAV1- tai OMPAV1V2-plasmidin ja joka on kasvatettu ravistelijassa 32°C:ssa. Siinä vaiheessa, kun viljelmä oli saavuttanut 0,8 absorbanssiyksikköä 650 nm:n (O.D.₆₅₀) optisessa tiheydessä, 200 ml 55 C-asteiseksi lämmitettyä LB:tä lisättiin viljelmään ja pullo siirrettiin ravistelijaan 42°C:seen. 30, 60 ja 90 minuutin kuluttua lämpötilan vaihdoksen jälkeen otettiin viljelmästä yhden ml:n näyte analysoitavaksi. 90 minuutin näytteen solut jäähdytettiin 15 minuuttia jäävedessä ja sen jälkeen sentri-

fugoitiin 3500 kierrosta/minuutti 15 minuutin ajan 4°C:ssa J-6-Beckman-sentrifugissa (Beckman Instruments, Fullerton, California). Solupelletit säilytettiin pakastettuina -20°C:ssa käyttöön asti. Valmis alusta säilytettiin pakastettuna -20°C:ssa käyttöön asti.

Nalidiksiinihappoinduktio: Solulinjan AR120 osalta 400 ml LB:tä (joka sisälsi 50 ug/ml ampisilliinia) siirrostettiin 13 ml:lla 20 ml:n AR120-solujen O.N.-viljelmää, joka sisälsi OMPAST4Bbv1-, OMPAV1- tai OMPAV1V2-plasmidin ja joka oli kasvatettu ravistelijassa 37°C:ssa. Kun oli saavutettu 0,4 yksikköä O.D.₆₅₀:ssä 400 µl nalidiksiinihappoa (50 mg/ml) lisättiin viljelmään. Viljelmää pidettiin 37°C:ssa ravistelijassa ja siitä otettiin 1 ml:n näytteet 1, 3 ja 5 tuntia nalidiksiinihappolisäyksen jälkeen. 5 tunnin näytteen solut jäädytettiin 15 minuuttia jäävedessä ja sen jälkeen ne sentrifugoitiin 3500 kierrosta/minuutti 4°C:ssa J-6-Beckman-sentrifugissa. Solupelletit säilytettiin pakastettuina -20°C:ssa käyttöön asti. Käytetty alusta säilytettiin pakastettuna -20°C:ssa käyttöön asti.

Induktion jälkeen solut pelletoitettiin yhden ml:n näytteistä ja analysoitiin täyspitkän ja mutantti-sT4-proteiinien (SKBsCD-4, V1J4 ja V1V2J4) ilmentymisen suhteen western blot -menetelmällä käyttämällä kanin polyklonaalista vasta-ainetta bakteerien tuottamaa denaturoitua liukoista T4:ää vastaan. Sopivan kokoiset proteiinit määritettiin sekä lämpö- että nalidiksiinihappoindusoitujen näytteiden solulysaateista. Havaitut tasot vaihtelivat 1-5 %:n välillä kokonaisproteiinista.

Käytetyn alustan käsittely: Pakastettu käytetty alusta sulatettiin huoneenlämmössä ja siitä otettiin 30 ml:n näytteitä, jotka sentrifugoitiin 4°C:ssa yhden tunnin ajan 24 000 kierrosta/minuutissa Beckmanin SW28 roottorissa. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantit yhdistettiin ja konsentroidtiin 10-20-kertaisiksi 4°C:ssa painekalvosuodatuksella.

Konsentroitua alusta analysoitiin täyspitkien SKBsCD-4-, V1J4- tai V1V2J4-proteiinien suhteen western blot -analyysillä (kuten edellä), kilpailu-ELISA:lla ja immunosaostuksella.

Jokaisessa näytteessä havaittiin sopivan kokoinen proteiini konsentroidussa käytetyssä alustassa Western blot - analyysissä pitoisuuksina, jotka olivat 1-5 % (0,1-0,5 ng/ml konsentroimatonta käytettyä alustaa) siitä määrästä, joka havaittiin solun sisäpuolella. Kaikki 3 proteiinia sitoutuivat OKT4A:han kilpailu-ELISA-analyysissä. V1J4- ja V1V2J4-proteiinit analysoitiin lisäksi immunosaostamalla CD-4:ää (Ortho, Raritan, New Jersey) vastaan sarjalla monoklonaalisia vasta-aineita. OMPAV1:n ja V1J4:n ilmentämä proteiini immunosaostettiin OKT4A:lla ja OKT4D:llä, mutta ei OKT4:llä, OKT4B:llä, OKT4C:llä, OKT4E:llä tai OKT4F:llä. OMPAV1V2:n ja V1V2J4:n ilmentämä proteiini immunosaostettiin kaikilla OKT4-monoklonaalisilla vasta-aineilla lukuun ottamatta OKT4:ää. Lisäksi tämän proteiinin affiniteetti OKT4C:hen oli alhaisempi kuin muihin monoklonaaleihin.

Solupelletin käsittely: OMPAST4Bbv1/AR58:n lämpöinduktion 90 minuutin ajankohdan solupelletit sulatettiin jäissä ja suspendoitiin uudelleen puskuriin (100 mM Tris-HCl, pH 8, 0,5 mM EDTA ja 0,5 M sakkarosi) 4°C:ssa pelletti/puskurisuhteessa 100 O.D.₆₅₀/ml. Lysotsyymi (10 mg/ml 0,05 M Tris-HCl:ssa, pH 8) lisättiin niin, että sen lopullinen pitoisuus oli 0,2 mg/ml ja sen jälkeen suspensiota inkuboitiin jäissä 15 minuuttia. Yhtä paljon jääkylmää vettä lisättiin ja sen jälkeen suspensiota inkuboitiin jäissä 15 minuuttia. PMFS (50 mM) lisättiin niin, että sen lopullinen pitoisuus oli 1 mM, jonka jälkeen lisättiin MgCl₂ (1 M) niin, että sen lopullinen pitoisuus oli 2 mM. Solususpension annettiin kulkea 18-numeron neulan läpi 3 kertaa viskositeetin vähentämiseksi ja sentrifugoitiin sen jälkeen 20 000 x g 10 minuuttia 4°C:ssa.

Sentrifugoinnin jälkeen pelletti suspendoitiin uudelleen 20 mM Tris-HCl:iin, pH 8, 5 mM EDTA, 5 mM βME saman verran

kuin ennen sentrifugointia. Suspensio sonikoitiin 60 sekunnin ajan (10 sekunnin hajotukset, joiden välillä 30 sekunnin jäähtytys), ja sen jälkeen se sentrifugoitiin $20\,000 \times g$ 15 minuutin ajan 4°C :ssa. Western blot -analyysi tuloksena olleesta pelletistä ja supernatantista osoitti, että 70 % SKBsCD-4-proteiinista oli supernatanttifraktiossa. Supernatanttifraktio sentrifugoitiin $100\,000 \times g$ 60 minuuttia. Western blot -analyysi tuloksena olleesta pelletistä ja supernatantista osoitti, että <5 % SKBsCD-4-proteiinista oli jäänyt liuokseen. Supernatanttifraktio laimennettiin yhtä suureen määrään 40 mM MES:ä, pH 6,0, ja vietiin 1 ml:n S-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) -pylvääseen, joka oli tasapainoitettu 20 mM MES:llä, pH 6,0. Pylväs huuhdeltiin 10 ml:lla 20 mM MES:ä, pH 6,0. Sitoutunut SKBsCD-4 eluointiin 20 mM MES:llä, pH 6,0 ja 0,5 M NaCl:lla 1 ml:n fraktioina. Western blot -analyysi läpi kulkevasta virrasta, huuhtoutumasta ja eluutiofraktioista osoitti, että <5 % SKBsCD-4:stä sitoutui pylväaseen ja eluutui fraktioihin 2 ja 3.

Läpi kulkeneesta virrasta, huuhtoutumasta ja eluutiofraktioista tehtiin kilpailu-ELISA-analyysi toimivan SKBsCD-4:n osoittamiseksi. Sekä läpi kulkenut virta että eluutiofraktio 2 sisälsi SKBsCD-4:ää, joka sitoutui OKT4A:han.

Immunosaostus: Konsentroitua alusta (100 μl) laimennettiin samalla määrällä saostuspuskuria (10 mM natriumfosfaattia, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1 % NP-40, 0,5 % rasvatonta maitoa) ja kirkastettiin 3 μg :lla kanin IgG:tä 15 minuuttia 4°C :ssa, jonka jälkeen lisättiin 30 μl (pakkausmäärä) proteiini-A-Sepharose-helmiä (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) 30 minuuttia 4°C :ssa. Kirkastettuja supernatantteja inkuboitiin 5 μg :ssa OKT4-, -4A-, -4B-, -4C-, -4D-, -4E-, -4F- ja OKT8-monoklonaalisia vasta-aineita (Ortho Pharmaceuticals), hiiren IgG:tä (Cooper Biomedical, Malvern, Pennsylvania) tai kanin anti-hiiri-IgG:tä (Cooper Biomedical) 30 minuuttia 4°C :ssa. OKT4, -4A, -4C, OKT8, hiiren IgG ja kanin anti-hiiri-IgG saostettiin inkuboimalla 20 μl :ssa (pakkausmäärä) proteiini-A-Sepharose-helmiä 30 minuuttia 4°C :ssa. OKT4B,

-4D, -4E ja -4F inkuboitiin 10 µg:ssa hiiren anti-hiiri-IgG:tä 30 minuuttia 4°C:ssa ennen proteiini-A-Sepharose-helmien lisäämistä. Saostuksen jälkeen helmet huuhdeltiin kahdesti 200 µl:lla saostuspuskuria ja kerran 200 µl:lla saostuspuskuria, jossa ei ollut NP-40:tä ja rasvatonta maitoa. Huuhdeltuja helmiä keitettiin 5 minuuttia 20 µl:ssa näytepuskuria (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % glyseroli, 1,4 M βME (beeta-merkaptotetanoli). Keittämisen jälkeen supernatantit käsiteltiin elektroforeesilla 12,5-%:ssa SDS-polyakryyliamidigeelissä ja analysoitiin western blot -tekniikalla kuten edellä on kuvattu.

Sekä V1J4- että V1V2J4-proteiinit immunosaostettiin OKT4A:-lla. OMPAV1:n ilmentämä proteiini immunosaostettiin OKT4A:-lla ja OKT4D:llä mutta ei OKT4:llä, OKT4B:llä, OKT4C:llä, OKT4E:llä tai OKT4F:llä. OMPAV1V2:n ilmentämä proteiini immunosaostettiin kaikilla muilla OKT4-monoklonaalisilla vasta-aineilla paitsi OKT4:llä. Lisäksi tämän proteiinin affiniteetti OKT4C:hen oli alhaisempi kuin muihin monoklonaalisiin vasta-aineisiin.

Kilpailu-ELISA: Mikrotiitterilevyt (Flow Laboratories, McLean, Virginia) peitettiin yli yön huoneen lämpötilassa suhteessa 100 µl/kuoppa 0,1 M NaHCO₃/Na₂CO₃ (pH 9,4), joka sisälsi 15 ng puhdistettua SCD-4:ää.

Määräerät (2,5-80 µl) konsentroitua alustaa tai soluekstraktia inkuboitiin yli yön huoneen lämpötilassa yhdessä 5 ng OKT4A-erien kanssa niin, että mukana oli myös 1 mg/ml naudan seerumin albumiinia (BSA), niin että lopullinen tilavuus oli 100 µl. Näytteet, jotka olivat tilavuudeltaan vähemmän kuin 100 µl, laimennettiin 100 µl:aan fosfaatilla puskuroidulla saliinilla (PBS). Inkuboinnin jälkeen levyt tyhjennettiin, huuhdeltiin 3 kertaa PBS:lla ja ravisteltiin kuiviksi. Jokaiseen kuoppaan lisättiin 380 µl PBS/0,5 % gelatiinia. Levyjä inkuboitiin 37°C:ssa yksi tunti.

37°C:ssa inkuboinnin jälkeen levyt tyhjennettiin, huuhdeltiin 3 kertaa PBS:lla ja ravisteltiin kuiviksi. 100 µl:n

inkubointinäytteet, jotka sisälsivät monoklonaalista vasta-ainetta, lisättiin ennalta käsitellyn levyn yksittäisiin kuoppiin ja inkuboitiin 5 tuntia 37°C:ssa.

Inkuboinnin jälkeen levyt tyhjennettiin, huuhdeltiin 5 kertaa PBS:lla ja ravisteltiin kuiviksi. 100 µl liuosta, joka sisälsi biotinyloitua hevosen/anti-hiiri-IgG:tä, lisättiin jokaiseen kuoppaan. Tämä vasta-ainepreparaatti valmistettiin lisäämällä yksi tippa hevosen/anti-hiiri-IgG:tä (Vector Labs, Burlingame, California) 10 ml:aan PBS:a, joka sisälsi 1 % hevosen seerumia. Levyjä inkuboitiin 30 minuuttia 37°C:ssa.

Inkuboinnin jälkeen levyt tyhjennettiin, huuhdeltiin 5 kertaa PBS:lla ja ravisteltiin tyhjiksi. 100 µl ABC-kompleksia (Vector Labs, Burlingame, California) lisättiin jokaiseen kuoppaan. Levyjä inkuboitiin sen jälkeen huoneenlämmössä 30 minuuttia.

Levyt tyhjennettiin taas, huuhdeltiin 5 kertaa PBS:lla ja ravisteltiin kuiviksi. 100 µl p-nitrofenyylifosfaattiseosta (2 mg/ml p-nitrofenyylifosfaattia (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) 0,1 M natriumbikarbonaatissa, pH 9,4, ja 10 mM MgCl₂:ssa) lisättiin jokaiseen kuoppaan. Levyjä inkuboitiin 37°C:ssa pimeässä 30 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen levyt luettiin 405 nm:n absorbanssissa. sCD-4-konsentraatiot määritettiin standardikäyrältä, joka oli laadittu inkuboimalla tunnettuja puhdistetun sCD-4:n määriä OKT4A-vasta-aineen kanssa. Molempien proteiinien (V1J4 ja V1V2J4) todettiin sitoutuvan OKT4A-monoklonaalisen vasta-aineen kanssa tässä kilpailu-ELISA:ssa.

Esimerkki 3: Hiivan ilmentämisvektorien valmistaminen

Plasmidit, joita käytetään hiivan ilmentämisvektorien valmistamiseen sCD-4-proteiinien ilmentämiseksi, on johdettu perusvektorista pYSK102, joka on korkean kopioluvun omaava sukkulavektori (Rosenberg ym., Genetic Engineering 8:151 (1986)). Kaikilla sellaisilla plasmideilla on 823 emäsparin EcoRI-PstI-fragmentti hiivan TRP1-geenistä (Tsumper ja

Carbon, Gene 10: 157 (1980)), jossa on selektoitava markkeri; 2,0 kiloemäksen EcoRI-PstI-fragmentti hiivan 2 mikronin renkaasta (Hartley ja Donaldson, Nature 286:860 (1980)), jossa on hiivan replikaation aloituskohta; osa pBR322:sta (poistettu osa on BamHI-PvuII) (julkaisussa Cloning Vectors, Pouwels, Enger, Valk, toim., 1985), joka mahdollistaa replikaation ja selektion E. colissa ja hiivan promoottori-terminaattori-kappale, joka on liitetty pBR322:n HindIII- ja BamHI-kohtien väliin. Promoottori on joko 431 emäsparin BamHI-RsaI-fragmentti CUP1:stä, joka fragmentti on johdettu BamHI-EcoRI-fragmentista pYSK12:sta (Butt ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3332 (1984); Rosenberg ym., Genetic Engineering 8:151 (1986)) tai 1,1 kiloemäksen TDH3-promoottorisekvenssi (Holland ym., J. Biol. Chem. 255:2596 (1980)), joka on johdettu BamHI-EcoRI-fragmenttina plasmidista pYSK18 (Rosenberg ym., supra; Gorman ym., supra). Päätesekvenssi on 361 emäsparin KpnI-HindIII-fragmentti CYC1-geenistä (Smith ym., Cell 16:753 (1979). Promoottorin ja CYC1-fragmentin väliin voi liittää erilaisia synteettisiä sekvenssejä kuten jäljempänä on kuvattu.

pYSK147:n ja pYSK148:n valmistaminen: Plasmidit pYSK137 (CUP1-promoottori) ja pYSK138 (TDH3-promoottori) sisältävät synteettisen oligonukleotidisekvenssin EcoRI-kohdan promoottorisekvenssin 3'-päässä ja KpnI-kohdan terminaattorisekvenssin 5'-päässä välissä. Tämä synteettinen sekvenssi sisältää ainoat XhoI:n, NcoI:n ja SalI:n restriktiokohdat ylöspäin translaation päätekodonista kaikissa kolmessa lukujaksossa. Synteettisen linkkerin sekvenssi on:

GAATTCTCGAGCCATGGCCAGTCGACGTAGTTAAGTAGGTACC

Plasmidin pUCsT4 NcoI-SalI-fragmentti, joka sisälsi sCD-4-sekvenssin emäkset 124-1257, liitettiin NcoI:lla ja KpnI:llä katkaistuun pYSK137:ään tai pYSK138:aan, niin että lopputuloksena oli pYSK147 ja pYSK148 mainitussa järjestyksessä.

pYSK154:n ja pYSK155:n valmistaminen: Ubikitiinin fuusiogeenin ilmentämisvektorit sisältävät kasettiin sopivan synteettisen hiivan ubikitiinigeenin (Ecker ym., J. Biol. Chem. 262:3524 (1987)) promoottorin ja CYC1-terminaattorin välissä. Ubikitiinisekvenssi on samanlainen kuin Eckerin ja ym. julkaisema paitsi että AflII-KpnI-päätefragmentti oli korvattu oligonukleotidisekvenssillä, joka sisälsi NcoI-katkaisukohdan 3'-päässä. pYSK147:n NcoI-KpnI-fragmentti, joka sisälsi halutun sCD-4-sekvenssin, liitettiin tämän NcoI-kohdan ja KpnI-kohdan CYC1-fragmentin 5'-päässä väliin pYSK154:n aikaansaamiseksi. pYSK154:n johdannainen, josta sCD-4-sekvenssin ensimmäisen seitsemän aminopään aminohapon sekvenssi pYSK154:ssä (johtopeptidisekvenssit) poistettiin, valmistettiin katkaisemalla pYSK154 KpnI:llä, mitä seurasi täyttäminen E. colin DNA-polymeraasi-I:n (polIK) Klenow-fragmentilla ja pST4BBV1DHFR:n, joka oli käsitelty polIK:lla yhteen tarttuvien päiden täyttämiseksi, KpnI:llä ja XbaI:llä katkaistun sCD-4-sekvenssin (emäkset 145-1257 sCD-4:stä) liittämisen. Tämä plasmidi nimitettiin pYSK155:ksi.

pYSK159:n ja pYSK161:n valmistaminen: Vektorit, jotka sisälsivät lyhennetyn sCD-4-sekvenssin (emäkset 124-603) valmistettiin liittämällä synteettinen oligonukleotidisekvenssi, joka sisälsi päatekodonin, sCD-4-sekvenssin (emäs 602) SacI-kohtaan. Synteettisen liittäjämolekyylin (2-juosteisen) sekvenssi on:

CTAAGCGGC
TCGAGATTCGCCGGC

Synteettinen sekvenssi liitettiin SacI:llä ja NarI:llä katkaistuun pYSK148:aan ja pYSK154:ään pYSK159:n ja pYSK161:n valmistamiseksi mainitussa järjestyksessä. Näin ollen CD-4 pYSK159:ssä käsittää kodonit aminohapoille -9 (alaniini) - 151 (leusiini) (YV1).

Esimerkki 4: sT4:n ilmentyminen hiivaviljelmissä

Plasmidi-DNA:ta (2-10 µg/ml) käytettiin hiivan (Saccharomyces cerevisiae) transformoimiseen käyttämällä tavanomaisia

menetelmiä (Sherman ym., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor, 1986) ja etsimällä tryptofaaniprototrofeja. Käytetyt kannat olivat kanta F762 (Mata, *trp1* Δ 1, *ura3*-52) tai PEC1-8B (Mata, *proA* Δ :*URA3*-52, *trp1*-289, *his3*). Valittuja transformanttiviljelmiä kasvatettiin hiiva-typpialustalla (YNB, Difco, Detroit, Michigan), joka sisälsi lisäaineita (2 % glukoosia, 20 μ l/ml urasiilia, 20 μ l/ml histidiiniä). CUP1-promoottoria käyttäville plasmideille lisättiin kuparisulfaattia 100 mikromooliin asti. Viljelmät korjattiin myöhäisessä log-vaiheessa sentrifugoimalla ja pestiin ja rikottiin sen jälkeen. Solulysaatti analysoitiin sCD-4:n suhteen tavanomaisin immunoblottausmenetelmin.

*S. cerevisia*essa, joka sisälsi pYSK147:n ja pYSK148:n, sCD-4-proteiini, SKBYsCD-4 (aminohapot -9 - 369) ilmentyi vähäisessä määrin (vähemmän kuin 0,5 ng/l). Aktiivisuuden huomattiin liittyvän tiettyyn fraktioon, mutta se voitiin helposti saada liukoiseksi ei-ionisten detergenttien avulla. SKBYsCD-4:n määrä (aminohapot -9 - 369) *S. cerevisiae*-viljelmissä, jotka sisälsivät pYSK154, oli 2-6 mg/litra (pitoisuudessa 2×10^8 solua/ml). Tämä oli noin viisinkertainen parannus pYSK147:llä ja pYSK148:lla ilmenneen CD-4:n määrään, toisin sanoen ilman stabiloivan ubikitiinisekvenssin läsnäoloa. Syntetoidun sCD-4-proteiinin arvioitu koko oli sama kaikissa tapauksissa indikoiden, että proteiinin ubikitiiniosa oli poistettu SKBsCD-4:stä. Tämä vahvistettiin immunoblottaus-toimenpitein käyttämällä hiivan ubikitiinin vasta-ainetta.

Typistettyjen sCD-4-proteiinien (YV1) ilmentymisen tasot pYSK159:ssä ja pYSK161:ssä olivat samanlaiset kuin ubikitiinifuusiona ilmentyneen sCD-4-proteiinin. Havaitun sCD-4:n määrä oli samanlainen jokaisessa tutkitussa isäntäkannassa.

SKBSYCD-4 kannasta F762, joka sisälsi pYSK154:n, puhdistettiin osittain viemällä se S-Sepharose-pylvään läpi. Raaka uute, joka oli valmistettu 10 mM Tris-puskuriin, pH 6,0, ja 1 % Tween-20:een, sentrifugoitiin 30 000 x g. Supernatantti säädettiin pH 4,0:n ja vietiin S-Sepharose-pylväeseen, joka oli tasapainotettu 50 mM asetaattipuskurissa.

Näyte eluoitiin yhtenä eränä 50 mM MES [2-(N-morfolino)-etaanisulfonihappo, pH 6,0] -puskurilla, joka sisälsi 0,5 M NaCl:a. SKBYsCD-4:n läsnäolo eluaatissa varmistettiin immunoblottausmenetelmällä. Materiaali oli aktiivista, mikä todettiin kilpailu-ELISA:aan perustuvalla menetelmällä käyttämällä puhdistettua SKBSCD-4:ää CHO-soluista ja OKT4A-vasta-ainetta, mistä voidaan arvella, että hiivasta peräisin olevan SKBSYCD-4:n konformaatio muistuttaa nisäkässoluista (CHO) peräisin olevaa materiaalia.

Esimerkki 5: Streptomyces-vektorien valmistaminen

Käyttämällä rekombinantti-DNA-manipulaatioita ihmisen CD-4-cDNA-sekvenssin kappaleet liitettiin *S. longisporuksen* trypsiini-inhibiittori(LTI)-geenin signaalisekvenssiin ja *S. lividansin* β -galaktosidaasi(β gal)-geeniin. sCD-4-mini-geenit liitettiin *Streptomyces*-plasmideihin pIJ702 (Katz ym., supra) ja pIJ351:een (Kieser ym., supra) plasmidien pLTI:ST4/1, pLTI:ST4/7, pLTI:V1V2 ja pBgal:ST4/7:n luomiseksi. Vektorien rakenne oli seuraavanlainen.

pLTI:ST4/1:n valmistaminen: Plasmidi pLTI:ST4/1 valmistettiin kolmesta muusta plasmidista: pUCST4, pIJ351 ja PLTI450. Plasmidin pLTI450:n rakenne on seuraavanlainen:

pLTI450:n valmistaminen: 0,92 kiloemäksen SacI-KpnI-fragmentti, joka sisälsi LTI-geenin, liitettiin pUC18:aan, joka oli digestoitu SacI:llä ja KpnI:llä. Tämä plasmidi, pLTI520, digestoitiin osittain EagI:llä ja kokonaan SalI:llä ja sen jälkeen liitettiin synteettiseen liittäjämolekyyliin (2-juosteinen), jossa oli EagI- ja SalI-päät:

5'-GGCCGCCGCCCCCGCG

CGGCGGGGGCGCAGCT-5'

Tästä liitoksesta saaduista plasmideista seulottiin ne, joissa synteettinen liittäjämolekyyli oli liittynyt EagI-kohtaan, joka sijaitsee noin 0,5 kiloemästä SacI-kohdasta. Tämä EagI-kohta sijaitsee emäsparin 86 kohdalla suhteessa LTI-geenin 5'-päähän. Tuloksena ollut plasmidi sisälsi LTI-

promoottorin ja signaali-peptidin koodaussekvenssin ja signaali-peptidien poistokohdan. Sekä EagI- että SalI-kohtia voidaan käyttää SCD-4-minigeenien liittämiseen LTI-signaali-sekvenssiin.

pLTI:sT4/1:n valmistaminen: Plasmidin pLTI:sT4/1 valmistamiseksi SCD-4:ää koodaava sekvenssi eristettiin noin 1,1 kiloemäksen BbvI-PstI-fragmenttina pUCsT4:stä. Tämä fragmentti sisältää emäsparit 149-1257 CD-4-cDNA-sekvenssistä. Plasmidi pUCsT4 digestoitiin BbvI:llä, jonka jälkeen se käsiteltiin käänteistranskriptaasilla vapaiden 5'-päiden täyttämiseksi. DNA digestoitiin sitten PstI:llä. Tämä 1,1 kiloemäksen BbvI(RT)-PstI-fragmentti, joka koodaa SKBCD-4:ää, liitettiin pLTI450:een, joka oli käsitelty SalI:llä ja käänteistranskriptaasilla, jota oli seurannut PstI-digestointi. Tämän liitoksen seurauksena oli plasmidi pLTI450sT4/1. Viimeinen vaihe pLTI:sT4/1:n valmistamisessa vaati Streptomycesin replikaatiotoimintojen liittämisen pLTI-450sT4/1:een. Tämä täydennettiin digestoimalla pIJ351 (Kieser ym., supra) PstI:llä ja liittämällä se PstI:llä digestoituu pLTI450sT4/1:een.

pLTI:sT4/7:n valmistaminen: Plasmidi pLTI:sT4/7 valmistettiin kolmesta muusta plasmidista: pUCsT4, pIJ702 ja pLTI450. Plasmidin pLTI:sT4/7:n valmistamiseksi SCD-4:ää koodaava sekvenssi eristettiin noin 1,1 kiloemäksen NcoI-PstI-fragmenttina pUCsT4:stä. Tämä fragmentti sisältää emäsparit 124-1257 ihmisen CD-4-cDNA-sekvenssistä. Nämä emäsparit asetettiin ATG-aloituskodonin ja TAA-lopetuskodonin väliin kuten esimerkissä 1 on kuvattu. Aloituskodoni kuuluu osana NcoI-tunnistuskohdaksi. SCD-4:ää koodaava sekvenssi, joka sisältyy tähän fragmenttiin, sisältää 9 aminohappoa CD-4:n johtosekvenssistä. pUCsT4:ää käsiteltiin NcoI:llä ja käänteistranskriptaasilla, jota seurasi digestointi PstI:llä.

Tämä fragmentti liitettiin sen jälkeen pLTI450:een, joka oli käsitelty HincII:lla ja PstI:llä. Tämän liitoksen tuloksena oli plasmidi pLTI450sT4/7. Streptomyces-replikoni saatiin plasmidilta pIJ702 (Katz ym., supra). Se liitettiin

pLTI450st4/7:ään molempien plasmidien ainoiden PstI-kohtien kautta plasmidin pLTI:st4:n valmistamiseksi.

Plasmidin pLTI:V1V2:n valmistaminen: Plasmidi pLTI:V1V2 oli valmistettu plasmideista psT4.184, pLTI450 ja pIJ351. 0,54 kiloemäksen XbaI-EcoRI-fragmentti eristettiin psT4.184:stä. Tämä fragmentti käsiteltiin BbvI:llä ja käänteistranskriptaasilla. BbvI-pää vastaa ihmisen CD-4-cDNA-sekvenssin emäsparia 149. Tämä tasapäinen fragmentti liitettiin pLTI450:een, joka oli käsitelty SalI:llä ja käänteistranskriptaasilla plasmidin pLTI450V1V2 valmistamiseksi. Streptomycesin replikaatiotoiminnot saatiin pIJ351:ltä. Tämä plasmidi kloonattiin pLTI450V1V2:een ainoan sekä pIJ351:ssä että pLTI450V1V2:ssa olevan PstI-kohdan kautta. Tuloksena ollut plasmidi oli pLTI:V1V2.

pβgalst4/7:n valmistaminen: Plasmidi pβgalst4/7 valmistettiin plasmideista pUCsT4, pIJ702 ja p3SSXMCP. p3SSXMCP on pUC9:n (Vieira ja Messing, Gene 19:259 (1982)) johdannainen, joka sisältää β-galaktosidaasipromoottorin ja signaalisekvenssin. 26 emäsparia alaspäin signaalipeptidin koodaussekvenssistä on XmnI-kohta (Eckhardt ym., J. Bacteriol. 169: 4249 (1987)). Tähän kohtaan oli liitetty synteettinen liittäjä-molekyyli, joka sisältää BamHI:n tunnistuskohdan (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) plasmidin p3SSX10:n luomiseksi. Tämä vektori oli käsitelty BamHI:llä ja käänteistranskriptaasilla, mitä seurasi XhoI-digestointi. Tähän vektoriin oli liitetty fragmentti, jossa oli NcoI-pää, jota oli käsitelty käänteistranskriptaasilla tasapään ja SalI-pään luomiseksi. Täytetyn BamHI-kohdan liittämisen täytettyyn NcoI-kohtaan loi uudestaan sekä BamHI- että NcoI-kohdat. Tuloksena oli plasmidi p3SSXMCP. pUCsT4 käsiteltiin XbaI:llä ja käänteistranskriptaasilla, mitä seurasi digestointi NcoI:llä. Tämä 1,1 kiloemäksen NcoI-XbaI(RT)-fragmentti liitettiin sen jälkeen p3SSXMPC:hen, joka oli käsitelty SacI:llä ja T4-DNA-polymeraasi I:llä, mitä seurasi digestointi NcoI:llä. Streptomycesin replikaatiotoiminnot saatiin pIJ702:lta, joka oli liitetty p3SSXst4:ään molempien

plasmidien ainoan BglII-kohdan kautta. Tuloksena oli plasmidi p β galST4/7.

Esimerkki 6: sCD-4-minigeenien ilmentyminen Streptomycesissä:

Plasmidit pLTI:ST4/1, pLTI:ST4/7, pLTI:V1V2 ja p β gal:ST4/7 transformoitiin *S. lividans* 1326:een (Bibb ym., supra). Lisäksi pLTI:ST4/1, pLTI:ST4/7 ja pLTI:V1V2 vietiin *S. coelicolor* M124:ään (Hopwood ym., Genetic Manipulation of *Streptomyces* - A Laboratory Manual, F. Crowe & Sons, Ltd., Norwich, England (1985)), *S. albus* J1074:ään (Chater ja Wilde, J. Gen. Microbiol. 116:323 (1980)) ja *S. longisporuksen* (ATCC:n talletusnumero 23931) valkoiseen johdannaiseen. Kaikki plasmidit vietiin eri isäntiin käyttämällä menetelmää, jonka aikaisemmin on kuvannut Thompson ym., J. Bacteriol. 151:668 (1982). Transformantit seulottiin peittämällä transformaatiomaljat 3 ml:lla 0,4-%:ta agarua, joka sisälsi 100 μ g/ml tiostreptonia.

Kloonit, jotka ilmensivät CD-4-minigeenejä, identifioitiin lisäämällä tiostreptoni-resistenttejä transformantteja kymmenessä millilitrassa tryptikaasi-soija-lihalientä plus 5 μ g/ml tiostreptonia 48-72 tunnin ajaksi. Viljelmien supernatantit ja solulysaatit erotettiin 12 % polyakryyliamidi-(30:0,8 akryyliamidi:bis) - 1 % natriumdodekyylisulfaattigeelissä ja sen jälkeen ne siirrettiin nitroselluloosalle (Towbin ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350 (1979)). Nitroselluloosafiltteri käsiteltiin koettimella käyttämällä kanin sCD-4-antiseerumia kuten Deen ym., supra ovat kuvanneet.

Kaikki *S. lividansin* pLTI:ST4/1-, pLTI:ST4/7- ja p β gal:ST4-transformantit ilmensivät noin 45 kilodaltonin proteiinia, joka on näiden plasmidien koodaaman sCD-4-proteiinin arvioitu koko. Samalla tavalla *S. lividansin* pLTI:V1V2-transformantit ilmensivät noin 20 kilodaltonin proteiinia, joka on V1V2-proteiinin arvioitu koko. SKBsCD-4:n ja V1V2J4:n ilmentyminen tutkittiin myös *S. coelicolorissa*, *S. albuksessa* ja *S. longisporuksessa*. Kuten *S. lividansissakin* 45

kilodaltonin (pLTI:ST4/1- ja pLTI:ST4/7-transformantit) ja 20 kilodaltonin (pLTI:V1V2-transformantit) proteiinit ilmentyivät muissakin *Streptomyces*-lajeissa.

Seurannut *S. lividans* -viljelmien supernatanttien ja solulysaattien sisältämän SKBsCD-4:n määrittäminen osoitti 1-5 mg/l tasoja. V1V2J4:ää oli 2-10 mg/l sekä viljelmien supernatanteissa että solulysaateissa. Vähemmän kuin 1 mg/l ilmensivät *S. lividans* -transformanttien p β gal:ST4.

Käyttämällä *S. lividans*in pLTI:ST4/7-solulinjaa SKBsCD:n ilmentymistä on tutkittu myös 12 litran fermenttorissa. Samalla tavalla kuin pienenkin mittakaavan tutkimuksissa soluja kasvatettiin tryptikaasi-soija-lihaliemessä plus 5 μ g/ml tiostreptonia. Sekä viljelmän supernatantit että solulysaatit analysoitiin SKBsCD-4:n ilmentymisen suhteen 7,5, 24, 31,5, 54 ja 72 tuntia siirrostuksen jälkeen. Tilavuudeltaan suurin ilmentymistaso oli 60 mg/l ja se saavutettiin 24 tuntia siirrostuksen jälkeen. SKBsCD-4 oli tasaisesti levinnyt viljelmän supernatantin ja koskemattomien solujen välillä.

Osittain puhdistettujen supernatanttien, jotka sisälsivät V1V2J4:ää ja SKBsCD-4:ää, osoitettiin kilpailu-ELISalla sitoutuvan OKT4A:han osoittaen, että nämä *Streptomyces*istä peräisin olevat proteiinit ovat HIV:iin sitoutuvia proteiineja.

HIV-sitoutuva proteiini, V1J4, oli samalla tavalla sitoutunut LTI-promoottoriin ja western-analyysissä osoitti ilmentyvän *S. lividans*issa.

Edellä mainitut esimerkit osoittavat, että CD-4:stä johdetut HIV-sitoutuvat proteiinit, esim. SKBsCD-4, SKBysCD-4, V1J4, V1V2J4 ja YV1, joita keksinnön rekombinanttiorganismit ilmensivät ja erittivät, ovat HIV-sitoutuvia proteiineja, joilla on sCD-4:n HIV-sitoutumistoiminto. Erityisesti niillä on SKBsCD-4:n V1-alueen HIV-sitoutumisalue.

Edellä oleva kuvaus ja esimerkit kuvaavat keksinnön kokonaisuudessaan sisältäen sen parhaana pidetyt toteutustavat. Toteutustapojen, jotka nimenomaan on tässä kuvattu, muunnokset ja parannukset kuuluvat seuraavien vaatimusten piiriin.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä HIV-sitoutuvan proteiinin tuottamiseksi, tunnettu siitä, että se käsittää E. coli -solujen, jotka on transformoitu vektorilla, joka käsittää HIV-sitoutuvan proteiinin koodaussekvenssin toimivasti liitettynä säätelyosaan, viljelyn ja HIV-sitoutuvan proteiinin keräämisen niistä.
2. Menetelmä HIV-sitoutuvan proteiinin tuottamiseksi, käsittää Streptomyces-solujen, jotka on transformoitu vektorilla, joka käsittää HIV-sitoutuvan proteiinin koodaussekvenssin toimivasti liitettynä säätelyosaan, viljelyn ja HIV-sitoutuvan proteiinin keräämisen niistä.
3. Menetelmä HIV-sitoutuvan proteiinin tuottamiseksi, käsittää hiivasolujen, jotka on transformoitu vektorilla, joka käsittää HIV-sitoutuvan proteiinin koodaussekvenssin toimivasti liitettynä säätelyosaan, viljelyn ja HIV-sitoutuvan proteiinin keräämisen niistä.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Antennustutkimusta ei ole tehty.

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkittö hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschriften) numeron eteen K ja P.
etteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

2.7.91 P. H. K.

Allekirjoitus