(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 861626 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 861626

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/48
C12N 1/21
C12N 7/01
C07K 14/155
G01N 33/569

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **17.04.1986**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **17.04.1986**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **20.10.1986**

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

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

19.04.1985 US 725021

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **F. Hoffmann-La Roche AG,** 4002 Basel, Switzerland, SVEITSI, (CH)
2 • **The Government of the United States as,** Wash. D.C., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Crowl, Robert Mitchell,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Gallo, Charles Robert,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Reddy, Eragam Premkumar,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • **Shaw, George Meade,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 • **Wong-Staal, Flossie Yeeching,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Hankitun immuunipuutosoireryhmän (AIDS) -virusperäinen yhdistelmävaippaproteiini sekä AIDS:n testausmenetelmä.
Förvärvat immunbristsyndrom (AIDS) -relaterat viralt rekombinant höljeprotein samt ett testförfarande för AIDS.

Hankitun immuunipuutosoireryhmän (AIDS) virusperäinen yhdistelmävaippaproteiini sekä AIDS:n testausmenetelmä

Kyseessä oleva keksintö koskee proteiinia, jota nimitetään env AIDS:ksi, joka on hankitun immuunipuutossyndrooman etiologisen tekijän virusperäinen kuoriproteiini, ekspressiovektoria, joka koodittaa env AIDS:a, env AIDS:n valmistamista yhdistelmä-DNA-tekniikkaa käyttämällä sekä menetelmää AIDS:n vasta-aineiden läsnäolon havaitsemiseksi humaani veressä.

Vuodesta 1981 lähtien tähän päivään mennessä on useammalla kuin 8000 ihmisellä tehty hankitun immuunipuutossyndrooman (AIDS) diagnoosi [N.Y. Times, A-11, tammikuun 11. p:nä, 1985]. AIDS:a on luonnehdittu ankarien opportunististen infektioiden avulla, jotka ovat sekundaarisia kehon immuunijärjestelmään kohdistuvalle vaikutukselle [Gottlieb, M.S. et al., "Pneumocystis Carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in previously helthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency", N. Eng. J. Med. 305, 1426-1431 (1981)]. Sairaus on havaittu miespuolisilla homoseksuaaleilla, potilailla, jotka saavat verivalmisteita, laskimonsisäistä huumausainetta käyttävillä narkootikoilla sekä henkilöillä, jotka ovat peräisin Haitilta ja Keski-Afrikasta [Piot, P. et al., "Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire", Lancet 11, 65-69 (1984)]. Aiheuttajan oletettiin olevan virusperäisen, koska AIDS:n etiologinen kuva oli yhdenmukainen tarttuvan taudin kanssa. Ainakin kolme (3) retrovirusta on eristetty useiden AIDS-potilaiden viljellyistä T-soluista tai valkosoluista henkilöiltä, jotka olivat alttiina sairaudelle. Löydettiin uusi humaani retrovirus, nimeltään lymfa-adenopatiaan liittyvä (LAV) virus, ja sen ominaisuudet olivat johdonmukaiset sen etiologisen roolin kanssa AIDS:ssa. Tuo virus eristettiin potilaalta, jolla oli lymfa-adenopatia, ja nimi johtuu tästä [Montagnier, L. et al., "A New Human T-lymphotropic

retrovirus: characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndromes. In Human T-Cell leukemia/Lymphoma Virus, R.C. Gallo, M. Essex ja L. Gross, julkaisijat (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory) ss. 363-370]. On eristetty muita retroviruksia, erityisesti humaani T-soluleukemia-/lymfooma-/lymfotrooppisen viruksen kaksi alaryhmää, tyypit I ja III [HTLV I: Poiesz, B.J. et al., "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma", PNAS (USA) 77, 7415-7419 (1980), HTLV-III: Popovic, M. et al., "Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS", Science 224, 497-500 (1984)]. Vielä erästä toista virusta, AIDS:iin kytkeytyvää retrovirusta (ARV), ehdotettiin aiheuttajaksi [Levy, J.A. et al., "Isolation of lymphocytopathic retroviruses From San Francisco patients with AIDS". Science 225, 840-842 (1984)]. Sekä HTLV-III- ja ARV-retrovirusten biologiset sekä sero-epidemiologiset ominaisuudet ovat samankaltaiset kuin LAV:lla [Levy J.A. et al., supra, Popovic, M. et al., supra]. Kuten yllä esitetystä käy ilmi, ainakin kolme (3) retrovirusta on oletettu AIDS:n aiheuttajiksi: LAV, ARV sekä HTLV:n alatyypit I ja III.

LAV-, HTLV III- ja ARV-II-perintötekijästö on kloonattu molekyylitasolla [Schüpbach, J. et al., "Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) assosiated with AIDS", Science 224, 503-505 (1984); Alizon, M. et al., "Molecular Cloning of lymphadenopathy - associated virus", Nature 312, 757-760 (1984)]. LAV:n, ARV:n ja HTLV III:n provirusgenomien täydellinen nukleotidisekvenssi on määritetty [Ratner et al., "Complete nucleotide sequence of AIDS virus, HTLV III"; Nature 313, 277-284 (1985); Sanchez-Pescador, R. et al., "Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2)", Science 227, 484-492 (1985); Wain-Hobson, S.

et al., "Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV", Cell 40, 9-17 (1985)].

Eräs syy vaikeuteen määrittää AIDS:n etiologinen tekijä johtui erilaisten retrovirusantigeenien reaktiosta AIDS-potilaiden seeruminäytteiden kanssa. Esim. AIDS-potilaiden seeruminäytteiden on osoitettu reagoivan HTLV I:n ja HTLV III:n antigeenien kanssa [HTLV-I: Essex, M. et al., "Antibodies to Cell Membrane Antigens Associated with Human T-cell leukemia Virus in Patients with AIDS", Science 220, 859-862 (1983); HTLV-III: Sarngadharan, M.G. et al., "Antibodies Reactive With Human T-Lymphotropic Retroviruses (HTLV-III) in the Serum of Patients With AIDS", Science 224, 506-508 (1984)]. HTLV:n kuorigeenin tuotteiden havainnollistettiin ristireagoivan aikuisten T-solu-leukemiapotilaiden seerumin vasta-aineiden kanssa [Kiyokawa, T. et al., "Envelope proteins of human T-cell leukemia virus: Expression in Escherichia coli and its application to studies of env gene functions", PNAS (USA) 81, 6202-6206 (1984)]. Aikuisten T-solu-leukemiat (ATL) eroavat hankitusta immuunipuutossyndroomasta (AIDS) siinä, että HTLV-I aiheuttaa T-solujen pahanlaatuisuudet, se on T-solun säännöstelemättömän kasvun. AIDS:ssa tapahtuu solun kasvun sijasta solun kuolema. Itse asiassa tämä HTLV III:n soluja vahingoittava ominaisuus oli ratkaiseva määritettäessä viime kädessä sairauden spesifistä retrovirusperäistä syytä. Täten eristettiin AIDS:n etiologinen tekijä käyttämällä eläviä neoplastisia humaani T-solupolvia (HT), jotka oli infektoitu AIDS:lle ominaisella soluja vahingoittavalla retroviruksella, joka oli eristetty AIDS:a potevalta potilaalta. Seroepidemiologiset määritykset, joissa käytettiin tätä virusta, ilmaisivat täydellisen korrelaation vallitsevan AIDS:n ja HTLV III -antigeenien vasta-aineiden läsnäolon välillä [Sarngadharan, M.G. et al., supra; Schüpbach, J. et al., supra]. Lisäksi lähes 85 %:lla potilaita, joilla oli lymfa-adenopatiasyndrooma, sekä merkittävällä osalla oireettomia homoseksuaalisia miehiä AIDS:n endeemisillä

alueilla oli havaittu myös kantavan kiertäviä vasta-aineita HTLV III:lle. Nämä kaikki tiedot yhteensä ilmaisevat HTLV III:n olevan AIDS:n etiologisen tekijän.

AIDS-viruksen AIDS-proteiinia ei ole eristetty, ennen kuin AIDS-virusta on viljelty menestyksellisesti käyttämällä H-9-solupolvea [PCT-hakemus, julkaisu nro WO 85/04897], AIDS-viruksen env AIDS-proteiinia ei ole eristetty, karakterisoitu tai syntetisoitu. Suurimmaksi osaksi tämä johtuu siitä tosiasiasta, että virus on soluja vaurioittava ja viruksen eristäminen ei täten ole mahdollista [Popovic, M. et al., supra]. Kun kerran löydettiin humaani T-solupolvi, joka on resistentti viruksen soluja vaurioittaville vaikutuksille, voitiin saada aikaan proviruksen DNA:n molekyyliklooni.

Herkän ja nopean menetelmän tarve AIDS:n diagnoosin tekemiseksi ihmisverestä sekä sen estämiseksi rokotuksen avulla on hyvin suuri. Tosiasiallisesti, kaikki pitoisuusmääritykset/testit, joita on tällä hetkellä saatavissa, ovat tulvillaan virheitä. Itse asiassa the Center for Disease Control (CDC) on osoittanut, että tällä hetkellä saatavissa olevia testejä on käytettävä yksinomaan HTLV III:n vasta-aineen yksiköiden seulontaan verestä. The CDC jatkaa edelleen toteamalla, että tällä hetkellä saatavia ELISA-testejä ei voida käyttää alttiina olevan väestön seulontaan tai AIDS:n diagnoosin tekemiseen [Federal Register 50(48), 9909, maaliskuun 12. päivänä, 1985]. Virheet on todettu syyksi epäonnistumiseen AIDS:n etiologisen tekijän spesifisen antigeeniproteiinin käytössä. Aiemmin käytetyt proteiinit olivat peräisin virusten hajoamistuotteista. Koska hajoamistuote valmistetaan humaani soluista, jotka on infektoitu viruksella, se on, soluista, joita on käytetty viruksen kasvattamiseen, hajoamistuote sisältää humaani proteiineja sekä virusperäisiä proteiineja. Täten virusperäisen proteiinin puhtaan antigeenin valmistus on hyvin vaikeaa. Käytetty antigeeni antoi sekä vääriä positiivisia että vääriä negatiivisia tuloksia [Budiansky,

S., "AIDS Screening, False Test Results Raise Doubts", Nature 312, 583 (1984)7. Sellaisten hajotustuotteiden sisältämien proteiinien/peptidien aiheuttamat virheet voidaan välttää käyttämällä AIDS-vasta-aineiden sitomiseen komponentteja, jotka ovat suurin piirtein vapaita non-AIDS-spesifisten proteiinien suhteen. Koostumuksia, jotka ovat suurin piirtein puhdasta AIDS-kuoriproteiinia, voidaan käyttää antigeeneina.

Kyseessä olevan keksinnön mukaisen kuoriproteiinin on havaittu säilyttäneen antigeenideterminantteja, jotka tekevät mahdolliseksi käyttää sitä infektion seulontaan, taudinmäärittelyyn ja/tai infektion estämiseen AIDS-viruksella suoritetun rokotuksen avulla. Kyseessä oleva keksintö havainnollistaa, että kuoriproteiini säilytettyine antigeenideterminantteineen sisältää kaikki muunnokset, jotka on väitetty ainoaksi etiologiseksi tekijäksi.

Kyseessä olevan keksinnön mukainen kuoriproteiini saatetaan valmistaa tavanomaisin tunnetuin menetelmin. Menetelmät, joilla uutta proteiinia saatetaan valmistaa, voidaan jakaa kolmeen ryhmään: (1) kemiallinen synteesi; (2) geenin valmistus kemiallisen synteesin avulla, syntetisoidun geenin insertointi isäntään sekä proteiinin valmistaminen isännän avulla; sekä (3) vastaava geeni, joka on saatu biotekniikan avulla, insertoidaan isäntään ja isäntä valmistaa proteiinin.

Kyseessä olevan keksinnön eräässä suoritusmuodossa käytetään hyväksi yhdistelmä-DNA-tekniikkaa, jolla luonnonmukaisista lähteistä saatu env AIDS DNA viedään soluun env AIDS proteiinin valmistamiseksi. Eräs menetelmä env AIDS:a koodittavan DNA:n saamiseksi on lukea geneettinen koodi käänteisesti sekä syntetisoida oligodidesoksinukleotidi, joka koodittaisi env AIDS:n aminohapposekvenssiä. Koska env proteiinia ei ole eristetty tai karakterisoitu, tätä lähestymistapaa ei ole voitu noudattaa.

Vaihtoehtoisesti geenin ilmentyminen voidaan saada aikaan käyttämällä yhdistelmä-DNA-tekniikkaa, jos käytetään

luonnonmukaisista lähteistä eristettyä DNA:a synteettisen DNA:n sijasta.

Kyseessä oleva keksintö koskee HTLV III env geenin järjestämistä sopiviin ilmentymisvektoreihin; isäntäorganismin transformaatiota sellaisilla ekspressiovektoreilla; sekä AIDS kuoriproteiinin (env AIDS) valmistamista viljelemällä sellaisia transformoituja soluja. Kyseessä olevan keksinnön eräs toinen näkökohta koskee syntyvän yhdistelmä-env AIDS-proteiinin eristämistä ja käyttöä.

Kyseessä olevan keksinnön eräänä toisena näkökohtana on proviruksen DNA-sekvenssin identifiointi sekä määrittäminen. Tarkemmin sanottuna, kyseessä olevan keksinnön tämä näkökohta koskee AIDS:n, se on lymfa-adenopatiaan liittyvän viruksen (LAV), AIDS:iin kytkeytyvän retroviruksen (ARV) ja humaani T-solu-leukemia-/lymfooma-/lymfotrooppisen virustyypin III (HTLV III), sisältämän etiologisen tekijän kuorigeenien provirusnukleotidisekvenssin määrittämisen ja vertailun.

Kyseessä olevan keksinnön eräs toinen näkökohta koskee taudinmääritysmenetelmää humaani veren testaamiseksi env AIDS proteiinin vasta-aineiden läsnäolon suhteen. Kyseessä olevan keksinnön tämä puoli voittaa AIDS:n tutkimiseen aiemmin käytettyjen veritestien ongelmat. Eräs ongelmista on koostumusten käyttö sidottaessa AIDS:n vastaainetta, joka sisältää proteiineja tai peptidejä, jotka eivät ole yksinomaan peräisin AIDS:n etiologiselta tekijältä. Koostumus, jossa käytetään kyseessä olevan keksinnön mukaista, homogeenista AIDS-kuoriproteiinia, voittaa aiempien testien ja pitoisuusmääritysten epäspesifisyyden. Vielä eräs kyseessä olevan keksinnön mukainen näkökohta on diagnostinen menetelmä antigeenin läsnäolon havaitsemiseksi ja/tai määrittämiseksi humaani verestä.

Kyseessä olevan keksinnön eräänä näkökohtana on käyttää kyseessä olevan keksinnön mukaisia env AIDS proteiineja antigeeneinä, jotka soveltuvat antamaan suojaavan immuniteetin AIDS:ia vastaan, kun niitä sisällytetään rokotteeseen.

Kuvio 1. HTLV-III-proviruksen genomin (HXB-3) kuorigeenin nukleotidisekvenssi.

Kuvio 2. AIDS:n sisältämän viiden etiologisen tekijän env-proteiinin aminohapposekvenssin vertailu. Aminohapposekvenssit on asetettu suoraan riviin suurimman homologian saamiseksi.

Kuvio 3. PEV/env44-640 ekspressioplasmidin konstruktio. Ylempi vasen alaryhmä esittää HTLV-III-genomin 3,15 Kb EcoRI-XhoI-segmentin yksinkertaistettua restriktiokohdan karttaa, joka sisältää env-koodittavan alueen (ristiviivoitettu alue). Oikeanpuoleinen alaryhmä esittää pEV-vrf-plasmidien rakennetta ja asiaankuuluvia sekvenssejä. Yhtenäinen, musta alue esittää synteettisiä ribosomin sitoutumiskohdan sekvenssejä yläpuolella ATG-aloituskodonista (viivoitettu). Katso esimerkki 2, joka koskee env ekspressioplasmidikonstruktioiden yksityiskohtaista kuvausta.

Kuvio 4. E. colissa valmistettujen, env:n koodittamien antigeenien "Western blot"-analyysi. Koko bakteeriperäinen proteiini eroteltiin SDS-PAGE:lla, "elektroblotattiin" nitroselluloosasuodattimelle ja env:n koodittamat proteiinit havaittiin humaani seerumin kanssa tapahtuvan reaktion avulla esimerkissä 5 kuvatulla tavalla: a) negatiivinen kontrolli, pJCL-E30:ä (p21T) sisältäviä soluja indusoitiin 42°C:ssa 2 tunnin ajan; b) indusoimaton kontrolli, pEV3/env44-640:aa sisältäviä soluja pidettiin yllä 30°C:ssa; c) pEV3/env44-640:a, d) pEVI/env44-640:a ja e) pEV3/env205-640:a indusoitiin 42°C:ssa 2 tunnin ajan.

Kuvio 5. Bakteerin avulla syntetisoidun HTLV-III env geenin tuotteiden tunnistaminen AIDS-potilaan seerumiin sisältyvien vasta-aineiden avulla. Bakteerien hajoamistuotteille, jotka sisälsivät yhdistelmä-env-proteiineja, suoritettiin "Western blot"-analyysi esimerkissä 5 kuvatulla tavalla. Yksittäisiä kaistaleita inkuboitiin sitten yksittäisten seerumeiden 1000-kertaisella laimennuksella,

mitä seurasi käsittely ^{125}J-merkatulla proteiini A:lla. (Yläosa) seeruminäytteet olivat seuraavilta luovuttajilta: (sarake 1) normaali, terve luovuttaja; (sarakkeet 2-18) AIDS-potilasseerumi, joka on koottu USA:n länsirannikolta. (Alaosa) seeruminäytteitä otettiin seuraavilta luovuttajilta: (sarake 1) Elisan avulla, käyttämällä hajotettuja viruksia, luovuttajan havaittiin olevan HTLV-1(+); (sarakkeet 4, 5, 11 ja 15) terveitä, normaaleja luovuttajia; (sarakkeet 2, 3, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 16, 17 ja 18) AIDS-potilaan seerumi USA:n itärannikolta.

Kuvio 6A. AIDS-kuoriproteiinin aminohapposekvenssi.

Kuvio 6B. AIDS-kuoriproteiinin aminohappojakaantuma.

Kuvio 7. Ekspressiovektorin pRC23 konstruktio. Shine-Dalgarno-sekvenssin (SD) yläpuolelle on vedetty viiva, ja ribosomin synteettisen sitoutumiskohdan paikka plasmidissa on esitetty yhtenäisen mustan segmentin avulla. Plasmidi sisältää täten pBR322:n koko sekvenssin ja antaa täten resistenssin sekä ampisilliiniä (amp^R) että tetrasykliiniä (tet^R) kohtaan.

Kuvio 8. PEV-vrf-vektoreiden konstruktio. Kullekin plasmidille, synteettiset oligonukleotidit, jotka oli asetettu pRC23:ssa SD-sekvenssin alapuolelle, esitetään restriktioentsyymin pilkkomiskohtien sijaintien avulla. ATG-aloituskodonin yläpuolelle on vedetty viiva, ja lisäksi tulevia A-T-emäspareja merkitään suorakulmion avulla. Plasmidit antavat resistenssin ainoastaan ampisilliinille.

Kyseessä olevan keksinnön kuvauksessa käytetään seuraavia termejä:

Nukleotidi: DNA:n monomeeriyksikkö, joka koostuu sokeriosasta (pentoosi), fosfaatista ja joko puriini- tai pyrimidiiniemäksestä (typpeä sisältävästä heterosyklisestä yhdisteestä). Emäs liittyy sokeriosaan glykosidisen hiilen välityksellä (pentoosin 1' hiili). Tätä emäksen ja sokerin yhdistelmää nimitetään nukleosidiksi. Kutakin nukleotidia luonnehditaan sen emäksen avulla. Neljä DNA-emästä ovat adeniini ("A"), guaniini ("G"), sytosiini ("C") sekä tymiini ("T").

DNA-sekvenssi: Viereisten pentoosien 3'- ja 5'-hiilien välisten fosfodiesterisidoksin toisiinsa yhdistettyjen nukleotidien lineaarinen järjestys.

Kodoni: Kolmen nukleotidin (tripletin) muodostama DNA-sekvenssi, joka koodittaa mRNA:n välityksellä aminohappoa, translaation aloitussignaali tai translaation lopetussignaali. Esimerkiksi, nukleotiditripletit TTA, TTG, CTT, CTC, CTA sekä CTG koodittavat aminohappo leusiinia ("Leu"). TAG, TAA sekä TGA ovat translaation lopetussignaaleja ja ATG on translaation aloitussignaali.

Lukuvaiheistus: Kodonien ryhmitys mRNA:n translaation aikana aminohapposekvensseiksi. Translaation aikana täytyy säilyttää sopiva lukuvaiheistus. Esimerkiksi sekvenssi GCTGGTTGTAAG saatetaan lukea kolmessa lukuraamissa tai -vaiheistuksessa, joista kukin antaa erilaisen aminohapposekvenssin:

GCT GGT TGT AAG= Ala-Gly-Cys-Lys

G CTG GTT GTA AG= Leu-Val-Val

GC TGG TTG TAA G= Trp-Leu-(lopetus)

Polypeptidi: Aminohappojen lineaarinen järjestys, aminohapot on yhdistetty toisiinsa vierekkäisten aminohappojen -amino- ja karboksyyliryhmien välisten peptidisidosten avulla.

Genomi: Solun tai viruksen koko DNA. Se sisältää muun muassa rakennegeenit, jotka koodittavat aineen polypeptidejä, sekä operaattorin, promoottorin ja ribosomin sitoutumis- ja vuorovaikutussekvenssit, kuten esimerkiksi Shine-Dalgarno-sekvenssit mukaanluettuina.

Rakennegeeni: DNA-sekvenssi, joka koodittaa templaattinsa tai lähetti-RNA:nsa ("mRNA") välityksellä aminohappojen sekvenssin, joka on ominainen spesifiselle polypeptidille.

Translaatio: Tapahtuma, jossa mRNA:sta valmistetaan polypeptidi.

Ekspressio: Tapahtuma, jonka rakennegeeni läpäisee polypeptidin valmistamiseksi. Se on transkription ja translaation yhdistelmä.

Plasmidi: Rengasmainen, kaksisäikeinen DNA-molekyyli, joka ei ole osa organismin pääkromosomia, sisältäen geenit, jotka antavat resistenssin spesifisiä antibiootteja vastaan. Kun plasmidi sijoitetaan yksisoluiseen organismiin, tuon organismin ominaisuuksia saatetaan muuttaa tai transformoida plasmidin DNA:n avulla. Esimerkiksi, plasmidi, joka kantaa tetrasykliiniresistenssin geeniä (Tet^R), transformoi solun, joka aiemmin oli herkkä tetrasykliinille, soluksi, joka on resistentti tälle antibiootille. Plasmidin transformoimaa solua nimitetään "transformantiksi".

Kloonausvehikkeli:

Plasmidi, faagi-DNA tai muut DNA-sekvenssit, jotka pystyvät replikoitumaan isäntäsolussa, joille on ominaista yksi endonukleaasin tunnistamiskohta tai pieni joukko endonukleaasin tunnistamiskohtia, joissa kohdissa sellaiset DNA-sekvenssit voidaan leikata määritettävissä olevalla tavalla ilman siihen liittyvää, DNA:n luonteenomaisen biologisen tehtävän häviämistä, esimerkiksi replikoitumista, kuoriproteiinien valmistamista tai promoottori- tai sitoutumiskohtien häviämistä, ja joka sisältää markkerin, joka soveltuu käytettäväksi transformoitujen solujen identifioimiseen, esimerkiksi tetrasykliini- tai ampisilliiniresistenssin. Kloonausvehikkeliä nimitetään usein vektoriksi.

Kloonaus: Menetelmä organismin populaation tai sellaisesta organismista peräisin olevien DNA-sekvenssien tai sekvenssin saamiseksi suvuttoman lisääntymisen avulla.

Yhdistelmä-DNA-molekyyli eli hybridi-DNA: Molekyyli, joka käsittää DNA:n segmenttejä, jotka ovat peräisin eri genomeista ja jotka on liitetty päittäin yhteen elävien solujen ulkopuolella ja joilla on kyky infektoida isäntäsolu ja säilyä siinä.

Peptidien ja proteiinien määrittelyyn käytetty nimistö on nimistö, jota käytetään tavanomaisen kuvauksen yhteydessä siten, että N-päässä sijaitseva aminoryhmä on vasemmalla ja C-päässä sijaitseva karboksyyliryhmä on oi-

kealla. Luonnonmukaisilla aminohapoilla tarkoitetaan aminohappoja, jotka esiintyvät yleisesti luonnonmukaisissa proteiineissa, käsittäen aminohapot Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp ja His. Nle merkitsee norleusiinia ja Nva tarkoittaa norvaliinia. Siinä tapauksessa että L- ja D-muodot ovat mahdollisia, esitetään aminohapon L-muoto, jollei toisin ole mainittu. Lisäksi, aminohapot on merkitty aakkosten mukaisin, spesifisin kirjaimin siten että: A = alaniini; B = asparagiinihappo tai asparagiini; C = kysteiini; D = asparagiinihappo; E = glutamiinihappo; F = fenyylialaniini; G = glysiini; H = histidiini; I = isoleusiini; K = lysiini; L = leusiini; M = metioniini; N = asparagiini; P = proliini; Q = glutamiini; R = arginiini; S = seriini; T = treoniini; V = valiini; W = tryptofaani; Y = tyrosiini; Z = glutamiini tai glutamiinihappo.

Kyseessä olevan keksinnön mukaisesti, hankitun immuunipuutossyndrooman (AIDS) etiologisen tekijän kuoriproteiinin tutkimus on johtanut AIDS-viruksen provirusgeenin eristämiseen ja sekventointiin. Nyt on havaittu, minkä uskotaan olevan ensimmäisen kerran, että AIDS:n etiologiset tekijät, lymfa-adenopatiaan kytkeytyvä virus, (LAV), AIDS:iin liittyvä retrovirus (ARV) sekä humaani T-soluleukemia-/lymfooma-/lymfotrooppinen virus (HTLV III) ovat itse asiassa saman viruksen muunnoksia. Kyseessä olevan keksinnön tarkoituksiin, patentin määrittelyssä ja vaatimuksissa AIDS:a aiheuttavaa virusta pidetään tässä yhteydessä AIDS-viruksena. AIDS-viruksen katsotaan käsittävän muunnokset, joita oletetaan AIDS:a aiheuttaviksi tekijöiksi, nimittäin LAV:n, ARV:n sekä HTLV III:n. AIDS-viruksen kuoriproteiini (env AIDS) on 97 200 daltonin suuruinen proteiini, jossa on 32 mahdollista N-glykosylaatiokohtaa. AIDS:n oletettujen etiologisten tekijöiden AIDS-kuorigeenin nukleotidisekvenssianalyysi havainnollistaa, että kaikki virukset ovat saman viruksen muunnoksia. Tämä tarkoittaa, että on noin 1-20 %:n suuruinen ero tai muunnos HTLV III:n kuori-

geenin sekvenssin ja muiden virusten LAV ja ATV-2 kuorigeenien sekvenssien välillä. Env AIDS:n aminohapposekvenssi esitetään kuviossa 6(a). Aminohappojakaantuma esitetään kuviossa 6(b).

Kuorigeenin nukleotidisekvenssi esitetään kuviossa 1. Proviruksen DNA-sekvenssi analysoitiin kuoriproteiinia koodittavan alueen paikan määrittämiseksi, käyttämällä menetelmiä, jotka ovat aiheeseen perehtyneiden tuntemia, kuten esimerkiksi Maxamin ja Gilbertin kemiallista pilkkomismenetelmää tai Messingin M13-sekventointijärjestelmää, joka on muunnos Sangerin menetelmästä didesoksinukleotidi-ketjun päättämiseksi. Kuorigeenille määritettiin avoimen lukuraamin sijainti, se on, pitkä triplettikodonien alue, jota ei katkaise translaation pysäytyskodoni. Avoin lukuvaiheistus, joka koodittaa env geeniä, on 863 aminohappoa ja se käsittää ATG-kodonin kahdeksannessa paikassa lukuvaiheistuksen 5'-päästä lukien. ATG-kodonin tiedetään olevan yleisen translaation aloituskodonin.

HTLV-III:n täydellinen proviruksen genomi kloonattiin HTLV-III:lla infektoitujen H9-solujen perintötekijästön DNA:sta [Shaw, G.M. et al., "Molecular characterization of Human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome", Science 226, 1165-1171 (1984)]. Siitä lähtien kun HTLV-III provirukselta havaittiin puuttuvan XbaI-restriktiokohdat, geenikirjasto konstruoitiin käyttämällä XbaI:llä pilkottua H9/HTLV-III DNA:a. Aiheeseen perehtyneellä on käytettävissä useita menetelmiä AIDS env proteiinia vastaavaa cDNA:a sisältävien bakteeriperäisten kloonien seulomiseksi. Näihin sisältyvät, esimerkiksi, RNA-valintahybridisaatio, erottava hybridisaatio synteettisen koettimen avulla tai immunologisin tai biologisin menetelmin suoritettava seulonta kloonien suhteen, jotka valmistavat haluttua proteiinia. Geenikirjastosta valittiin HTLV III-sekvenssejä sisältävällä DNA:lla transformoitujen solujen pesäkkeet kirjaston hybridisaatioseulonnan avulla, joka suoritettiin HTLV III

cDNA:lla. Hybridisaatio-positiivisen kloonin DNA-insertti, HXB-3, leikattiin plasmidi-DNA:sta ja sekventoitiin.

Ennustetulla env-geenin tuotteella on monia yhteisiä piirteitä muiden retrovirusten kuorigeenin tuotteiden kanssa. Täten, hydrofobinen alue on nähtävissä proteiinin keskellä (aminohapot 519-534), joka käsittää käsittelykohdan prekursoriproteiinin pilkkomiseksi ulkopuolisiksi ja transmembraaniproteiineiksi. Samalla tavalla, amino-terminaalinen pää sisältää hydrofobisten aminohappojen lyhyen alueen (aminohapot 17-37), joka käsittää mahdollisen signaalisekvenssin. HTLV-III:n kuoren prekursori eroaa muista retrovirusperäisistä kuoriproteiinien prekursoreista siinä suhteessa, että se sisältää 180 aminohapon suuruisen lisäalueen karboksipäätteessä.

Polymorfismi AIDS-viruksen kuorialueen sisällä

LAV:n, ARV-2:n ja HTLV-III:n nukleotidisekvenssejä koskeva viimeaikainen julkaisu [Ratner, L., et al., supra; Sanchez-Pescadon, R., et al., supra; Wain-Hobson S., et al., supra] tekee mahdolliseksi vertailla yksityiskohtaisesti erilaisia eristyksiä, jotka on saatu AIDS-potilailta eri osista maailmaa. HTLV-III-kloonit eristettiin Yhdysvaltain itärannikolta peräisin olevien AIDS-potilaiden lymfosyyteistä, kun taas LAV eristettiin ranskalaiselta mieheltä ja ARV eristettiin kalifornialaiselta potilaalta. Sekvenssiä koskevien tietojen vertailu varmistaa aiemmat havainnot, jotka tehtiin käyttämällä restriktioentsyymikohta-analyysiä, joka ilmaisi noin 10 %:n muuntelun. Kyseessä oleva analyysi osoittaa, että erilaisilla eristyksillä suurin säilyttämisen määrä on gag- ja pol-alueilla, kun taas eniten hajaantumista esiintyy env-alueella. Viiden env-sekvenssin vertailu esitetään kuviossa 2. Kuorigeenin suhteen, HTLV-III ja LAV ovat läheisemmin sukua toisilleen kuin ARV-klooni. HTLV-III (HBX-3) ja LAV-sekvenssin välillä havaittiin noin 1,6 %:n suuruinen ero. HTLV-sekvenssien piirissä ero oli noin 1,6 %. Kuitenkin, havaittiin noin 17 %:n suuruinen ero HTLV-III:n ja ARV-2:n välillä, ja tämä oli selvempi kuori-

geenin valmisteen solunulkoisella alueella (kuvio 2). Tämä suuri erilaisuuden aste voi johtua maantieteellisestä paikasta, josta eristykset olivat peräisin tai näiden muunnosten eristämisajankohdasta. ARV-2 eristettiin Yhdysvaltain länsirannikolta aivan äskettäin. HTLV-III-eristykset, joille nukleotidisekvenssit on määritetty, saatiin kaikki Yhdysvaltain itärannikolta vuotta aiemmin. LAV saatiin ranskalaiselta potilaalta, joka näyttää hankkineen viruksen New Yorkista suunnilleen samaan aikaan. Sekvenssissä havaitut erot luultavasti heijastavat ajallisesti ja maantieteellisesti toisistaan erotettujen kantojen erilaista evoluutiota. Kuorialueen sisällä, poikkeavuuden suurin taso on proteiinin solunulkoisessa osassa.

Ekspressiovektori

Isäntä/kloonausvehikkeli-yhdistelmien laajaa vaihtelevuutta saatetaan käyttää hyväksi kaksisäikeisen DNA:n kloonauksessa. Esimerkiksi, käyttökelpoiset kloonausvehikkelit saattavat käsittää kromosomiperäisten, ei kromosomiperäisten ja synteettisten DNA-sekvenssien osia, kuten esimerkiksi tunnettuja bakteeriperäisiä plasmideja, esim. E. colilta saatuja plasmideja kuten pBR322, faagi DNA sekä vektoreita, jotka ovat peräisin faagi-DNA:iden ja plasmidien yhdistelmistä, kuten esimerkiksi plasmidit, joita on muunnettu faagi-DNA:n tai muiden ekspressiota kontrolloivien sekvenssien tai hiivan plasmidien käyttämiseksi. Käyttökelpoisiin isäntiin kuuluvat mikro-organismit, nisäkässolut, kasvisolut yms. niiden joukosta käytetään mieluummin mikro-organismeja ja nisäkässoluja. Edullisina mikro-organismeina saatetaan mainita hiiva sekä bakteerit, kuten esimerkiksi Escherichia coli, Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus ja Actinomyces. Yllä mainittuja vektoreita ja isäntiä saatetaan käyttää myös proteiinin valmistamiseen geenistä, joka on saatu biologisesti, kyseessä olevan keksinnön mukaisesti. Tietenkään eivät kaikki isäntä/vektori-yhdistelmät ole yhtä tehokkaita. Isäntä/kloonausvehikkeliyhdistelmän tiettyä valintaa saattavat asiaan

perehtyneet suorittaa harkinnan mukaisesti, noudattaen seuraavassa esitettyjä perusteita, poikkeamatta kyseessä olevan keksinnön piiristä.

Edelleen, kunkin spesifisen kloonausvehikkelin sisällä saatetaan valita erilaisia kohtia kaksisäikeisen DNA:n insertiota varten. Nämä kohdat osoitetaan tavallisesti restriktioendonukleaasilla, joka leikkaa niitä. Esimerkiksi, pBR322:ssa EcoRI-kohta sijaitsee juuri geenin ulkopuolella, joka koodittaa ampisilliiniresistenssiä. Muut ovat käyttäneet monia kohtia yhdistelmäsynteesijärjestelmissään. Useat kohdat ovat aiheeseen perehtyneiden hyvin tunnistamia. On tietenkin ymmärrettävää, että kyseessä olevassa keksinnössä käyttökelpoisen kloonausvehikkelin ei tarvitse sisältää restriktioendonukleaasikohtaa valitun DNA-fragmentin insertiota varten. Sen sijaan, vehikkeli voitaisiin liittää fragmenttiin vaihtoehtoisin menetelmin.

Vektori tai kloonausvehikkeli ja erityisesti siinä kohta, joka on valittu valikoidun DNA-fragmentin kiinnittämistä varten yhdistelmä-DNA-molekyylin muodostamista varten, määritetään erilaisten tekijöiden avulla, joita ovat esimerkiksi kohdat, jotka ovat herkkiä tietylle restriktioentsyymille, ekspressoitavan proteiinin koko, halutun proteiinin herkkyys isäntäsolun aiheuttamalle proteolyyttiselle hajotukselle, ekspressoitavan proteiinin kontaminoituminen isäntäsolun proteiineilla, jotka on vaikea poistaa puhdistuksen aikana, ekspression ominaisuudet, kuten esimerkiksi aloitus- ja lopetuskodonien sijainti suhteessa vektorisekvensseihin, sekä muut tekijät, jotka ovat tuttuja aiheeseen perehtyneille. Vektorin ja tietyn insertiokohdan valinta tietylle geenille suoritetaan näiden tekijöiden tasapainon avulla, jolloin kaikki valitut kohdat eivät ole yhtä tehokkaita tietyn tapauksen suhteen.

On olemassa useita tunnettuja menetelmiä insertoida DNA-sekvenssejä kloonausvehikkeliin yhdistelmä-DNA-molekyylien muodostamiseksi, jotka menetelmät ovat yhtä tehokkaita kyseessä olevan keksinnön yhteydessä. Näihin sisältyvät esi-

merkiksi suora kytkentä, synteettiset kytkijät, eksonukleaasiin ja polymeraasiin liittyvät korjausreaktiot, joita seuraa kytkentä tai DNA-säikeen pidentäminen DNA-polymeraasin ja sopivan yksisäikeisen templaatin avulla, mitä seuraa kytkentä.

Olisi tietenkin ymmärrettävä, että DNA-fragmentin nukleotidisekvenssit, jotka on insertoitu kloonausvehikkelin valittuihin kohtiin, saattavat sisältää nukleotidejä, jotka eivät ole haluttua polypeptidiä/proteiinia vastaavan geenin osa, tai niihin saattaa sisältyä ainoastaan haluttua proteiinia vastaavan täydellisen rakennegeenin osa. Vaaditaan ainoastaan, että insertoidaan mikä tahansa DNA-sekvenssi, transformoitu isäntä valmistaa proteiinia/peptidiä, jolla on immunologista aktiivisuutta AIDS env proteiinia kohtaan, tai DNA-sekvenssi itse on käyttökelpoinen käytettäväksi hybridisaation koettimena kloonien valitsemiseksi, jotka sisältävät DNA-sekvenssejä, jotka ovat käyttökelpoisia valmistettaessa polypeptidejä/proteiineja, joilla on immunologista aktiivisuutta AIDS env-proteiinia kohtaan.

Kloonausvehikkeliä tai vektoria, joka sisältää vieraan geenin, käytetään transformoimaan isäntä siten, että annetaan isännän ekspressoida proteiinia tai sen osaa, jota hybridi-DNA koodittaa. Sopivan isännän valintaa säätelevät monet tekijät, jotka ovat tunnettuja tutkimustyössä. Näihin kuuluvat muun muassa yhteensopivuus valitun vektorin kanssa, hybridiplasmidin koodittamien proteiinien myrkyllisyys, halutun proteiinin takaisin saamisen helppous, ekspressio-ominaisuudet, biologinen turvallisuus ja kustannukset. Näiden tekijöiden tasapainon suhteen tulee kiinnittää huomiota siihen seikkaan, että kaikki isännät eivät ole yhtä tehokkaita tietyn yhdistelmä-DNA-molekyylin ekspressiota varten.

Kyseessä olevan keksinnön edullinen suoritusmuoto on ekspressoida AIDS env-proteiinin segmenttejä E. colissa insertoimalla restriktiofragmentteja, jotka on eristetty kloonatun proviruksen genomista, monikäyttöisiin pEV-vrf

(muuttuva lukuvaiheistus) -ekspressioplasmideihin (rakenteen yksityiskohtia katso esimerkistä 2). Nämä monikäyttöiset pEV-vrf-plasmidit ovat pBR322:n johdannaisia, jotka sisältävät faagi lambda P_L-promoottorin, synteettisesti johdetun ribosomien sitoutumiskohdan sekä tarkoituksenmukaiset kloonauskohdat (EcoRI, BamHI, ClaI sekä HindIII), aivan aloituskodonin alapuolella (kuvio 8). Kolmen plasmidin muodostama sarja konstruoitiin translaation kaikkien kolmen lukuvaiheistuksen hankkimiseksi. P_L-promoottoria säätelee lämpötilalle herkkä cI-repressori, joka on koodi-tettu yhteensopivalla plasmidilla pRK248cIts [ATCC 33766; Bernard, H.U. ja Helinski, D.R., "The use of the phage promotor P_L to promote gene expression in hybrid plasmid cloning vehicles", Meth. Enzymol. 68, 482-492 (1979)]. Näitä ekspressioplasmideja on käytetty heterologisten proteiinien huomattavien määrien valmistamiseen E. colissa, v-bas p21 [Lacal, J.C. et al., "Expression of Normal and Transforming H-ras genes in E. coli and purification of their encoded p21 proteins", PNAS 81, 5305-5309 (1984)] ja hiiren interleukiini-1 [Lomedico, P.T. et al., "Cloning and Expression of Murine Interleukin-1 cDNA in E. coli", Nature 312, 458-462 (1984)] mukaanluettuina.

Kyseessä olevassa keksinnössä edullinen aloitus-kloonausvehikkeli on bakteeriperäinen plasmidi pBR322 (ATCC 37017), ja edulliset restriktioendonukleaasin aloitus-kohdat siinä ovat EcoRI- ja HindIII-kohdat (kuvio 3). Proviruksen DNA:n, joka sisältyy H9-solujen genomiin, insertio näihin kohtiin antaa käyttöön suuren joukon bakteeriperäisiä klooneja, joista kukin sisältää yhden proviruksen DNA-geeneistä tai sen fragmenteista, joita on läsnä H9-solujen genomissa. Ainoastaan hyvin harvat näistä klooneista sisältävät geenin env AIDS:a tai sen fragmentteja varten.

Edullinen isäntä env AIDS geenin kloonauksen ja ekspression aloitusta varten kyseessä olevan keksinnön mukaisesti on E. coli MC 1061 [Casadaban, M.J. ja Cohen, S.M.,

"Analysis of gene Control Signals by DNA Fusion and Cloning in E. coli", J. Mol. Biol., 138 179-207 (1980)7.

Env-proteiinin aminohappotähteitä #44-640 koodittavat sekvenssit on paikannettu P_L-promoottorin alapuolelle, KpnI- ja HindIII-kohtien väliin restriktiokartalla, kuviossa 3 osoitetulla tavalla. Paitsi näiden tarkoituksenmukaisten restriktiokohtien paikantamista, nämä sekvenssit valittiin bakteereilla suoritettavia ekspressiokokeita varten, koska ne eivät sisältäneet aminopäätteistä signaalipeptidiä eikä hydrofobista transmembraanisegmenttiä karboksyylipäässä. Nämä sekvenssit poistettiin toksisuusongelmien välttämiseksi, joita esiintyy, kun hydrofobisia proteiineja tuotetaan liikaa bakteerisoluissa. Kyseessä olevan keksinnön edullisessa suoritusmuodossa konstruoitiin ekspressioplasmidi, joka ohjaisi env-geenin tämän sekvenssin tuotteen synteesiä (merkitty pEV/env 44-640:ksi), välivaiherakenne valmistettiin ensin insertoimalla 2400 ep EcoRI-HindIII-fragmentti EcoRI- ja HindIII-kohtien väliin pEV-vrf-plasmideissa. Välivaiherakenteesta poistettiin sitten kuviossa 3 esitetyllä tavalla HTLV-III-sekvenssit (600 ep) EcoRI- ja KpnI-kohdan välistä. Nämä plasmidikonstruktiot suoritettiin kaikilla kolmella pEV-vrf-plasmidilla, niin että voitiin tehdä sitä seuraavat deleetiot, ja oikea lukuvaiheistus säilytettiin. Lisäksi, konstruktiot, jotka oli tehty väärissä lukuvaiheistuksissa, toimivat tärkeinä kontrolleina alla kuvatuissa ekspressiokokeissa.

Kyseessä olevan keksinnön eräässä toisessa suoritusmuodossa konstruoitiin toinen sarja ekspressioplasmideja samalla tavalla, poistamalla sekvenssejä EcoRI- ja StuI-kohtien välistä, jotka esiintyvät 483 ep:a env-geenin alapuolella. Nämä deleetiot (merkitty pEV/env 205-640) valmistettiin jälleen kaikissa kolmessa lukuvaiheistuksessa. Translaation päätöskodoni, jota käytetään kaikissa env-ekspressioplasmideissa, on luultavasti in-frame TAA, joka sijaitsee plasmidissa 23 bp:a HindIII-kohdan alapuolelle. Täten pEV-vrf -ekspressioplasmidien sisältämät pBR322-

sekvenssit koodittavat 8 aminohappoa karboksyylipäässä.

Env AIDS:n ekspressio

On useita aloittamistapoja seulottaessa bakteeriperäisiä klooneja, jotka sisältävät env AIDS-cDNA:a. Näihin kuuluvat esimerkiksi RNA-valintahybridisaatio, erottava hybridisaatio, hybridisaatio synteettisen koettimen avulla ja kloonien, jotka valmistavat haluttua proteiinia, seulonta immunologisin ja biologisin määritysmenetelmin. On käytettävissä kaksi menetelmää seulontaan immunologista menetelmää käyttämällä: bakteeripesäkkeiden seulonta proteiinin läsnäolon suhteen vasta-ainetta käyttämällä; ja edullisemmin bakteereiden hajottamistuotteille suoritetaan elektroforeesi, ne siirretään nitroselluloosapaperille ja tutkitaan sitten vasta-aineen avulla.

Kyseessä olevan keksinnön edullisessa suoritusmuodossa E. colin kannan MC 1061 viljelmiä, jotka oli transformoitu pRK248cIts:llä sekä pEV 1, 2 tai 3/env 44-640:lla (tai pEV 1, 2 tai 3/env 205-640:lla), kasvatettiin M9 elatusaineessa 30°C:ssa, keski-log -vaiheeseen ja sitten niitä indusoitiin siirtämällä 42°C:seen 2 tunniksi. Bakteeriviljelmästä otettiin sitten näytteitä ja niille suoritettiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi, jota seurasi "Western-blot"-analyysi env-proteiinien havaitsemiseksi. Proteiinitäpliä (blots) käsiteltiin env AIDS-proteiinien antiseerumeilla, jotka oli eristetty joko immunisoiduista kaniineista tai AIDS-potilailta, joilla aiemmin oli osoitettu korkeita vasta-ainetiittereitä AIDS-antigeeneille. Tätä seurasi inkubointi ^{125}J:llä merkatulla Staphylococcus aureus-proteiini A:lla, pesu sekä autoradiografia. Molemmilla seerumeilla saatiin samanlaisia tuloksia, paitsi että humaani seerumin havaittiin sisältävän paljon korkeampia anti-HTLV-III:n vasta-aineiden tiittereitä ja siltä puuttui kokonaan taustareagoivuus E. colin proteiinien kanssa. Tästä syystä käytettiin humaani vasta-aineita kaikissa seuraavissa karakterisoinneissa.

Kuvio 4 esittää näytettä bakteereissa syntetisoitujen

env AIDS-proteiinien (yhdistelmäproteiinien) reaktiokyvystä anti-HTLV-III-vasta-aineiden kanssa. Avoin lukuvaiheistus pEV3/env 44-640:ssa koodittaa proteiinia, jonka tulisi vaeltaa 68 Kd-nauhana geelillä. Oikeastaan 68 Kd-vyöhyke havaitaan kaistassa, joka vastaa indusoituja soluja, jotka sisältävät pEV3/env 44-640:n (kaista C). Kuitenkin, 68 Kd:n vyöhykkeen lisäksi nämä solut syntetisoivat proteiineja 35 Kd, 25 Kd sekä 17 Kd, jotka spesifisesti ristireagoivat anti-HTLV-III-vasta-aineiden kanssa. Mitään HTLV-III:n kanssa ristireagoivia vyöhykkeitä ei silminnähtävästi ole indusoimattomassa kontrollissa (kaista b) tai indusoitujen solujen, jotka sisältävät plasmidin, joka ohjaa v-bas p21 onkogeeni-tuotteen synteesiä, negatiivisessa kontrollinäytteessä (kaista a) (Lacal, J.C. et al., supra). Env-geenisekvensseistä syntetisoituneiden multippeleiden vyöhykkeiden esiintyminen oli odottamaton tulos. Toinen odottamaton tulos oli env-geenin tuotteiden synteesi plasmidista (pEV1/env 44-640), johon insertti oli asetettu väärässä lukuvaiheistuksessa aloituskodonin suhteen, välittömästi P_L-promoottorin (kaista d) alapuolelle. Tässä tapauksessa, E. colin solut, jotka sisälsivät plasmidi pEV1/env 44-640:n, syntetisoivat 63 Kd-proteiinin 35 Kd, 25 Kd ja 17 Kd proteiinien lisäksi. Nämä tulokset voitiin helposti selittää, kun kuorigeenin nukleotidisekvenssi (kuvio 1) oli tutkittu. Noin 155 emäsparia KpnI-kohdan alapuolella on ATG-kodoni, jota näkyi käytettävän env-geenin tuotteen synteesiin plasmidi pEV1/env 44-640:n ekspression avulla. Sisäinen translaation aloitus näyttää myös olevan todennäköinen selitys 35Kd, 25Kd ja 17Kd proteiinien esiintymiselle. Aloituskodonit, joita edeltävät niin sanotut Shine-Dalgarno-sekvenssit (AGGA), löytyvät env:ä koodittavan alueen sisältä, paikoista, jotka ovat yhdenmukaiset havaittujen proteiinin tuotteiden kanssa.

Yllä esitetyn tulkinnan varmistamiseksi ja mahdollisuuden eliminoimiseksi, että pienemmät proteiinit eivät ole muodostuneet peptidisynteesin liian varhaisen päätty-

misen tai suurempien tuotteiden proteolyyttisen pilkkoutumisen tuloksena, konstruoitiin toinen deleetiomutantti, josta poistettiin sekvenssit KpnI- ja StuI-kohtien välistä. Tämä ekspressioplasmidi sisältää aminohappoasemia 205-640 koodittavat sekvenssit, jotka voisivat koodittaa 49 Kd:n proteiinia. Analysoimalla proteiineja, jotka on indusoitu E. colista, jolla on tämä plasmidi, varmistettiin, että oikeastaan nämä solut syntetisoivat 49 Kd proteiinia 35 Kd, 25 Kd sekä 17 Kd proteiinien lisäksi (kaista e, kuvio 4). Näistä tuloksista pääteltiin, että pEV3/env 44-640 ekspressioplasmidi ohjaa 68 Kd proteiinin synteesiä useiden muiden pienempien polypeptidien lisäksi (esim. 35Kd, 25Kd ja 17Kd), joita valmistetaan kaikista env-ekspressioplasmideista, env-geenin sisällä tapahtuvan sisäisen translaation aloituksen tuloksena.

AIDS-seerumien seulonta

Koska anti-HTLV-III-vasta-aineita löytyy useammalta kuin 90 %:lta AIDS-potilailta, oli mielenkiintoista nähdä, voitiinko bakteerien avulla syntetisoituja env-geenin tuotteita käyttää diagnostisina työkaluina näiden vasta-aineiden havaitsemiseen. Tätä analyysiä varten kokonaissoluproteiini indusoiduista bakteeriviljelmistä fraktioitiin SDS-PAGE:lla ja siirrettiin nitroselluloosasuodattimelle "Western blotting"-tekniikan avulla. Suodattimen suikaleet, jotka sisälsivät proteiineja, reagoivat 1000-kertaa laimennetun humaani seerumin kanssa, ja muodostuneet antigeeni-vasta-aine-kompleksit havaittiin inkuboimalla suikaleita 125-I:lla merkatun Staphylococcus aureus proteiini A:n kanssa, jonka jälkeen suoritettiin autoradiografia. Näkyvät vyöhykkeet, jotka vastasivat vasta-aineen reaktiota proteiineja 68 Kd, 35 Kd sekä 17 Kd vastaan, havaittiin yhtä pitävästi, kun käytettiin seerumia, joka oli saatu potilailta, joilla oli AIDS-oireyhtymä. Sellaisten määritysten tulokset erilaisten humaani seerumeiden kanssa esitetään kuviossa 5. Käytetyt negatiiviset kontrollit olivat normaalia humaani seerumia sekä seerumia, joka oli saatu

potilaalta, jolla oli HTLV-I-infektio. Mitään reaktiota ei havaittu seerumeilla, jotka oli saatu terveiltä yksilöiltä tai HTLV-I:n infektoimilta henkilöiltä. Potilasseerumit olivat peräisin kaikista Yhdysvaltain osista, Kalifornia mukaanluettuna, ja kaikki tutkitut AIDS-potilasseerumit oli havaittu positiivisiksi. Tulokset tuntuvat osoittavan, että nämä vasta-aineet on pääasiallisesti suunnattu molekyylin proteiinirankaa kohtaan.

Sen tähden käy ilmi, että env-geenin tuotteet muodostavat parhaat diagnostiset reagenssit AIDS:iin liittyvien vasta-aineiden havaitsemiseen. Kyseessä olevan keksinnön mukainen env-geenin tuote käsittää suuren osan proteiinimolekyyliä sekä sisältää molekyylin sekä säilytetyt että poikkeavat osat. Erilaisuudesta huolimatta, joka havaittiin HTLV-III- sekä ARV-2-sekvenssien välillä, kyseessä olevan keksinnön mukaiset yhdistelmä env-proteiinit, jotka ovat bakteereiden syntetisoimia, reagoivat seerumeiden kanssa, jotka on saatu potilailta, jotka ovat Yhdysvaltain molemmilta maantieteellisiltä asuinpaikoilta. 100 % potilasseerumeista (50 yksityistä näytettä, 25 oli peräisin Yhdysvaltain itärannikolta ja 25 oli Kaliforniasta), jotka tutkittiin, ilmaisivat korkeaa reaktiokykyä. Tämä on voimakas todiste molekyylin sisällä säilyneiden antigeenisten determinanttien läsnäolosta, joita vastaan immuunijärjestelmä voisi panna toimeen vasta-ainereaktion. Humaani immuunijärjestelmä saattaa täten panna toimeen immuunivasteen kuorimolekyylin säilyneitä antigeenisiä determinantteja vastaan, kuten AIDS-potilaiden seerumeiden reaktiokyky näytti osoittavan. Havaittu ero HTLV-III:n erilaisten eristysten välillä ei asettane ongelmaa yhdistelmäproteiinin käytölle rokotteena. 68Kd-proteiini sopii ihanteellisesti sellaiseen tarkoitukseen, koska se sisältää suuren osan geenin tuotetta ja sillä on ainutlaatuinen rakenteellinen piirre, se sisältää sekä solunulkoisen hydrofiilisen alueen että membraaniin liittyvät hydrofobiset alueet. Tämä rakenteellinen ominaisuus tekee sen hyvin soveltuvaksi kapse-

lointia varten liposomeihin, joita käytetään vehikkeleinä rokotusta varten muita tärkeitä kuoriproteiineja vastaan.

Näiden keksintöjen perusteella ehdotetaan, että verenseulontaa käytännössä AIDS:n suhteen käytetään ainoastaan AIDS-kuoriproteiinia tai mainitun proteiinin muunnosta. Kyseessä olevan keksinnön mukaista env AIDS-proteiinia käyttämällä humaani veri voidaan seuloa AIDS-viruksen vasta-aineiden läsnäolon suhteen. Nämä ja muut menettelytavat ratkaistaan helposti, kun kerran, kuten ensimmäisen kerran kyseessä olevassa keksinnössä esitetään, AIDS-kuoriproteiinin on todettu olevan AIDS:n etiologisen tekijän kuoriproteiini. Kyseessä olevan keksinnön muut kohteet, yksityiskohdat ja edut käyvät ilmi seuraavista esimerkeistä, jotka koskevat kyseessä olevan keksinnön edullisia suoritusmuotoja.

Esimerkki 1

HTLV-III-provirusgenomin molekyylikloonaus ja nukleotidisekvenssianalyysi

HTLV-III:n integroitu provirusgenomi kloonattiin äskettäin HTLV-III:lla infektoitujen H9-solujen perintötekijästön DNA:sta [Shaw, G.M. et al., supra]. Provirusgenomi, joka saatiin käyttämällä XbaI:llä pilkottua H9/HTLV-III DNA:a, sisälsi kaksi sisäistä EcoRI-kohtaa virusgenomin sisällä sekä kaksi lisäksi tulevaa kohtaa kloonausvektorissa λ JI. Näitä kohtia käytettiin edelleen 5,5 Ke:n, 4,5 Ke:n ja 1,1 Ke:n suuruisten kolmen DNA-fragmentin alakloonaukseen pBR322:een (ATCC no 37017). Provirusgenomin nukleotidisekvenssianalyysi suoritettiin kemiallisella pilkkomismenetelmällä, jonka Maxam, A.M. ja Gilbert, W. ovat esittäneet, "Sequencing end-labelled DNA with base-spesific chemical cleavages", Meth. Enzymol. 65, 499-560 (1980). Sekvenssianalyysiä varten eristettiin DNA-insertit kolmesta alakloonista elektroeluution avulla ja ne pilkottiin edelleen sopivien restriktioentsyymien avulla. DNA-fragmentit merkattiin 5'-päissään γ-32P-ATP:llä polynukleotidikinaasia käyttämällä tai 3'-päissään α-32P-NTP:lla,

yhdistämällä DNA-polymeraasi I:n avulla (Klenow-fragmentti). Kahdesta päästä merkatut DNA-fragmentit pilkottiin toisella entsyymillä, ja fragmentit merkattiin yhdestä ainoasta päästä sekä puhdistettiin 5-%:isilla polyakryyliamidigeeleillä sekä käytettiin sekvenssianalyysiin. Env-geenin sekvenssianalyysiä varten käytettiin "shotgun"-lähestymistapaa, jossa 4,5 EcoRI-fragmentti pilkottiin yhdellä seuraavista entsyymeistä: BglII, HindIII, XhoI, AvaII, HinfI sekä Sau3A, ja restriktiofragmentit merkattiin ja sekventoitiin yllä kuvatulla tavalla. Kyseessä olevassa keksinnössä käytetyn kuorigeenin nukleotidisekvenssi esitetään kuviossa 1.

Esimerkki 2

pEV/env 44-640:n konstruktio

pRC2 on pBR322:n johdannainen, joka sisältää plasmidissa ainoan Bgl II-kohdan EcoRI-kohdan vieressä amp^R-puolella). Tämä plasmidi konstruoitiin seuraavalla tavalla. 20 µg pBR322-plasmidi-DNA:a pilkottiin EcoRI:llä ja jaettiin sitten kahteen reaktioon. Toisessa reaktiossa yksisäikeiset 5'-päät poistettiin S1-nukleaasin avulla; toisessa reaktiossa päitä täydennettiin liittämällä desoksinukleotidejä DNA-polymeraasi I:n Klenow-fragmentin avulla. Molemmat reaktiot päätettiin fenoliuuton avulla, jota seurasi etanolisaostus. Noin 1 µg DNA:a kummastakin reaktiosta sekoitettiin 90 pikomoolin kanssa fosforyloituja BgIII-kytkijöitä (CAGATCTG, hankittu Collaborative Researchilta) ja inkuboitiin T4 DNA-ligaasin kanssa 15°C:ssa 18 tunnin ajan. Kytkentätuotteet pilkottiin sitten BglII:lla, ja PstI:llä ja niille suoritettiin geelielektroforeesi 1-%:isessa agarosissa. 3600 bp:n ja 760 bp:n suuruiset fragmentit, jotka olivat peräisin molemmista reaktioista, saatiin takaisin geelistä. pRC2:n konstruktiota varten, Klenow-reaktiosta saatu 3600 ep:n suuruinen fragmentti kytkettiin 760 ep:n suuruiseen fragmenttiin, joka oli saatu S1-reaktiosta. Plasmidin konstruoimiseksi, jossa on BglII-kohta EcoRI:n toisella puolella (tet^R-puoli) ja jota merkittiin pRC1:ksi, 3600 ep:n suuruinen fragmentti, joka

oli saatu S1-reaktiosta, kytkettiin 760 ep:n suuruiseen fragmenttiin, joka oli peräisin Klenow-reaktiosta. E. colin kanta RR1 (ATCC nro 31343) transformoitiin kytkentäseoksilla, ja transformantit valittiin LB-agar-levyillä, jotka sisälsivät 50 µg/ml ampisilliiniä. Odotetun plasmidikonstruktion sisältävät transformantit identifioitiin eristetyn plasmidi-DNA:n restriktioanalyysin perusteella. DNA-sekvenssianalyysi varmisti, että S1-nukleaasikäsittely poisti tarkasti yksisäikeiset 5'-päätteet.

pRC23 (katso kuvio 7) konstruoitiin insertoimalla pRC2:een 250 ep:n suuruinen BglII-HaeIII-fragmentti, joka sisälsi P_L-promoottorin yhdistettynä komplementaaristen, synteettisten oligonukleotidien muodostamaan pariin, joka käsitti malliribosomin sitoutumiskohdan (RBS). HaeIII-kohta paikannettiin λN-geenin 5'-ei-koodittavan alueen sisälle, P_L-transkription aloituskohdan alapuolelle. Noin 1 µg 450 ep:n suuruista BglII-HpaI-fragmenttia, joka oli eristetty faagi λDNA:sta, pilkottiin HaeIII:lla. 200 ng syntyvää hajotustuotetta sekoitettiin 60 pikomoolin kanssa kutakin fosforyloitua synteettistä oligonukleotidiä, joka sisälsi malli-RBS:n. Kytketyt molekyylit pilkottiin BglII:lla ja EcoRI:lla sekä erotettiin 5-%:isella polyakryyliamidigeelillä. 270 ep:n suuruinen kytkentätuote saatiin geelistä takaisin, sekoitettiin geelin avulla puhdistetun pRC2-vektorin kanssa, joka oli pilkottu BglII:n ja EcoRI:n kanssa, sekä inkuboitiin T4 DNA-ligaasin kanssa, 15°C:ssa, 15 tunnin ajan. Kytkentäseosta käytettiin RR1(pKR248cIts)-kannan transformointiin. Transformantit, jotka oli valittu ampisilliiniä sisältävällä elatusaineella, seulottiin eristetyn plasmidi-DNA:n seulonnan avulla. Odotettu plasmidirakenne, pRC23, varmistettiin lisäksi suoritettujen restriktioentsyymiuuttojen sekä DNA-sekvenssianalyysin avulla, EcoRI-liitoksen kohdalta (kuvio 7).

Plasmidien pEV-vrf-sarjan konstruoimiseksi (katso kuvio 8), plasmidi pRC23 pilkottiin EcoRI:llä sekä HindIII:lla ja pRC23/EcoRI-HindIII-vektori eristettiin

preparatiivisella agarosigeelielektroforeesilla. Synteettisten oligonukleotidien seos (32, 33 ja 34 nukleotidit) yhdistettiin komplementaaristen sekvenssien seoksen kanssa, kuumennettiin 58°C:seen, 5 minuutin ajaksi, 150 mM NaCl:ssa ja jäähdytettiin hitaasti lämpökäsittelyn aikaansaamiseksi (annealing). 0,1 pikomoolia synteettisiä kaksoisjuosteita lisättiin 0,07 pikomooliin pRC23/EcoRI-HindIII-vektoria ja inkuboitiin T4 DNA ligaasin kanssa 15°C:ssa, 15 tunnin ajan. Kanta RRl (λ cl857) transformoitiin kytkentätuotteilla. DNA-sekvenssianalyysiä varten valittiin kuusi ampisilliinille resistenttiä transformanttia. Kuudesta kaksi sisälsi odotetun sekvenssin pEV-vrf1:ä varten, yksi sisälsi sekvenssin pEV-vrf2:a varten ja kolme sisälsi sekvenssin pEV-vrf3:a varten (kuvio 3).

AIDS env-geenin ekspressiota varten, yksi µg 2400 ep:n pituista EcoRI-HindIII DNA, joka eristettiin kloonatusta HTLV-III provirusgenomista preparatiivisen agaroosigeelielektroforeesin avulla, sekoitettiin 0,1 µg:n kanssa EcoRI-HindIII:lla pilkottua vektori-DNA:a (pEV-vrf1, -2 tai -3). 65°C:ssa 3 minuutin ajan suoritetun kuumennuksen jälkeen seokset jäähdytettiin jäiden päällä, ja koottiin 20 µl kytkentäreaktioseoksia, jotka sisälsivät 50 mM Tris-HCl:a (pH 7,4), 10 mM $MgCl_2$:a, 10 mM DTT:ä, 0,3 mM ATP:ä sekä 200 yksikköä T_4 DNA-ligaasia. 15°C:ssa, 4 tunnin ajan suoritetun inkuboinnin jälkeen reaktiot pysäytettiin kuumentamalla 65°C:ssa 5 minuutin ajan. Kytkentätuotteita käytettiin transformoimaan E. colin kanta MC1061, joka sisälsi plasmidin pRK248cIts. Transformantit valittiin Luria-lihaliemi-agarilla, joka sisälsi 50 µg/ml ampisilliiniä, 30°C:ssa, 18 tunnin aikana. Plasmidi DNA eristettiin 1 ml:sta kutakin viljelmää, ja sille suoritettiin restriktioanalyysi. Kaikki 12 eristystä sisälsivät odotetun plasmidikonstruktion. Näitä välivaihekonstruktioita käytettiin sitten pEVl:n, -2:n ja -3/env 44-640:n valmistukseen suorittamalla 600 ep:n suuruinen deleetio EcoRI- ja KpnI-kohtien välissä, alla kuvatulla tavalla.

? ep vai

Noin 0,5 /ug plasmidi-DNA:a pilkottiin KpnI:llä ja EcoRI:llä. Syntyviä päätteitä käsiteltiin sitten DNA-polymeraasi I:n Klenow-fragmentilla kaikkien neljän deoksiribonukleotidin (100 /uM:a) läsnäollessa, 37°C:ssa, 30 minuutin ajan. Tämä vaihe antaa tulokseksi EcoRI-päätteen 5'-ulokkeen täydennyksen (filling-in) sekä KpnI-päätteen 3'-ulokkeen poiston. Lineaarisen plasmidin uudelleenkiertämisen ja näiden päätteiden tylppäpääkytkennän avulla regeneroidaan EcoRI-kohta. Transformantit, jotka sisälsivät oletetut deleetiot, identifioitiin restriktioanalyysin avulla.

Toinen sarja deleetiojohdannaisia, joita merkittiin pEV/env 205-640:ksi, konstruoitiin samalla tavalla. Osa lineaarisesta plasmidista, jota oli pilkottu EcoRI:llä ja KpnI:llä sekä käsitelty Klenowilla, yllä kuvatulla tavalla, pilkottiin edelleen StuI:llä. Jälleen, uudelleenkiertämisen ja tylppäpääkytkennän avulla regeneroitiin EcoRI-kohta; kuitenkaan ei poistettu uusia, env:ä koodittavien sekvenssien 483 ep:n mittaisia osia.

Esimerkki 3

Bakteerien kasvatus ja geeniekspression induktio

E. colin kannan MC 1061, joka oli transformoitu plasmidilla pRK248cIts sekä pEVI-, -2-, -3/env-plasmideilla, viljelmiä kasvatettiin M9-elatusaineessa, joka sisälsi 0,5 % glukoosia ja 0,5 % kasaminohappoja, 30°C:ssa, log-vaiheen puoliväliin saakka, ja niitä indusoitiin sitten siirtämällä ne 42°C:seen 2 tunniksi. Solut koottiin sentrifugoimalla ja niitä käsiteltiin esimerkeissä 4 ja 5 kuvatulla tavalla.

Esimerkki 4

Env AIDS:n ekspressio ja puhdistus

Homogeeninen virusperäinen yhdistelmä-env AIDS puhdistettiin seuraavan menetelmän mukaisesti. Env AIDS-proteiini ekspressoitiin mikrobin avulla, jolla oli taipumusta liittyä isäntämikrobin membraanijakeisiin, pääasiallisesti mikronin sisämembraaniin. Suunniteltiin seuraava puhdistusmenetelmä tämän havainnon käsittelemiseksi.

Tämä puhdistusmenetelmä koostuu seuraavista vaiheista:

(a) transformoitujen mikrobisolujen hajottaminen, jotka solut valmistavat env AIDS-proteiinia;

(b) env AIDS:iin kytkeytyvien solumembraanien erottaminen muista solukomponenteista;

(c) env AIDS:n uuttaminen yhdistetyistä membraaneista; ja

(d) env AIDS:a sisältävän, muodostuneen uuttamisliuoksen kromatografinen puhdistus, suurin piirtein puhtaan virusperäisen yhdistelmä-env-proteiinin saamiseksi.

Lähemmin, edullinen puhdistusmenetelmä oleellisesti puhtaan virusperäisen yhdistelmä-env-proteiinin valmistamiseksi käsittää seuraavat vaiheet:

(a) Transformoidun organismin, joka sisältää virusperäistä env-proteiinia koodittavan DNA-sekvenssin, viljeleminen;

(b) vaiheen (a) transformoidun organismin viljeleminen env-proteiinin keräämiseksi;

(c) vaiheen (b) transformoitujen organismien hajottaminen soluhajotusseoksen muodostamiseksi;

(d) vaiheen (c) soluhajotusseoksen membraanikomponenttien eristäminen;

(e) eristettyjen solumembraanikomponenttien pesu uuttamisliuoksella env-proteiinin sisältämän pesuliuoksen tuottamiseksi; ja

(f) vaiheen (e) pesuliuoksen kromatografinen puhdistus oleellisesti puhtaan env AIDS-proteiinin saantoa varten.

Tämä menetelmää suoritettaessa on edullista, että solut hajotetaan äänikäsittelyn avulla, vaikka on etukäteen nähtävissä, että muita tunnettuja menetelmiä, kuten esim. entsymaattista ja mekaanista hajotusta voitiin käyttää. On edullista, että solumembraanikomponentit, erityisesti sisä- ja ulkomembraanit, eristetään muista solun komponenteista esimerkiksi sentrifugointimenetelmin. On havaittu, että transformoidun mikro-organismin ekspressoimalla env AIDS:lla

on taipumus yhdistyä solumembraaneihin. Siitä syystä, näiden membraanien eristäminen puhdistusprosessin aikana varmistaa korkeat puhdistustasot ja env AIDS:n korkeatasoisen puhtauden puhdistusmenetelmän päättyessä.

Kun solumembraanit eristetään soluhajotusseoksesta, niitä pestään uuttamisliuoksella, mieluummin suolaliuoksilla ja detergentillä, jotta saadaan toinen liuos, joka sisältää noin 50 % env AIDS-proteiinia. Solumembraanit pestään mieluummin neljässä erillisessä vaiheessa suolaliuoksilla ja detergentillä, vaikka on etukäteen nähtävissä, että näistä vaiheista tietyt voitaisiin yhdistää, järjestellä uudelleen tai poistaa. Solumembraanin pesun ensimmäinen vaihe voidaan suorittaa suolaliuoksella, mieluummin 1M NaCl:lla. Toisessa vaiheessa solumembraani pestään detergenttiliuoksella, mieluummin 1 %:lla Triton X-100:lla. Kolmannessa vaiheessa solumembraani pestään toisella suolaliuoksella, 1,75M - 3,5M guanidiini HCl:lla. Viimeinen pesu suoritetaan myös suolaliuoksella, mieluummin noin 7M guanidiini HCl:lla. Pesuliuos, joka saadaan neljännestä ja viimeisestä pesusta, käsittää noin 50 % env AIDS:a.

Viimeinen, 50 % env AIDS:a sisältävä pesuliuos puhdistetaan sitten edelleen kromatografiavaiheen avulla, mieluummin käänteisfaasi-suurpainenestekromatografian avulla (HPLC). HPLC-vaihe tuottaa env AIDS-proteiinin suurin piirtein 100 %:isesti puhtaassa muodossa. On myös nähtävissä, että monoklonaalinen vasta-aine-affiniteettikromatografiapylväitä, käyttämällä env AIDS:n polyklonaalisia tai monoklonaalisia vasta-aineita, voitaisiin käyttää vaihtoehtona HPLC:lle.

Esimerkki 5

Polyakryyliamidigeelielektroforeesi ja Western blot-analyysi

Solut hajotettiin liettämällä solusaostumat (noin 10^8 solua) TG-puskuriin (10 mM tris, pH 7,4, 10 % glyserolia), sekoitettiin 2 x näytteen suuruisen määrän kanssa

puskuria [Laemmli, U.K., "Cleavage of Structural Proteins During the assembly of the Head of bacteriphage T4", nature 227, 680-685 (1970)] ja inkuboitiin 95°C:ssa viiden minuutin ajan. Solupirstaleet koottiin sentrifugoimalla, ja kirkastetuille hajottamistuotteille suoritettiin SDS-PAGE-analyysi [Laemmli, U.K., supra]. "Western blot"-analyysiä varten, proteiinit akryyliamidigeeliltä siirrettiin sähköisesti (electroblotted) 0,1 µm:n vahvuiselle nitroselluloosamembraanille (Sleicher ja Schuell), käyttämällä 16 tunnin mittaista ajoaikaa 50 V:n jännitteellä, ajopuskurin sisältäessä 12,5 mM Tris:a, 96 mM glysiiniä, 20 % metanolia, 0,01 %:isessa SDS:ssä, pH 7,5:ssä. "Blotin" käsittely suoritettiin käyttämällä Towbin, H. et al.:n menetelmiä ["Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354, (1979)]. Humaani seerumilla suoritettavaa käsittelyä varten "blotteja" inkuboitiin seerumin 1000-kertaisella laimennuksella, joka oli tehty vasta-aineen puskuriin (20 mM natriumfosfaattipuskuria, pH 7,5, joka sisälsi 0,5 M NaCl:a, 1 % BSA:a ja 0,05 % Tween 20:a), 2-6 tunnin ajan. Sitten "blotteja" pestiin kaksi kertaa fosfaatilla puskuroidulla keittosuolaliuoksella, joka sisälsi 0,05 % Tween 20:a, ja sitten niitä inkuboitiin 125-J:lla merkatun Staphylococcus aureus proteiini A:n kanssa vielä yhden tunnin ajan. "Blotti" pestiin sitten kaksi kertaa PBS-Tween 20 puskurissa, kuivattiin ja sille suoritettiin autoradiografia.

Esimerkki 6

Immunisointi AIDS-viruksen env-proteiinilla

On selvää, että erilaisuudesta huolimatta, joka on havaittu HTLVIII- ja ARV-2-sekvenssien välillä, bakteereiden syntetisoimat yhdistelmäproteiinit reagoivat hyvin AIDS-potilaiden seerumeiden kanssa, jotka ovat peräisin Yhdysvaltain molemmilta maantieteellisiltä paikoilta. Sata prosenttia (100 %) AIDS-potilaiden tutkituista seerumeista ilmaisi korkeaa reaktiokykyä (50 yksittäistä näytettä,

25 Yhdysvaltain itärannikolta, 25 Yhdysvaltain länsirannikolta). Täten kaikki env-proteiinit sisältävät ainakin yhden säilytetyn antigeenisen determinantin. Kaikki tutkituista AIDS-potilaiden humaani seerumeista sisälsi vastaaineita kyseessä olevan keksinnön mukaisille env-proteiineille. Tämä antaa voimakkaasti aihetta olettaa, että nämä env-proteiinit säilytettyine antigeenisine determinantteineen olisivat ihmisessä immunogeenisia.

On helposti ymmärrettävissä, että kyseessä olevan keksinnön mukaisia env-proteiineja voidaan sisällyttää rokotteisiin, jotka voivat saada aikaan suojaavan immuniteetin AIDS-virusta vastaan. Tunnetuin menetelmin saatetaan määrittää spesifiset aminohapot, jotka muodostavat env-proteiinin antigeneettiset determinantit. Sitten saatetaan syntetisoida peptidejä, jotka käsittävät aminohapposekvenssin, joka vastaa env AIDS-proteiinin antigeenistä determinanttia joko monomeeri- tai multimeerimuodossa. Näitä synteettisiä peptidejä saatetaan sitten sisällyttää rokotteisiin, jotka voivat saada aikaan suojaavan immuniteetin AIDS-virusta vastaan. Menettelytapoihin sellaisten peptidien antigeenisyyden lisäämiseksi kuuluvat multimeerirakenteeseen sisällyttäminen, sitominen erittäin immunogeeniseen proteiinikantajaan, esim. "keyhold"-iilimadon hemosyaniiniin tai kurkkumätätoksiiniin sekä antaminen adjuvantteihin tai johonkin muuhun immuunivasteen lisääjään yhdistettynä. Lisäksi, rokotekoostumus saattaa sisältää antigeeneja, jotka antavat immuniteetin muita sairauksia vastaan AIDS:n lisäksi.

Aminohapposekvenssi, joka vastaa env-proteiinin antigeenistä determinanttia joko monomeeri- tai multimeerimuodossa (peptidi), saatetaan saada kemiallisin, synteettisin keinoin tai puhdistamalla biologisista lähteistä, geneettisesti muunnetut mikro-organismit ja niiden elatusaineet mukaan luettuina. Peptidi saatetaan yhdistää aminohapposekvenssiin muiden peptidien kanssa, muiden proteiinien fragmentit mukaanluettuina, esimerkiksi, syntetisoituina

fuusioproteiineina tai kytkettyinä muihin antigeenisiin tai ei antigeenisiin peptideihin, joiden alkuperä on synteettinen tai biologinen. Termin "env proteiinin antigeenista determinanttia vastaava" tulee ymmärtää sisältävän käytännön mahdollisuuden, että, joissakin tapauksissa, luonnonmukaisesti esiintyvän peptidin aminohapposekvenssivariaatiot saattavat olla antigeenisia sekä antaa suojaavan immuniteetin AIDS-infektiota vastaan. Mahdollisiin sekvenssivariaatioihin sisältyy, rajoituksetta, aminohapposubstituutioita, pidennyksiä, poistoja (deleetioita), lisäyksiä (interpolaatioita) sekä niiden yhdistelmiä. Sellaiset muunnokset kuuluvat kyseessä olevan keksinnön aiottuun piiriin, edellyttäen, että niitä sisältävä peptidi on antigeeninen ja sellaisen peptidin esiin saamat vasta-aineet ristireagoivat luonnonmukaisesti esiintyvän env-proteiinin tai env-proteiinin toistettujen peptidien kanssa, jotka eivät ole variantteja, riittävässä määrin antamaan suojaavan immuniteetin, kun niitä annostellaan rokotteena. Sellaisia rokotekoostumuksia yhdistetään fysiologisesti hyväksyttävän väliaineen kanssa. Hiilihydraattiantigeeneissa esiintyvien antigeenisten determinanttien kokoa ja muotoa on tutkittu perusteellisesti, mutta proteiinimolekyylien antigeenisten determinanttien rakennetta tunnetaan vähemmän. Proteiiniantigeenien jotkut antigeeniset determinantit on määritelty niiden tertiaarisen rakenteen tasolla. Jokaisessa tapauksessa, antigeeniset determinantit eivät olleet muodostuneet ainoastaan primaaristen sekvenssien avulla, vaan luonnonmukaisen molekyylin polypeptidiketju(n)jen kiertymisen avulla yhteen saatettujen tähteiden rinnakkain asettamisen kautta. Lisäksi, kyseessä olevan keksinnön mukaisen 68Kd env-proteiinin rakenne tekee sen erityisen sopivaksi rokotteena suoritettavaa käyttöä varten. 68Kd env-proteiini käsittää suuren osan geenin tuotteesta, jonka (a) osoitettiin reagoivan kaikkien tutkittujen AIDS-seerumeiden kanssa; ja (b) sillä osoitettiin olevan ainutlaatuinen rakenteellinen piirre, joka käsitti sekä ekstra-

sellulaarisen hydrofiilisen alueen että transmembraanin hydrofobisia alueita. Viimeksi mainittu rakennepiirre tekee sen erittäin sopivaksi rokotteena suoritettavaa käyttöä varten, käyttämällä liposomikapselointia vehikkelin aikaansaamiseksi annostelua varten.

Annostelutiet, antigeeniannos, injektioiden lukumäärä ja taajuus ovat kaikki optimointikysymyksiä kyseessä olevan aiheen piirissä, erityisesti ottaen huomioon sen seikan, että on kokemusta suojaavan immuniteetin antamisessa ruiskuttamalla muita läheisiä antigeeneja immuniteetin aikaan saamiseksi muissa virusinfektioissa. Pääasiallisen merkityksen immuniteetin aikaansaamisessa arvioidaan olevan niille henkilöille, jotka eivät aiemmin ole olleet alttiina AIDS:lle, esim. henkilöille, jotka kuuluvat erittäin alttiina olevaan väestöön, kuten esimerkiksi homoseksuaalit, narkootikot sekä Haitilta että Keski-Afrikasta peräisin oleva väestö sekä henkilöt, jotka saavat verensiirtoja. Ennakoidaan myös, että nisäkkäiden ohimenevä immuniteetti saatetaan saada aikaan immunisoimalla äidit raskauden aikana.

Esimerkki 7

Diagnostinen testi AIDS:a varten

On selvää, että kyseessä olevan keksinnön mukaisia env-geenin proteiineja saatetaan käyttää diagnostisina reagensseina AIDS:iin kytkeytyvien vasta-aineiden havaitsemiseen. Aiheeseen perehtyneelle on myös selvää, että AIDS-viruksen läsnäolon havaitsemiseen humaani verestä saatetaan käyttää diagnostista testiä, jossa käytetään polyklonaalisia tai monoklonaalisia vasta-aineita kyseessä olevan keksinnön mukaiselle AIDS env-proteiinille. Eräässä suoritusmuodossa käytetään immunologista kilpailevaa pitoisuusmääritystä (competition immunoassay), jossa antigeeniaine, tässä tapauksessa AIDS-virus, verinäytteessä kilpailee tunnetusta määrästä merkattua antigeenia, tässä tapauksessa merkattua AIDS env-proteiinia, rajoitetusta määrästä vasta-aineen sitoutumiskohtia. Täten merkatun antigeenin määrä,

joka on sidottu vasta-aineeseen, on kääntäen verrannollinen näytteen sisältämään antigeenin määrään. Toisessa suoritusmuodossa saatetaan käyttää immunometristä pitoisuusmääritystä, jossa käytetään merkattua AIDS-env:n vasta-ainetta. Sellaisessa pitoisuusmäärityksessä merkatun vasta-aineen määrä, joka muodostaa komplekseja antigeeniin sidotun vasta-aineen kanssa, on suoraan verrannollinen verinäytteen sisältämän antigeenin (AIDS-virus) määrän kanssa. Yksinkertaisessa kyllä/ei määrityksessä AIDS-viruksen läsnäolon määrittämiseksi verestä, testataan kiinteä alusta merkatun vasta-aineen läsnäolon havaitsemiseksi. Eräässä toisessa suoritusmuodossa saatetaan käyttää AIDS env-proteiinin monoklonaalisia vasta-aineita immunometrisessä määrityksessä. Sellaisia monoklonaalisia vasta-aineita saatetaan saada hyvin tunnetuin menetelmin, erityisesti Milsteinin ja Kohlerin esittämällä menetelmällä, joka on julkaistu Naturessa 256, 495-497 (1975).

Immunometrinen määritysmenetelmä on seuraava: ajetaan rinnakkaisnäytteet, joissa 100 µl agaroosipartikkeleihin liikkumattomaksi tehtyä vasta-aineen suspensiota sekoitetaan 100 µl:n kanssa seerumia ja 100 µl:n kanssa liukoista ^{125}J:llä merkattua vasta-ainetta. Tämä seos inkuboidaan tiettyjä aikoja, joiden pituus on yhdestä neljäsosa tunnista 24 tuntiin. Inkubointijaksojen jälkeen agaroosipartikkelit pestään lisäämällä puskuria ja sentrifugoimalla sen jälkeen. Imemällä suoritetun pesunesteen poiston jälkeen, agaroosipartikkeleiden syntyvä saostuma lasketaan sidotun, ^{125}J:llä merkatun vasta-aineen suhteen. Kutakin kompleksia vastaten saatuja iskuja voidaan sitten verrata kontrolleihin.

Vaikka kyseessä olevaa keksintöä on kuvattu tiettyjen, edullisten suoritusmuotojen termein, muunnoksia, jotka ovat selviä aiheeseen perehtyneelle, saatetaan tehdä poikkeamatta kyseessä olevan keksinnön piiristä. Esimerkiksi, tässä yhteydessä kuvatut env AIDS-DNA:t edustavat vain kahden luonnossa esiintyvän geenisegmentin tarkkaa raken-

netta. Oletetaan löytyvän vähän muunnettuja alleeleja, jotka koodittavat samalla tavalla toimivia proteiineja, ja sellaisia geenisegmenttejä ja proteiineja pidetään samanarvoisina kyseessä olevan keksinnön tarkoituksia varten. Arvellaan myös löytyvän muita muunnoksia tässä yhteydessä kuvattujen lisäksi ja että mainittujen varianttien kuoriproteiini eroaa vähän. Näiden muunnoskuoriproteiinien katsotaan samoin kuuluvan kyseessä olevan keksinnön piiriin. DNA:n, jolla on samanarvoisia kodoneja, katsotaan kuuluvan kyseessä olevan keksinnön piiriin, samoin kuin synteettiset geenisekvenssit, jotka koodittavat viruksen kuoren homologisia proteiineja.

Kyseessä olevan keksinnön erilaiset piirteet esitetään edelleen seuraavissa patenttivaatimuksissa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä immuunikato (AIDS) -viruksen vaippaproteiinin valmistamiseksi, jolla on aminohapposekvenssi

ValTrpLysGluAla
ThrThrThrLeuPheCysAlaSerAspAlaLysAlaTyrAspThrGluValHisAsnValTrpAlaThr
HisAlaCysValProThrAspProAsnProGlnGluValValLeuValAsnValThrGluAsnPheAsn
METTrpLysAsnAspMETValGluGlnMETHisGluAspIleIleSerLeuTrpAspGlnSerLeuLys
ProCysValLysLeuThrProLeuCysValSerLeuLysCysThrAspLeuLysAsnAspThrAsnThr
AsnSerSerSerGlyArgMETIleMETGluLysGlyGluIleLysAsnCysSerPheAsnIleSerThr
SerIleArgGlyLysValGlnLysGluTyrAlaPhePheTyrLysLeuAspIleIleProIleAspAsn
AspThrThrSerTyrThrLeuThrSerCysAsnThrSerValIleThrGlnAlaCysProLysValSer
PheGluProIleProIleHisTyrCysAlaProAlaGlyPheAlaIleLeuLysCysAsnAsnLysThr
PheAsnGlyThrGlyProCysThrAsnValSerThrValGlnCysThrHisGlyIleArgProValVal
SerThrGlnLeuLeuLeuAsnGlySerLeuAlaGluGluGluValValIleArgSerValAsnPheThr
AspAsnAlaLysThrIleIleValGlnLeuAsnThrSerValGluIleAsnCysThrArgProAsnAsn
AsnThrArgLysLysIleArgIleGlnArgGlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIleGly
AsnMETArgGlnAlaHisCysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAlaThrLeuLysGlnIleAlaSer
LysLeuArgGluGlnPheGlyAsnAsnLysThrIleIlePheLysGlnSerSerGlyGlyAspProGlu
IleValThrHisSerPheAsnCysGlyGlyGluPhePheTyrCysAsnSerThrGlnLeuPheAsnSer
ThrTrpPheAsnSerThrTrpSerThrGluGlySerAsnAsnThrGluGlySerAspThrIleThrLeu
ProCysArgIleLysGlnPheIleAsnMETTrpGlnGluValGlyLysAlaMETTyrAlaProProIle
SerGlyGlnIleArgCysSerSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThrArgAspGlyGlyAsnAsnAsn
AsnGlySerGluIlePheArgProGlyGlyGlyAspMETArgAspAsnTrpArgSerGluLeuTyrLys
TyrLysValValLysIleGluProLeuGlyValAlaProThrLysAlaLysArgArgValValGlnArg
GluLysArgAlaValGlyIleGlyAlaLeuPheLeuGlyPheLeuGlyAlaAlaGlySerThrMETGly
AlaAlaSerMETThrLeuThrValGlnAlaArgGlnLeuLeuSerGlyIleValGlnGlnGlnAsnAsn
LeuLeuArgAlaIleGluAlaGlnGlnHisLeuLeuGlnLeuThrValTrpGlyIleLysGlnLeuGln
AlaArgIleLeuAlaValGluArgTyrLeuLysAspGlnGlnLeuLeuGlyIleTrpGlyCysSerGly
LysLeuIleCysThrThrAlaValProTrpAsnAlaSerTrpSerAsnLysSerLeuGluGlnIleTrp
AsnHisThrThrTrpMETGluTrpAspArgGluIleAsnAsnTyrThrSer

tai

CysProLysValSer
PheGluProIleProIleHisTyrCysAlaProAlaGlyPheAlaIleLeuLysCysAsnAsnLysThr
PheAsnGlyThrGlyProCysThrAsnValSerThrValGlnCysThrHisGlyIleArgProValVal
SerThrGlnLeuLeuLeuAsnGlySerLeuAlaGluGluGluValValIleArgSerValAsnPheThr
AspAsnAlaLysThrIleIleValGlnLeuAsnThrSerValGluIleAsnCysThrArgProAsnAsn
AsnThrArgLysLysIleArgIleGlnArgGlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIleGly
AsnMETArgGlnAlaHisCysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAlaThrLeuLysGlnIleAlaSer
LysLeuArgGluGlnPheGlyAsnAsnLysThrIleIlePheLysGlnSerSerGlyGlyAspProGlu
IleValThrHisSerPheAsnCysGlyGlyGluPhePheTyrCysAsnSerThrGlnLeuPheAsnSer
ThrTrpPheAsnSerThrTrpSerThrGluGlySerAsnAsnThrGluGlySerAspThrIleThrLeu
ProCysArgIleLysGlnPheIleAsnMETTrpGlnGluValGlyLysAlaMETTyrAlaProProIle
SerGlyGlnIleArgCysSerSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThrArgAspGlyGlyAsnAsnAsn
AsnGlySerGluIlePheArgProGlyGlyGlyAspMETArgAspAsnTrpArgSerGluLeuTyrLys
TyrLysValValLysIleGluProLeuGlyValAlaProThrLysAlaLysArgArgValValGlnArg
GluLysArgAlaValGlyIleGlyAlaLeuPheLeuGlyPheLeuGlyAlaAlaGlySerThrMETGly
AlaAlaSerMETThrLeuThrValGlnAlaArgGlnLeuLeuSerGlyIleValGlnGlnGlnAsnAsn
LeuLeuArgAlaIleGluAlaGlnGlnHisLeuLeuGlnLeuThrValTrpGlyIleLysGlnLeuGln
AlaArgIleLeuAlaValGluArgTyrLeuLysAspGlnGlnLeuLeuGlyIleTrpGlyCysSerGly
LysLeuIleCysThrThrAlaValProTrpAsnAlaSerTrpSerAsnLysSerLeuGluGlnIleTrp
AsnHisThrThrTrpMETGluTrpAspArgGluIleAsnAsnTyrThrSer

tai

METArgGlnAlaHisCysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAlaThrLeuLysGlnIleAlaSer
LysLeuArgGluGlnPheGlyAsnAsnLysThrIleIlePheLysGlnSerSerGlyGlyAspProGlu
IleValThrHisSerPheAsnCysGlyGlyGluPhePheTyrCysAsnSerThrGlnLeuPheAsnSer
ThrTrpPheAsnSerThrTrpSerThrGluGlySerAsnAsnThrGluGlySerAspThrIleThrLeu
ProCysArgIleLysGlnPheIleAsnMETTrpGlnGluValGlyLysAlaMETTyrAlaProProIle
SerGlyGlnIleArgCysSerSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThrArgAspGlyGlyAsnAsnAsn
AsnGlySerGluIlePheArgProGlyGlyGlyAspMETArgAspAsnTrpArgSerGluLeuTyrLys
TyrLysValValLysIleGluProLeuGlyValAlaProThrLysAlaLysArgArgValValGlnArg
GluLysArgAlaValGlyIleGlyAlaLeuPheLeuGlyPheLeuGlyAlaAlaGlySerThrMETGly
AlaAlaSerMETThrLeuThrValGlnAlaArgGlnLeuLeuSerGlyIleValGlnGlnGlnAsnAsn
LeuLeuArgAlaIleGluAlaGlnGlnHisLeuLeuGlnLeuThrValTrpGlyIleLysGlnLeuGln
AlaArgIleLeuAlaValGluArgTyrLeuLysAspGlnGlnLeuLeuGlyIleTrpGlyCysSerGly
LysLeuIleCysThrThrAlaValProTrpAsnAlaSerTrpSerAsnLysSerLeuGluGlnIleTrp
AsnHisThrThrTrpMETGluTrpAspArgGluIleAsnAsnTyrThrSer

tai

METTyrAlaProProIle
SerGlyGlnIleArgCysSerSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThrArgAspGlyGlyAsnAsnAsn
AsnGlySerGluIlePheArgProGlyGlyGlyAspMETArgAspAsnTrpArgSerGluLeuTyrLys
TyrLysValValLysIleGluProLeuGlyValAlaProThrLysAlaLysArgArgValValGlnArg
GluLysArgAlaValGlyIleGlyAlaLeuPheLeuGlyPheLeuGlyAlaAlaGlySerThrMETGly
AlaAlaSerMETThrLeuThrValGlnAlaArgGlnLeuLeuSerGlyIleValGlnGlnGlnAsnAsn
LeuLeuArgAlaIleGluAlaGlnGlnHisLeuLeuGlnLeuThrValTrpGlyIleLysGlnLeuGln
AlaArgIleLeuAlaValGluArgTyrLeuLysAspGlnGlnLeuLeuGlyIleTrpGlyCysSerGly
LysLeuIleCysThrThrAlaValProTrpAsnAlaSerTrpSerAsnLysSerLeuGluGlnIleTrp
AsnHisThrThrTrpMETGluTrpAspArgGluIleAsnAsnTyrThrSer

tai

METArgAspAsnTrpArgSerGluLeuTyrLys
TyrLysValValLysIleGluProLeuGlyValAlaProThrLysAlaLysArgArgValValGlnArg
GluLysArgAlaValGlyIleGlyAlaLeuPheLeuGlyPheLeuGlyAlaAlaGlySerThrMETGly
AlaAlaSerMETThrLeuThrValGlnAlaArgGlnLeuLeuSerGlyIleValGlnGlnGlnAsnAsn
LeuLeuArgAlaIleGluAlaGlnGlnHisLeuLeuGlnLeuThrValTrpGlyIleLysGlnLeuGln
AlaArgIleLeuAlaValGluArgTyrLeuLysAspGlnGlnLeuLeuGlyIleTrpGlyCysSerGly
LysLeuIleCysThrThrAlaValProTrpAsnAlaSerTrpSerAsnLysSerLeuGluGlnIleTrp
AsnHisThrThrTrpMETGluTrpAspArgGluIleAsnAsnTyrThrSer

t u n n e t t u siitä, että

bakteeri-isäntäsolu transformoidaan ilmentämisvektorilla, joka sisältää AIDS-viruksen vaippaproteiinia koodaavan geenin, joka on alapuolella promoottoria, joka tekee mahdolliseksi transkription, translaation ja mainitun vaippaproteiinin ilmentämisen bakteeri-isäntäsolussa;

bakteeri-isäntäsolua viljellään, niin että AIDS-viruksen vaippaproteiini ilmentyy; ja

AIDS-viruksen vaippaproteiini uutetaan ja eristetään.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että bakteeri on E. coli.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ilmentämisvektori on kuviossa 3 esitetty pEV/env-ryhmän plasmidi.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että plasmidi on pVE1, -2 tai -3/env 44-640.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että plasmidi on pVE1, -2 tai -3/env 205-640.

6. Menetelmä humaaniveren tutkimiseksi vasta-aineiden läsnäolon suhteen AIDS:n virusperäistä etiologista tekijää vastaan, t u n n e t t u siitä, että jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukaisesti saatua AIDS-viruksen vaippaproteiinia sisältävää koostumusta sekoitetaan humaaniverinäytteen kanssa ja määritetään, sitoutuuko AIDS-

vaippaproteiini verinäytteessä läsnäoleviin AIDS-vasta-aineisiin.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään Western blotting -analyysiä.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään ELISA-tekniikkaa, jossa jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukaisesti saatua AIDS-viruksen vaippaproteiinia levitetään kiinteän faasin pinnalle ja saatetaan kosketukseen näytteen kanssa ja saatetaan pesun jälkeen kosketukseen entsyymillä leimatun ei-humaani-IgG:n kanssa.

9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään kaksoisantigeeni-menetelmää.

10. AIDS-viruksen vaippaproteiini, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukaisella menetelmällä.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen AIDS-viruksen vaippaproteiini, t u n n e t t u siitä, että se on homogeeninen proteiini, jossa ei ole muita AIDS-viruksen proteiineja.

12. Ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksessa 1 määriteltyä AIDS-viruksen vaippaproteiinia koodaavan geenin, joka on alapuolella promoottorisekvenssiä, joka tekee mahdollisesti transkription, translaation sekä siten vaippaproteiinin ilmentämisen bakteeri-isäntäsolussa.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että AIDS-viruksen vaippaproteiinia koodaava geeni on geeni, joka käsittää nukleotidisekvenssin

GTGTGGAAGGAAGCA
ACCACCACTCTATTTTGTGCATCAGATGCTAAAGCATATGATACAGAGGTACATAATGTTTGGGCCACA
CATGCCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAAGAAGTAGTATTGGTAAATGTGACAGAAAATTTTAAC
ATGTGGAAAAATGACATGGTAGAACAGATGCATGAGGATATAATCAGTTTATGGGATCAAAGCCTAAAG
CCATGTGTAAAATTAACCCCACTCTGTGTTAGTTTAAAGTGCACTGATTTGAAGAATGATACTAATACC
AATAGTAGTAGCGGGAGAATGATAATGGAGAAAGGAGAGATAAAAAACTGCTCTTTCAATATCAGCACA
AGCATAAGAGGTAAGGTGCAGAAAGAATATGCATTTTTTTATAAACTTGATATAATACCAATAGATAAT
GATACTACCAGCTATACGTTGACAAGTTGTAACACCTCAGTCATTACACAGGCCTGTCCAAAGGTATCC
TTTGAGCCAATTCCCATACATTATTGTGCCCCGGCTGGTTTTGCGATTCTAAAATGTAATAATAAGACG
TTCAATGGAACAGGACCATGTACAAATGTCAGCACAGTACAATGTACACATGGAATTAGGCCAGTAGTA
TCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAGAGGTAGTAATTAGATCTGTCAATTTCACG
GACAATGCTAAAACCATAATAGTACAGCTGAACACATCTGTAGAAATTAATTGTACAAGACCCAACAAC
AATACAAGAAAAAAAAATCCGTATCCAGAGGGGACCAGGGAGAGCATTTGTTACAATAGGAAAAATAGGA
AATATGAGACAAGCACATTGTAACATTAGTAGAGCAAAATGGAATGCCACTTTAAAACAGATAGCTAGC
AAATTAAGAGAACAATTTGGAAATAATAAAACAATAATCTTTAAGCAATCCTCAGGAGGGGACCCAGAA
ATTGTAACGCACAGTTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTTCTACTGTAATTCAACACAACTGTTTAATAGT
ACTTGGTTTAATAGTACTTGGAGTACTGAAGGGTCAAATAACACTGAAGGAAGTGACACAATCACACTC
CCATGCAGAATAAAACAATTTATAAACATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCCTCCCATC
AGCGGACAAATTAGATGTTCATCAAATATTACAGGGCTGCTATTAACAAGAGATGGTGGTAATAACAAC
AATGGGTCCGAGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAA
TATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGA
GAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC
GCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAT
TTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAG
GCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGA
AAACTAATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGG
AATCACACGACGTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGC

14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että AIDS-viruksen vaippaproteiinia koodaava geeni on geeni, joka käsittää nukleotidisekvenssin

TGTCCAAAGGTATCC
TTTGAGCCAATTCCCATACATTATTGTGCCCCGGCTGGTTTTGCGATTCTAAAATGTAATAATAAGACG
TTCAATGGAACAGGACCATGTACAAATGTCAGCACAGTACAATGTACACATGGAATTAGGCCAGTAGTA
TCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAGAGGTAGTAATTAGATCTGTCAATTTCACG
GACAATGCTAAAACCATAATAGTACAGCTGAACACATCTGTAGAAATTAATTGTACAAGACCCAACAAC
AATACAAGAAAAAAAAATCCGTATCCAGAGGGGACCAGGGAGAGCATTTGTTACAATAGGAAAAATAGGA
AATATGAGACAAGCACATTGTAACATTAGTAGAGCAAAATGGAATGCCACTTTAAAACAGATAGCTAGC
AAATTAAGAGAACAATTTGGAAATAATAAAACAATAATCTTTAAGCAATCCTCAGGAGGGGACCCAGAA
ATTGTAACGCACAGTTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTTCTACTGTAATTCAACACAACTGTTTAATAGT
ACTTGGTTTAATAGTACTTGGAGTACTGAAGGGTCAAATAACACTGAAGGAAGTGACACAATCACACTC
CCATGCAGAATAAAACAATTTATAAACATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCCTCCCATC
AGCGGACAAATTAGATGTTCATCAAATATTACAGGGCTGCTATTAACAAGAGATGGTGGTAATAACAAC
AATGGGTCCGAGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAA
TATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGA
GAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC
GCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAT
TTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAG
GCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGA
AAACTAATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGG
AATCACACGACGTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGC

15. Patenttivaatimuksen 12 mukainen ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että AIDS-viruksen vaippaproteiinia koodaava geeni on geeni, joka käsittää nukleotidisekvenssin

ATGAGACAAGCACATTGTAACATTAGTAGAGCAAAATGGAATGCCACTTTAAAACAGATAGCTAGC
AAATTAAGAGAACAATTTGGAAATAATAAAACAATAATCTTTAAGCAATCCTCAGGAGGGGACCCAGAA
ATTGTAACGCACAGTTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTTCTACTGTAATTCAACACAACTGTTTAATAGT
ACTTGGTTTAATAGTACTTGGAGTACTGAAGGGTCAAATAACACTGAAGGAAGTGACACAATCACACTC
CCATGCAGAATAAAACAATTTATAAACATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCCTCCCATC
AGCGGACAAATTAGATGTTCATCAAATATTACAGGGCTGCTATTAACAAGAGATGGTGGTAATAACAAC
AATGGGTCCGAGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAA
TATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGA
GAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC
GCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAT
TTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAG
GCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGA
AAACTAATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGG
AATCACACGACGTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGC

16. Patenttivaatimuksen 12 mukainen ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että AIDS-viruksen vaippaproteiinia koodaava geeni on geeni, joka käsittää nukleotidisekvenssin

ATGTATGCCCCTCCCATC
AGCGGACAAATTAGATGTTCATCAAATATTACAGGGCTGCTATTAACAAGAGATGGTGGTAATAACAAC
AATGGGTCCGAGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAA
TATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGA
GAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC
GCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAT
TTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAG
GCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGA
AAACTAATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGG
AATCACACGACGTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGC

17. Patenttivaatimuksen 12 mukainen ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että AIDS-viruksen vaippaproteiinia koodaava geeni on geeni, joka käsittää nukleotidisekvenssin

ATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAA
TATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGA
GAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC
GCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAT
TTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAG
GCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGA
AAACTAATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGG
AATCACACGACGTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCT

18. Jonkin patenttivaatimuksen 12 - 17 mukainen ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että se on plasmidi, joka pystyy replikoitumaan gram-negatiivisessa bakteerissa.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että se pystyy replikoitumaan E. coli -kannassa.

20. Patenttivaatimuksen 18 tai 19 mukainen ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että se on kvuiossa 3 esitetyn ryhmän pEV/env jäsen.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että se on pEV1, -2 tai -3/env 44-640.

22. Patenttivaatimuksen 20 mukainen ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että se on pEV1, -2 tai -3/env 205-640.

23. Transformantti, t u n n e t t u siitä, että se on bakteeri, joka kantaa jonkin patenttivaatimuksen 12 - 22 mukaista ilmentämisvektoria.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen transformantti, t u n n e t t u siitä, että se on E. coli -kanta.

25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen transformantti, t u n n e t t u siitä, että se on E. coli -kanta MC 1061.

Kuvio 1

```
   1 ATTCTGCAACAACTGCTGTTTATCCATTTTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGAATAGGCGTTACTCG   69
  70 ACAGAGGAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGC  138
 139 CTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCATTGCCAAGTTTGTTTCATAACAA  207
 208 AAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGA  276
 277 CTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTATACAAATAGCAATAGTAG  345
 346 CATTAGTAGTAGCAATAATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATAT  414
 415 TAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGA  483
 484 GTGAAGGAGAAATATCAGCACTTGTGGAGATGGGGGTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATGTTG  552
 553 ATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCA  621
 622 ACCACCACTCTATTTTGTGCATCAGATGCTAAAGCATATGATACAGAGGTACATAATGTTTGGGCCACA  690
 691 CATGCCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAAGAAGTAGTATTGGTAAATGTGACAGAAAATTTTAAC  759
 760 ATGTGGAAAAATGACATGGTAGAACAGATGCATGAGGATATAATCAGTTTATGGGATCAAAGCCTAAAG  828
 829 CCATGTGTAAAATTAACCCCACTCTGTGTTAGTTTAAAGTGCACTGATTTGAAGAATGATACTAATACC  897
 898 AATAGTAGTAGCGGGAGAATGATAATGGAGAAAGGAGAGATAAAAAACTGCTCTTTCAATATCAGCACA  966
 967 AGCATAAGAGGTAAGGTGCAGAAAGAATATGCATTTTTTTATAAACTTGATATAATACCAATAGATAAT 1035
1036 GATACTACCAGCTATACGTTGACAAGTTGTAACACCTCAGTCATTACACAGGCCTGTCCAAAGGTATCC 1104
1105 TTTGAGCCAATTCCCATACATTATTGTGCCCCGGCTGGTTTTGCGATTCTAAAATGTAATAATAAGACG 1173
1174 TTCAATGGAACAGGACCATGTACAAATGTCAGCACAGTACAATGTACACATGGAATTAGGCCAGTAGTA 1242
1243 TCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAGAGGTAGTAATTAGATCTGTCAATTTCACG 1311
1312 GACAATGCTAAAACCATAATAGTACAGCTGAACACATCTGTAGAAATTAATTGTACAAGACCCAACAAC 1380
1381 AATACAAGAAAAAAAATCCGTATCCAGAGGGGACCAGGGAGAGCATTTGTTACAATAGGAAAAATAGGA 1449
1450 AATATGAGACAAGCACATTGTAACATTAGTAGAGCAAAATGGAATGCCACTTTAAAACAGATAGCTAGC 1518
1519 AAATTAAGAGAACAATTTGGAAATAATAAAACAATAATCTTTAAGCAATCCTCAGGAGGGGACCCAGAA 1587
1588 ATTGTAACGCACAGTTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTTCTACTGTAATTCAACACAACTGTTTAATAGT 1656
1657 ACTTGGTTTAATAGTACTTGGAGTACTGAAGGGTCAAATAACACTGAAGGAAGTGACACAATCACACTC 1725
1726 CCATGCAGAATAAAACAATTTATAAACATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCCTCCCATC 1794
1795 AGCGGACAAATTAGATGTTCATCAAATATTACAGGGCTGCTATTAACAAGAGATGGTGGTAATAACAAC 1863
1864 AATGGGTCCGAGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAA 1932
1933 TATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGA 2001
2002 GAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC 2070
2071 GCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAT 2139
2140 TTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAG 2208
2209 GCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGA 2277
2278 AAACTAATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGG 2346
2347 AATCACACGACGTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATT 2415
2416 GAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTG 2484
2485 TGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTG 2553
2554 GTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTGTAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTA 2622
2623 TCGTTTCAGACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGA 2691
2692 GAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGG 2760
2761 AGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTT 2829
2830 CTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTA 2898
2899 AAGAATAGTGCTGTTAGCTTGCTCAATGCCACAGCTATAGCAGTAGCTGAGGGGACAGATAGGGTTATA 2967
2968 GAAGTAGTACAAGAAGCTTATAGAGCTATTCGCCACATACCTAGAAGAATAAGACAGGGCTTGGAAAGG 3036
3037 ATTTTGCTATAAGATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTGCTGTAAGGGAAAG 3105
3106 AATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGA                    3156
```

Kuvio 2 (3 sivua)

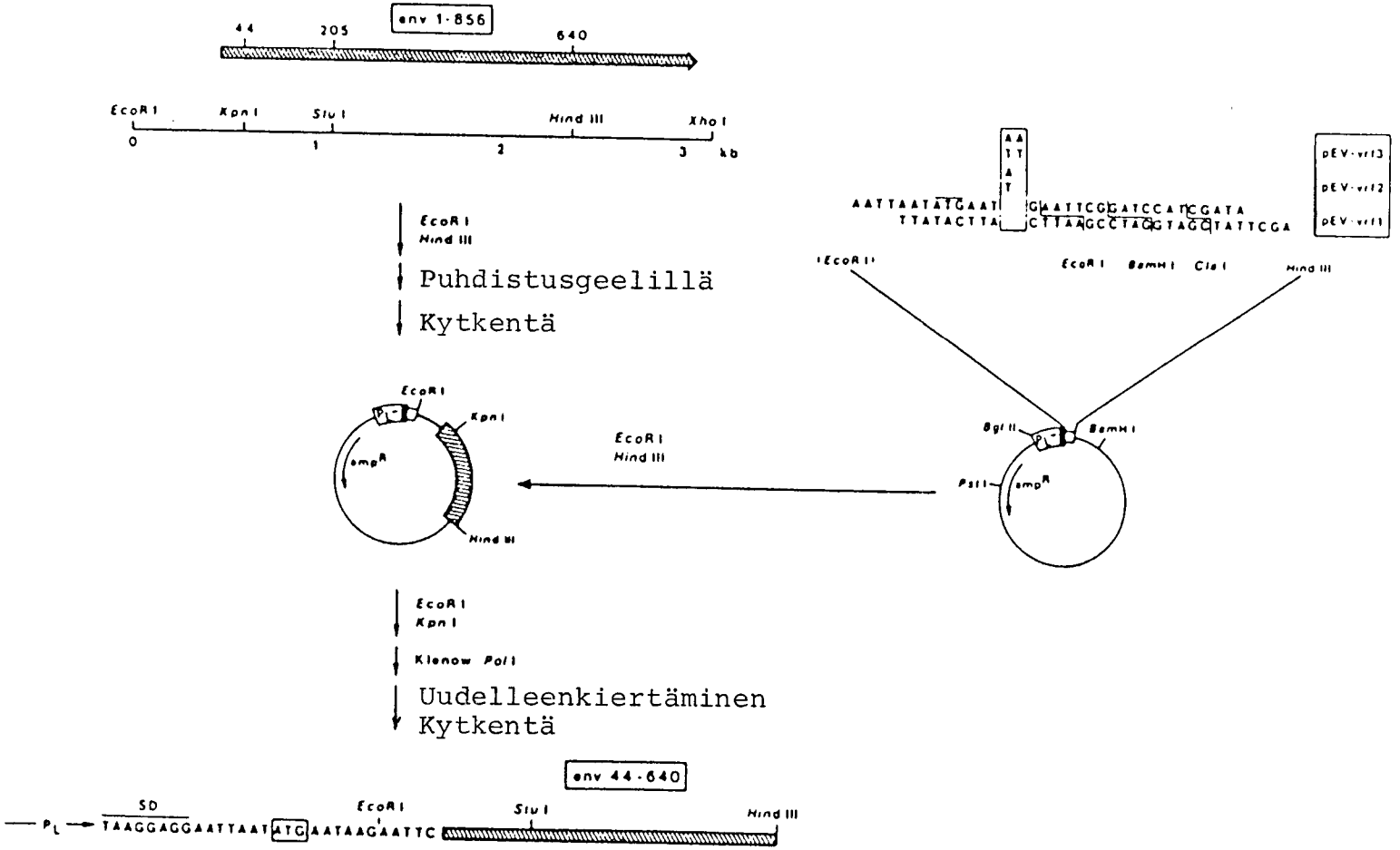
```
         1                                                                50

HXB-3    MRVKEK-----YQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATT
BH-10
BH-8                                                   F
LAV                          K       I
ARV-2     K  --GTRRN        ---- -                     -        --

        51                                                  100

HXB-3    TLFCASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLVNVTENFNMWKNDM
BH-10
BH-8
LAV
ARV-2           R                            G           N

       101                                                     150

HXB-3    VEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVSLKCTDLKNDTNTNSS-----SGRMIME
BH-10
BH-8
LAV                                        G A      NTNSS  E M
ARV-2        Q                      T N    G A      NWKEEI------

       151                                                     200

HXB-3    KGEIKNCSFNISTSIRGKVQKEYAFFYKLDIIPIDND--TTSYTLTS---CNTSV
BH-10
BH-8                  K
LAV
ARV-2              T    D I   N L RN  VV    AST  N  NYRLIH  R

       201                                                 250

HXB-3    ITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNNKTFNGTGPCTNVSTVQCTHG
BH-10
BH-8
LAV                                       A
ARV-2                     T                 K

       251                                                 300

HXB-3    IRPVVSTQLLLNGSLAEEEVVIRSVNFTDNAKTIIVQLNTSVEINCTRPN
BH-10                           A              Q
BH-8                                          D
LAV                             A              Q
ARV-2       I                   D   N          E  A
```

```
      301                                                        350

HXB-3   NNTRKKIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQ-AHCNISRAKWNATLKQIASKLR
BH-10         S                                        N     D
BH-8                                                         D
LAV           S
ARV-2         S Y --       H T R IGDIRK         Q  N  E  VK


      351                                                        400

HXB-3   EQFGNNKTIIFKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTW
BH-10
BH-8
LAV
ARV-2             V N          M      R        T      N  -RLNH


      401                                                        450

HXB-3   STEGSNNTEGSDTITLPCRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGQIRCSSNIT
BH-10     K                    I
BH-8      K                    I
LAV
ARV-2   -    --- K N   I       I                 G   S


      451                                                        500

HXB-3   GLLLTRDGG-NNNNGSEIFRPGGGDMRDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTK
BH-10             - S  E
BH-8              - S  E
LAV               -                        --
ARV-2             T VT DT V                   I       I


      501                                                        550

HXB-3   AKRRVVQREKRAVGI-GALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQ
BH-10                   -
BH-8                    -
LAV                     -                  R
ARV-2                   V  M               V L


      551                                                        600

HXB-3   QQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCSG
BH-10             G
BH-8
LAV
ARV-2                                  V       R
```

```
      601                                                       650

HXB-3   KLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNHTTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQ
BH-10                             NM
BH-8                              NM
LAV                               NM
ARV-2                        D  DNM   Q E   D   NT YT


      651                                                       700

HXB-3   NQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFA
BH-10
BH-8
LAV                                       I
ARV-2                           S         I


      701                                                       750

HXB-3   VLSVVNRVRQGYSPLSFQTHLPIPRGPDRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVN
BH-10
BH-8       I                   N
LAV        I                   T
ARV-2      I                R  V       D                V   D


      751                                                       800

HXB-3   GSLALIWDDLRSLCLFSYHRLRDLLLIVTRIVELLGRRGWEALKYWWNLL
BH-10
BH-8
LAV
ARV-2    F     E          R        AA T  I  H          S


      801                                                       850

HXB-3   QYWSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVQEAYRAIRHIPRRIRQG
BH-10                                    G
BH-8               N                  L  A
LAV                                      G C
ARV-2      I         W        T         A R     L  H


      851  856

HXB-3   LERILL
BH-10
BH-8
LAV
ARV-2      L
```

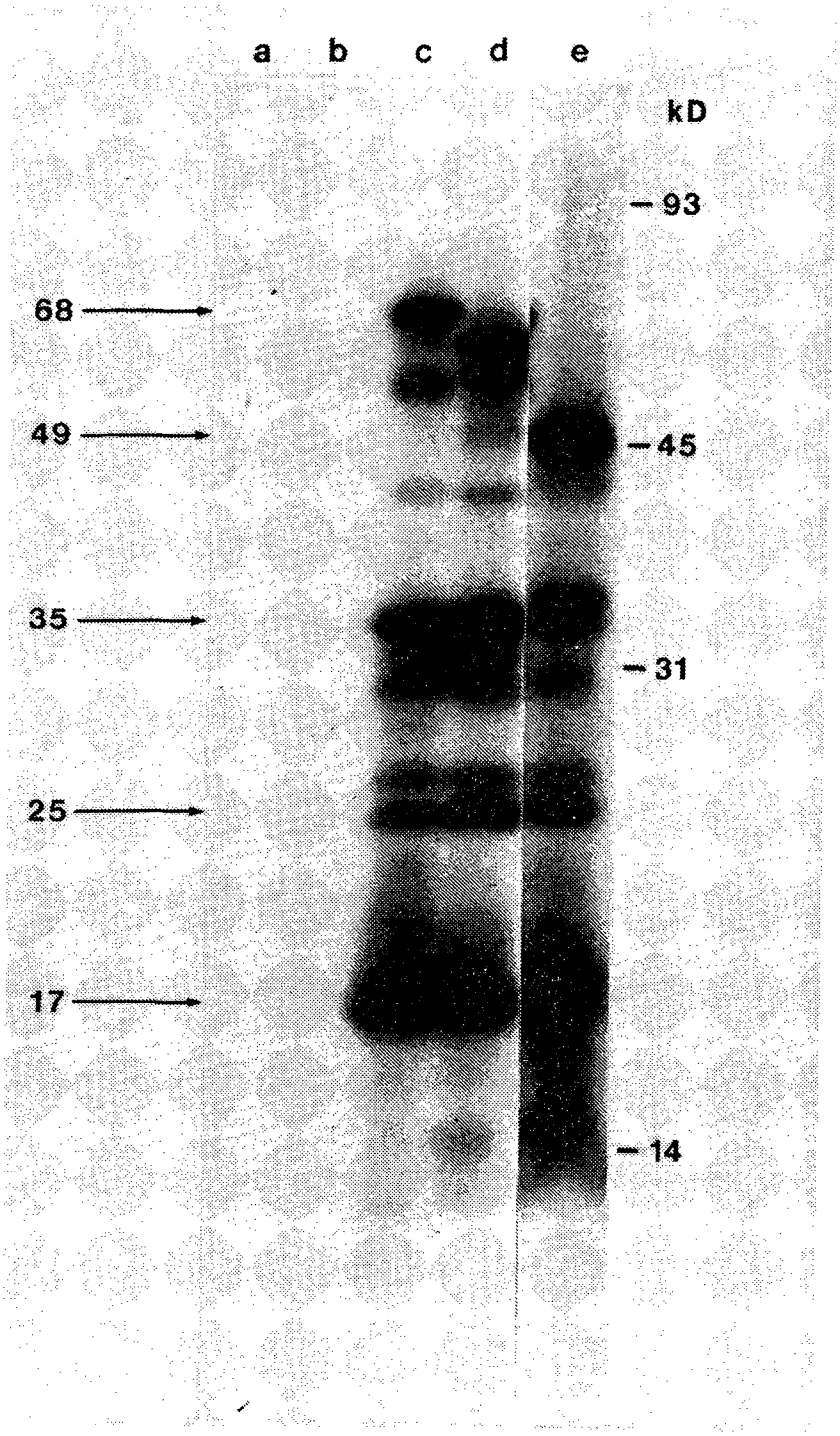
" - " merkitsee yhden aminohapon deleetiota. Tyhjä tila merkitsee yhtäläisyyttä HXB-3 sekvenssin kanssa.

Kuvio 3

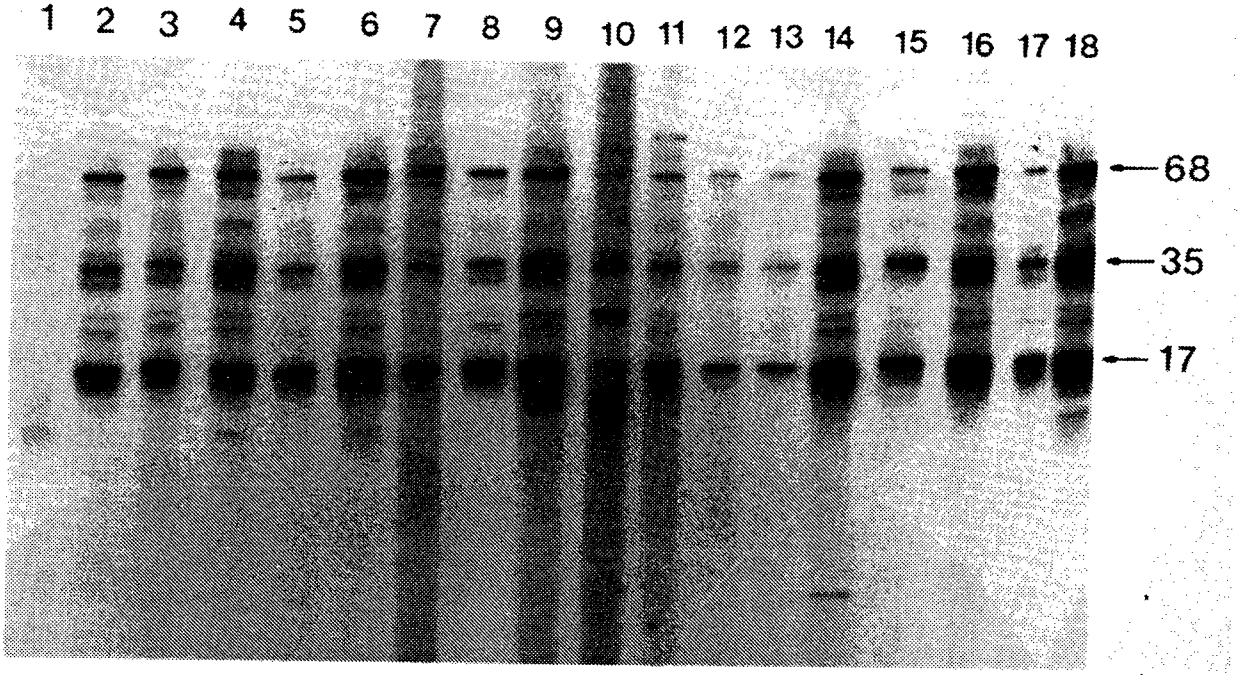


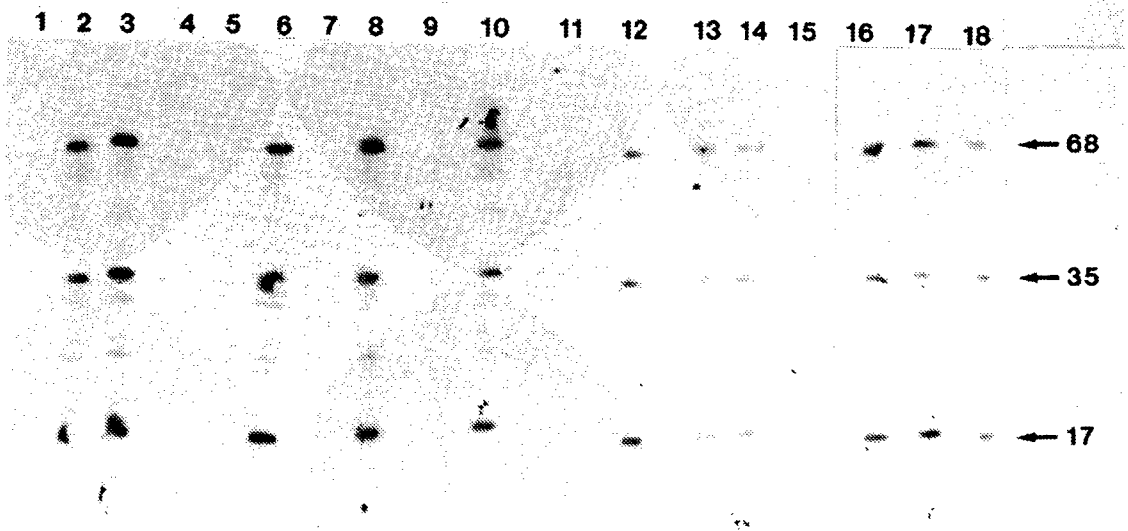
env 1-856
44
205
640
EcoR I
Kpn I
Stu I
Hind III
Xho I
0
1
2
3
kb
EcoR I
Hind III
Puhdistusgeelillä
Kytkentä
AATTAATATGAAT
TTATACTTA
GAATTCGGATCCATCGATA
CTTAAGCCTAGGTAGCTATTCGA
pEV-vrf3
pEV-vrf2
pEV-vrf1
EcoR I
BamH I
Cla I
Hind III
Bgl II
BamH I
Pst I
amp^R
EcoR I
Hind III
EcoR I
Kpn I
amp^R
Hind III
EcoR I
Kpn I
Klenow Pol I
Uudelleenkiertäminen
Kytkentä
env 44-640
SD
EcoR I
Stu I
Hind III
P_L
TAAGGAGGAATTAATATGAATAAGAATTC

Kuvio 4



Kuvio 5


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
68
35
17


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
68
35
17

Kuvio 6A

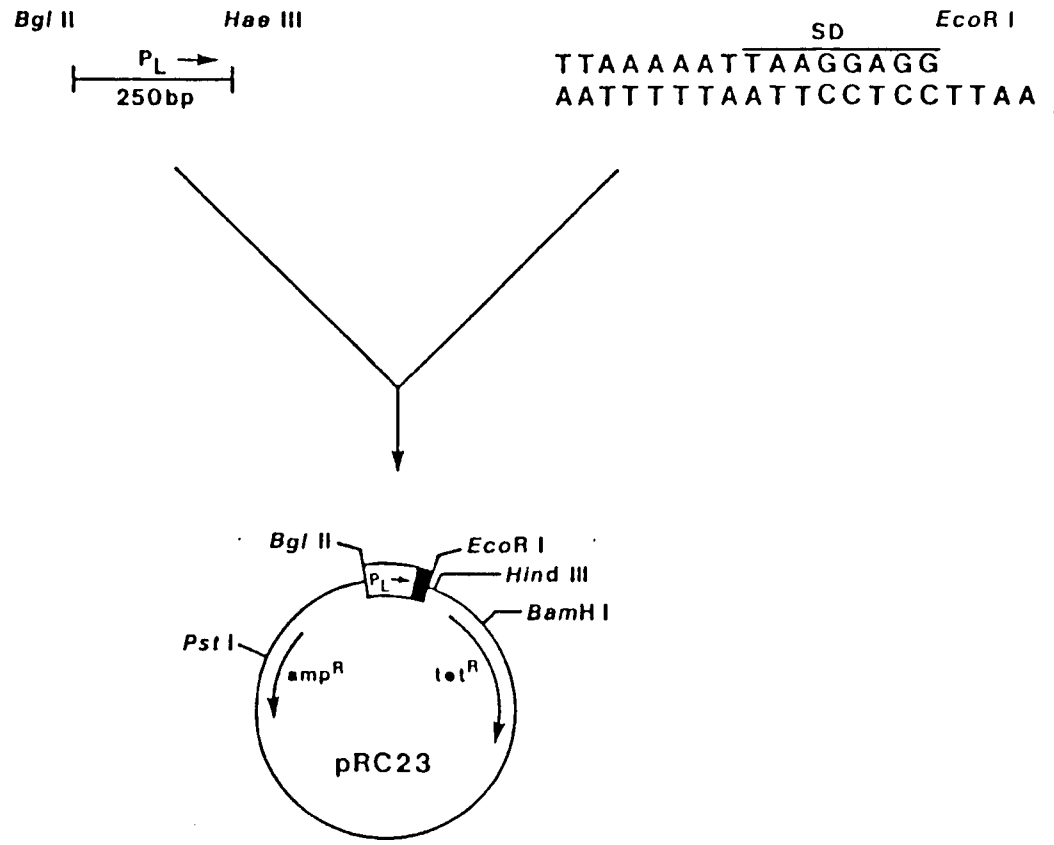
METArg
ValLysGluLysTyrGlnHisLeuTrpArgTrpGlyTrpArgTrpGlyThrMETLeuLeuGlyMETLeu
METIleCysSerAlaThrGluLysLeuTrpValThrValTyrTyrGlyValProValTrpLysGluAla
ThrThrThrLeuPheCysAlaSerAspAlaLysAlaTyrAspThrGluValHisAsnValTrpAlaThr
HisAlaCysValProThrAspProAsnProGlnGluValValLeuValAsnValThrGluAsnPheAsn
METTrpLysAsnAspMETValGluGlnMETHisGluAspIleIleSerLeuTrpAspGlnSerLeuLys
ProCysValLysLeuThrProLeuCysValSerLeuLysCysThrAspLeuLysAsnAspThrAsnThr
AsnSerSerSerGlyArgMETIleMETGluLysGlyGluIleLysAsnCysSerPheAsnIleSerThr
SerIleArgGlyLysValGlnLysGluTyrAlaPhePheTyrLysLeuAspIleIleProIleAspAsn
AspThrThrSerTyrThrLeuThrSerCysAsnThrSerValIleThrGlnAlaCysProLysValSer
PheGluProIleProIleHisTyrCysAlaProAlaGlyPheAlaIleLeuLysCysAsnAsnLysThr
PheAsnGlyThrGlyProCysThrAsnValSerThrValGlnCysThrHisGlyIleArgProValVal
SerThrGlnLeuLeuLeuAsnGlySerLeuAlaGluGluGluValValIleArgSerValAsnPheThr
AspAsnAlaLysThrIleIleValGlnLeuAsnThrSerValGluIleAsnCysThrArgProAsnAsn
AsnThrArgLysLysIleArgIleGlnArgGlyProGlyArgAlaPheValThrIleGlyLysIleGly
AsnMETArgGlnAlaHisCysAsnIleSerArgAlaLysTrpAsnAlaThrLeuLysGlnIleAlaSer
LysLeuArgGluGlnPheGlyAsnAsnLysThrIleIlePheLysGlnSerSerGlyGlyAspProGlu
IleValThrHisSerPheAsnCysGlyGlyGluPhePheTyrCysAsnSerThrGlnLeuPheAsnSer
ThrTrpPheAsnSerThrTrpSerThrGluGlySerAsnAsnThrGluGlySerAspThrIleThrLeu
ProCysArgIleLysGlnPheIleAsnMETTrpGlnGluValGlyLysAlaMETTyrAlaProProIle
SerGlyGlnIleArgCysSerSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThrArgAspGlyGlyAsnAsnAsn
AsnGlySerGluIlePheArgProGlyGlyGlyAspMETArgAspAsnTrpArgSerGluLeuTyrLys
TyrLysValValLysIleGluProLeuGlyValAlaProThrLysAlaLysArgArgValValGlnArg
GluLysArgAlaValGlyIleGlyAlaLeuPheLeuGlyPheLeuGlyAlaAlaGlySerThrMETGly
AlaAlaSerMETThrLeuThrValGlnAlaArgGlnLeuLeuSerGlyIleValGlnGlnGlnAsnAsn
LeuLeuArgAlaIleGluAlaGlnGlnHisLeuLeuGlnLeuThrValTrpGlyIleLysGlnLeuGln
AlaArgIleLeuAlaValGluArgTyrLeuLysAspGlnGlnLeuLeuGlyIleTrpGlyCysSerGly
LysLeuIleCysThrThrAlaValProTrpAsnAlaSerTrpSerAsnLysSerLeuGluGlnIleTrp
AsnHisThrThrTrpMETGluTrpAspArgGluIleAsnAsnTyrThrSerLeuIleHisSerLeuIle
GluGluSerGlnAsnGlnGlnGluLysAsnGluGlnGluLeuLeuGluLeuAspLysTrpAlaSerLeu
TrpAsnTrpPheAsnIleThrAsnTrpLeuTrpTyrIleLysLeuPheIleMETIleValGlyGlyLeu
ValGlyLeuArgIleValPheAlaValLeuSerValValAsnArgValArgGlnGlyTyrSerProLeu
SerPheGlnThrHisLeuProIleProArgGlyProAspArgProGluGlyIleGluGluGluGlyGly
GluArgAspArgAspArgSerIleArgLeuValAsnGlySerLeuAlaLeuIleTrpAspAspLeuArg
SerLeuCysLeuPheSerTyrHisArgLeuArgAspLeuLeuLeuIleValThrArgIleValGluLeu
LeuGlyArgArgGlyTrpGluAlaLeuLysTyrTrpTrpAsnLeuLeuGlnTyrTrpSerGlnGluLeu
LysAsnSerAlaValSerLeuLeuAsnAlaThrAlaIleAlaValAlaGluGlyThrAspArgValIle
GluValValGlnGluAlaTyrArgAlaIleArgHisIleProArgArgIleArgGlnGlyLeuGluArg
IleLeuLeu

Kuvio 6B

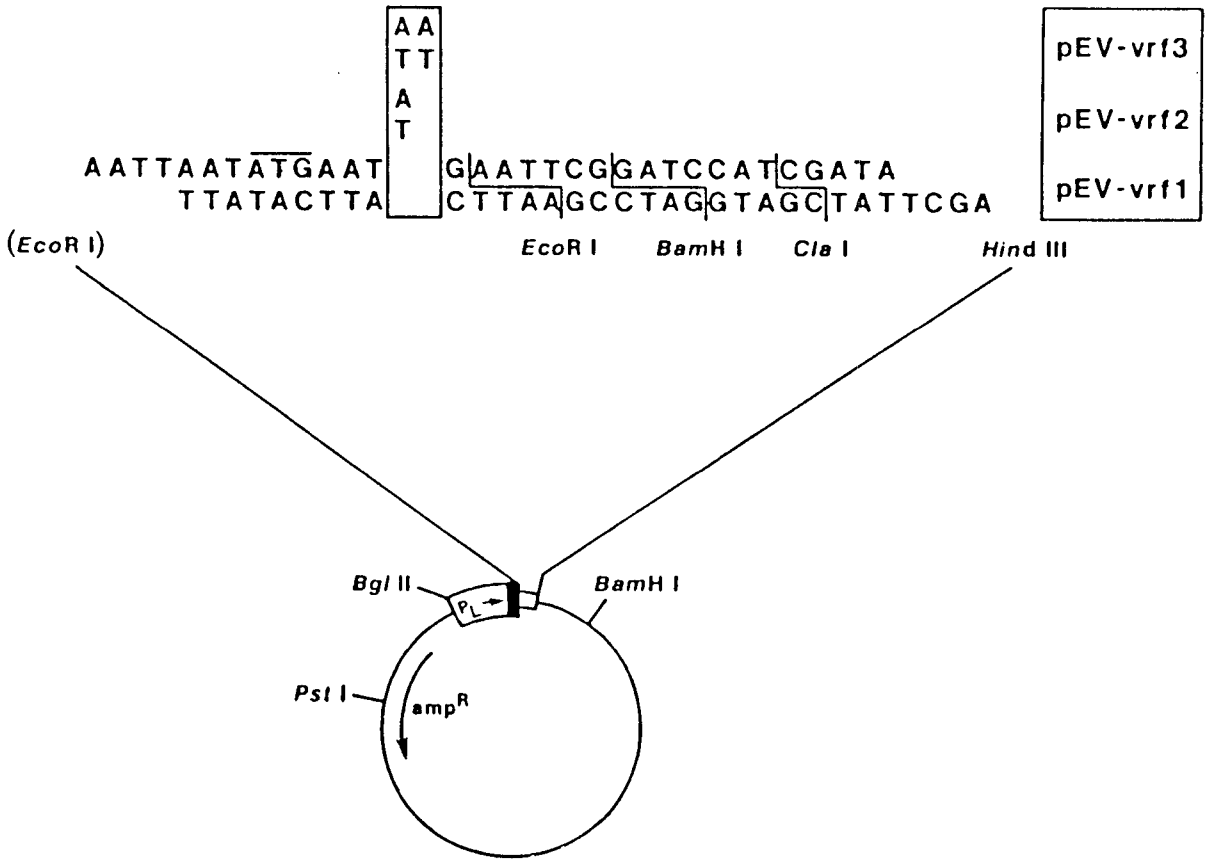
AIDS-kuoriproteiinin
aminohappojakaantuma

	Nimi	Tähteiden lukumäärä
A	Alaniini	47
B	Asparagiinihappo-Asparagiini	0
C	Kysteiini	21
D	Asparagiinihappo	27
E	Glutamiinihappo	49
F	Fenyylialaniini	26
G	Glysiini	58
H	Histidiini	14
I	Isoleusiini	63
K	Lysiini	44
L	Leusiini	83
M	Metioniini	17
N	Asparagiini	60
P	Proliini	29
Q	Glutamiini	42
R	Argiiniini	52
S	Seriini	57
T	Treoniini	60
V	Valiini	56
W	Tryptofaani	31
Y	Tyrosiini	20
Z	Glutamiini-Glutamiinihappo	0

Kuvio 7


Bgl II
Hae III
P_L
250bp
SD
EcoR I
TTAAAAATTAAGGAGG
AATTTTTAATTCCTCCTTAA
Bgl II
EcoR I
Hind III
P_L
BamH I
Pst I
amp^R
tet^R
pRC23

Kuvio 8


AA
TT
A
T
AATTAATATGAAT
TTATACTTA
GAATTCGGATCCATCGATA
CTTAAGCCTAGGTAGCTATTCGA
pEV-vrf3
pEV-vrf2
pEV-vrf1
(EcoR I)
EcoR I
BamH I
Cla I
Hind III
Bgl II
BamH I
PL
Pst I
ampR