



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314090**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 12 N 5/10

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19912099	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1989.11.29, PCT/US89/05155
(22) Inng. dag	1991.05.31	(85) Videreføringsdag	1991.05.31
(24) Løpedag	1989.11.29	(30) Prioritet	1988.12.01, US, 278386
(41) Alm. tilgj.	1991.07.31		
(45) Meddelt dato	2003.01.27		
(71) Patenthaver	SmithKline Beecham Corp, P O Box 7929, Philadelphia, PA 19103, US		
(72) Oppfinner	Hanne Ranch Johansen, Jeffersonville, PA 19403, US Martin Rosenberg, Royersford, PA 19468, US		
(74) Fullmektig	Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo		

(54) Benevnelse **HIV-proteingeneekspressjonsenhet, DNA-vektor som omfatter den, Drosophila-celle transfektort med vektoren, HIV gp 120 og HIV gp 160-protein produsert i en kultur av nevnte celler, vaksine og diagnostisk agens som omfatter proteinet, samt fremgangsmåte for produksjon av HIV-protein i Drosophila-celler og fremgangsmåter for å identifisere HIV-bindende materiale, og rensing av HIV-protein**

(56) Anførte publikasjoner EP 272858
L.A. Lasky et al., Science, Vol. 233, July 1986, side 209-233
B.J. Bond et al., Molecular and cellular Biology, vol. 6, 1986, side 2080-2088
D.L. Lynn et al., Mechanisms of Control of Gene Expression, 1988, side 359-368
T.J. Parker et al., Journal of virological methods, Vol. 18, 1987, side 243-256
M. Bourouis et al., EMBO Journal, vol. 2, july 1983, side 1099-1104
L. Gritz et al., Gene, vol. 25, 1983, side 179-188

(57) Sammendrag

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en ny fremgangsmåte for ekspresjon av høye nivåer av HIV glykoproteiner i Drosophila celler.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører hovedsakelig ekspresjon av HIV proteiner i *Drosophila*-celler og rensing av de uttrykte genprodukter. Nærmere bestemt vedrører denne oppfinnelse HIV-proteingenekspresjonsenhet, DNA-vektor som omfatter den, *Drosophila*-celle transfektert med vektoren, HIV gp120 og HIV gp160-protein produsert i en kultur av nevnte celler, vaksine og diagnostisk agens som omfatter proteinet, samt fremgangsmåte for produksjon av HIV-protein i *Drosophila*-celler og fremgangsmåter for å identifisere HIV bindende materiale, og rensing av HIV-protein.

Humant immunosviktivirus type 1 (HIV-1) er det etiologiske gens for ervervet immunsviktsyndrom, også kjent som AIDS. Dette retrovirus har en kompleks genetisk organisasjon, inkludert de lange terminale repetisjoner (LTRer) gag, pol, og env-gener, og andre gener. Dette retrovirus bærer en rekke virusantigener som er potensielle kandidater, enten alene eller sammen som vaksineagens, i stand til å indusere en beskyttende immunreaksjon.

Blant de mer lovende av HIV-1 antigenene er virus-kappe-glykoproteinet (gp160) eller spesifikke fragmenter fra dette. env-genet koder for det 160 kilodalton (kd) forløper-glykoprotein for viruskappen. gp160 spaltes post-translasjonelt i et 120 kd glykoprotein (gp120) og et 41 kd glykoprotein (gp41), som er tilstede på virusoverflaten.

gp120, et 511 aminosyre glykoprotein, er lokalisert på aminoenden to-tredjedeler fra gp160 glykoproteinet og er eksponert på utsiden av viruset. gp120 er vesentlig for vekselvirkningen mellom viruset og dets cellulære reseptor, CD4 proteinet tilstede på overflaten av hjelper T₄-lymfocytter, makrofager og andre celler i immunsystemet. gp120 bestemmer således vevsselektiviteten for virusinfeksjon og bidrar til cytopatogenisiteten til HIV gjennom dets involvering i syncytiumdannelse.

gp41, et 345 aminosyreprotein dannet fra karboksylterminus i gp160, er et integrert membranprotein i HIV-1. gp41 inneholder en rekke hydrofobe aminosyrer som forankrer proteinet i lipid-bilaget i den cellulære plasmamembran. Karboksylenden i gp41 er antatt å stikke ut inn i viruspartikkelen. gp41 eller en del av denne er antatt å være ansvarlig for fusjon mellom HIV-glykoproteinene uttrykt på overflaten av cellen og celler som har overflate T₄-reseptorer.

Delen av gp41 som er antatt å være ansvarlig for denne fusjon, er lokalisert på aminoterminalen. En slik fusjon er antatt å spille en rolle i virusreplikasjon. Se

f.eks. M. Kowalski et al., *Science*, 237: 1351-55 (1987); D.M. Knight et al., *Science*; 236:837-36 (1987).

Disse virusglykoproteiner antar en tertiær struktur idet viruspigge stikker frem, ut fra overflaten av viruspartikkelen. Omtrent 70 til 80 pigge er antatt å være forbundet med hver nye syntetiserte viruspartikkel. Idet viruspartikkelen blir eldre, forsvinner piggene, tilsynelatende fordi forbindelsen mellom gp120 og gp41 er svak. Således, for nylig syntetiserte viruspartikler, er denne virusglykoprotein-pigg antatt å være det mest umiddelbare mål tilgjengelig for immunsystemet etter infeksjon.

Virus-nøytraliserende antistoffer er blitt rapportert rettet mot gp120 og gp41-epitomer. Det er blitt spesifikt lagt merke til at målsetet for typespesifikke nøytraliserende antistoffer er lokalisert i 3'-halvdelen av gp120-glykoprotein-molekylet.

env-genet i HIV-1 har således vært målet for tallrike nylige undersøkelser. Ekspresjon av glykosylert gp160 er tidligere blitt oppnådd i pattedyrceller og visse baculovirus-insektceller ved grupper som også har rapportert induksjon av både humorale og cellulære immunresponser mot disse antigener. gp120 er blitt uttrykt rekombinant med anvendelse av heterologe promotorer i flere systemer. Se f.eks. S. Chakrabarti et al., *Nature (London)*, 320: 537 (1986); og M.P. Kieny et al., *Bio-technology*, 4: 790 (1986).

L.A. Lasky et al., *Science*, 233: 209-212 (1986) konstruerte en rekke plasmider som inneholdt mutant env-gener for transfeksjon i pattedyrceller, spesifikt kinesiske hamsterovarie (CHO) celler. Disse forskere sekreterte et genprodukt kodet for i et plasmid som innehold de første 50 aminosyrer i glykoprotein D (gD) -proteinet forenet i fase med en aminosyresekvens (nr. 61-nr. 531) i env-proteinet, et HPSAG polyA-signal, et DHFR-gen og SV40-replikasjons-utgangspunktet. Det ble produsert et rekombinant kappeantigen som inneholdt 25 aminosyrer av gD i aminoter-minus og manglet 30 rester fra det modne fremstilt fra gp120 og også som hadde en delesjon av gp41-sekvensen (omtrent 20 aminosyrer av karboksylterminus til det aktuelle 160 kd forløper fremstillingssete). Det resulterende gen var 520 aminosyrer i lengde. Når transfektert inn i CHO-celler, inneholdt de cellekondisjonerte supernatanter et 130 kd-protein, kalt gp130.

En senere rapport, L.A. Lasky et al., *Cell*, 50: 975-986 (1987), diskuterte vekselvirkningen mellom gp120-glykoproteinet og dets cellulære reseptor, CD4.

Ved å deletere 12 aminosyrer inneholdt i aminosyrer nr. 410-421 i gp120, resulterte et fullstendig tap av binding. På samme måte resulterte en enkelt aminosyresubstitusjon i posisjon 417 i minsket binding.

Kowalski et al., nevnt ovenfor, innførte delesjon og innskuddsmutasjoner i et plasmid som koder for kappe glykoproteinet dannet fra HTLV-III_B-stammen av HIV-1. Plasmidet inneholdt også art-genet. Pattedyr CD4⁺ og CD4⁻ cellelinjer som uttrykte dette tat-genprodukt, ble anvendt som transfeksjonsresipienter for å studere de transfektete cellers evner til å smelte sammen.

Knight et al, nevnt ovenfor, beskriver ekspresjon av art/trs-transaktivator-proteinet i HIV i pattedyrceller. Pattedyrcellelinjen anvendt til ekspresjon av disse HIV-proteiner var COS-7-apecellelinjen. Disse plasmider anvendte HIV LTR som promotor og RNA-fremstillingssignaler fra SV40 for å uttrykke det innskutte DNA som en funksjonell messenger RNA. For å uttrykke gp120, ble det utviklet et plasmid pENV160 som inneholder hele det kodende området for env-genet sammenføyd med HIV LTR.

S.W. Pyle, Aids Research and Human Retroviruses, 3(4): 387 (1987) beskriver rensing av gp120-glykoproteinet fra kulturfluider av HIV-infiserte H9-celler ved immunoaffinitetskromatografering.

U.S. patent 4.725.669 beskriver også glykoproteiner på omtrent 160 kd og 120 kd oppnådd fra den humane H9/HTLV-III cellelinje, som hver har en omtrent 90 kd uglykosylert del.

Fox, Biotechnology, 6: 116 (1988) rapporterer VAXSYN-HIV-1-vaksinen utviklet av MicroGeneSys. Denne rapport beskriver ikke noen detaljer i denne vaksine.

D.L. Lynn et al., i Mechanisms of control of Gene Expression, Eds. Allan R. Liss Inc., s. 359-368 (1988) beskriver kloningen av hele gp160-genet bak polyhedronpromotoren i baculoviruset *Autographacalifornica*. Disse insektceller infektert med det rekombinante virus, uttrykker et protein som frigjøres fra cellen ved lysis. Dette protein vandrer sammen med gp160, spaltes ikke til gp120 og gp41, og blir glykolyisert og forbundet med cellemembranen. Når deglykolyisert med N-glykanase, hadde proteinet en molekylvekt på omtrent 96 kd. Det rekombinante protein var immunoreaktivt med protein fra HIV-infiserte H9-celler, med antisera mot en rekombinant fraksjon av gp120, med selve gp120, med et peptidfragment av gp41 og med humane AIDS-sera.

R.L. Willey et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., USA, 83: 5083 (1986) beskriver hypervariable områder av aminosyrer i gp120-protein. En senere rapport, R.L. Willey et al, J. Virol., 62(1): 139 (1988) studerte et område i env-genet nødvendig for infektivitet. Spesifikt beskrevet her er aminosyresubstitusjoner i Asp-kodoner i
5 fire N-bundne glykosylerings seter i gp120-genet.

W.R. Gallagher, Cell, 50: 327 (1987) diskuterer en fusjonspeptidsekvens i transmembranprotein gp41 i HIV.

S.D. Putney et al., Science, 234: 1392 (1986) beskriver produksjonen av nøytraliserende antistoffer mot et *E. coli*-produsert fragment av HIV env-genet.

10 B.J. Bond et al., Mol. Cell. Biol., 6(6): 2080 (1986) beskriver strukturen av *Drosophila melanogaster* aktin 5C-genet. Rapporten diskuterer de to transkripsjonsstartseter i aktin 5C-genet og fusjoner mellom promotorsekvensene og bakterielt kloramfenikol acetyltransferasegen innskutt i *D. melanogaster*-vertsceller.

15 P.J. Barr et al., Vaccine, 5: 90 (1987) beskriver ekspresjonen av HIV-proteiner i gjærcellen *Saccharomyces cerevisiae*.

H. Johansen et al., 28th Annual Drosophila Conference, s. 41 (1987) er et sammendrag av den foreliggende søknad som i korte trekk stadfester at *E. coli* gal K-gener regulert av *Drosophila*-metallthioneinpromotor ble uttrykt i *Drosophila*-
20 cellelinjer.

A. Vanderstraten et al., Proceedings of the 7th International Conference on Invertebrate and Fish Tissue Culture, Abstract, University of Tokyo Press, Japan, (1987) og A. Vanderstraten et al., i "Invertebrate and Fish Tissue Culture", Eds. Y. Kuroda et al., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, s. 131-134 (1988) er også
25 publikasjoner av de foreliggende oppfinnere som diskuterer et hygromycin B-seleksjonssystem for anvendelse i ekspresjon av fremmede gener i *D. melanogaster*-celler i kultur. Sammendraget bemerker at systemet ble anvendt til samtidig å innføre og overuttrykke *E. coli* gal K-genet og andre gener av pattedyropprinnelse.

30 Således står det igjen et behov på fagområdet for produksjon på høyt nivå av HIV-proteiner til anvendelse som vaksine og diagnostiske agens.

Søkerens *Drosophila*-system har evnen til å produsere genprodukter i aktiv form og i høye utbytter (typisk 5 mg/l uten noen optimalisering og til så høyt som 50 mg/l med optimalisering) uten behov for tidskonsumerende oppkonsentrerings-

trinn. I tillegg gir dette systemet stabile cellelinjer som er spesielt viktig fordi tilgangen på visse proteiner trengs å være sikret over år. Videre har evnen til å dyrke disse cellene i storskala cellekulturer i lite kostbare medier, gjort dette systemet til en favoritt for fermenteringsforskere og proteinbiokjemikere fordi det ikke trengs store mengder av virus (som i baculovirus-systemet), og de uttrykte proteinene er løselige og biologisk aktive i motsetning til *E. coli*-ekspressjon som typisk gir uløselige inaktive proteiner som ofte trenger re-folding.

Anvendelsen av søkerens *Drosophila*-system til å produsere virale antigener slik som HIV gp120 og gp160, er beskrevet i den foreliggende søknaden. Et antall av andre virale antigener slik som HSV-VP16, HCV-protease, RSV F-protein, etc., har blitt vellykket uttrykt også. Ekspressjon av RSV F-protein er spesielt bemerkelsesverdig fordi ikke noe annet system hittil har kunnet produsere milligram mengder av dette proteinet i en aktiv (eller funksjonell) form. Ekspressjon av dette proteinet under anvendelse av baculovirus-systemet, resulterer i produksjon av et ikke-korrekt prosessert protein som ikke er funksjonelt.

I ett aspekt er den foreliggende oppfinnelse en HIV-proteingeneekspressjonsenhet for anvendelse i produksjon av aktive HIV-proteiner i høyt nivå, kjennetegnet ved at den omfatter en DNA valgt fra gruppen som koder for gp120 eller gp160, og et regulatorisk element nødvendig for transkripsjon av den kodende DNA-sekvens og translasjon i en *Drosophila*-celle.

I relaterte aspekter er denne oppfinnelse en DNA-vektor som omfatter geneekspressjonsenheten i henhold til den foreliggende oppfinnelse.

I ennå et annet relatert aspekt, er denne oppfinnelse en *Drosophila*-celle transfektert med DNA-vektoren i henhold til denne oppfinnelse.

I videre relaterte aspekter er denne oppfinnelse et HIV gp120 eller gp160-protein, som er eller gir opphav til aktive proteiner produsert i en kultur av insektceller i henhold til oppfinnelsen.

I et annet aspekt er denne oppfinnelse en vaksine for å stimulere beskyttelse mot HIV-infeksjon, som omfatter en immunbeskyttende og ikke-toksisk mengde av proteinet produsert ved denne oppfinnelse.

Også gitt ved denne oppfinnelse er et diagnostisk agens anvendbart i påvisning av tilstedeværelse av HIV-infeksjon i en prøve av biologisk fluid som inneholder et *Drosophila*-celleprodusert HIV-protein i henhold til oppfinnelsen. I

tillegg kan proteinet i henhold til den foreliggende oppfinnelse anvendes for identifisere eller isolere HIV-bindingsproteiner eller proteinholdige stoffer så som CD4 eller derivater av disse.

Denne oppfinnelse vedrører også en fremgangsmåte for produksjon av et HIV-protein som omfatter dyrking av *Drosophila*-celler transfektert med en HIV-proteingenekspresjonsenhet ifølge krav 1, i et medium egnet til vekst av cellene. De transfekterte celler, dyrket i nevnte egnede medium, er i stand til å uttrykke nevnte protein av interesse. Proteinene kan deretter oppsamles fra cellen eller cellekulturmediet.

Den foreliggende oppfinnelse gir også en fremgangsmåte for å rense HIV-proteiner i henhold til oppfinnelsen ved at det anvendes en affinitetsharpike som inneholder et monoklonalt antistoff reaktivt med en epitop til stede i ikke-denaturert gp160-proteinprodukter og i modent gp120-protein. Blant antistoffer i denne klasse er det mus monoklonale antistoffet betegnet 178.1.

Andre aspekter og detaljer i den foreliggende oppfinnelse er diskutert i den følgende beskrivelse.

Fremgangsmåten og ekspresjonssystemet i henhold til den foreliggende oppfinnelse forenkler produksjon på høyt nivå av HIV-proteiner, spesielt gp120, gp160, i en *Drosophila*-cellestuktur. *Drosophila*-cellene blir transfektert ved å anvende standard kloningsteknikker som tillater innføring av fremmed DNA i en vertscelle uten på negativ måte å påvirke det fremmede DNA eller vertscellen. De således konstruerte rekombinante *Drosophila*-celler produserer HIV-proteiner.

I kontrast til Baculovirus-systemet fra den tidligere fagkunnskap, hvor HIV-proteinene er gitt bare ved lysis av de infiserte insektsceller, gir fremgangsmåten i henhold til denne oppfinnelse, et kontinuerlig celle-ekspresjonssystem for HIV-proteiner. Ved sekresjon er proteinet tilgjengelig ved rensing fra kulturmediet ved å anvende konvensjonelle teknikker. Alternativt kan proteinet produseres intracellulært eller membranbundet. Proteinene kan ekstraheres fra cellene ved å anvende konvensjonelle teknikker. Alternativt kan membranbundet protein anvendes i en rekke celleassosierte målinger.

En foretrukket *Drosophila*-cellelinje for anvendelse i utførelsen av oppfinnelsen er *D. melanogaster* S₂-linje. S₂-celler [Schneider, J. Embryol. Exp. Morph. 27: 353 (1972)] er stabile cellekulturer av polyploide embryoniske *Drosophila*-celler. Innføring av den cDNA-kodende sekvens for gp160 eller

dens underenhet gp120 eller gp41, eller derivater av disse i *Drosophila* S₂-celler ved DNA transfeksjonsteknikker produserer uventet store mengder av glykoproteiner. Anvendelse av S₂ *Drosophila*-cellen har mange fordeler, inkludert, men ikke begrenset til, dens evne til å vokse i høy tetthet ved romtemperatur. Stabil integrering av seleksjonssystemet har produsert opptil 1000 kopier av den transfekterte genespresjonsenhet inn i cellekromosomene.

Andre *Drosophila*-cellekultursystemer kan også være anvendbare i den foreliggende oppfinnelse. Noen mulige anvendbare celler er f.eks. KC-O *Drosophila Melanogaster*-cellelinje som er en serumfri cellelinje [Schulz et al., "Proc Natl. Acad. Sci. USA, 83: 9428 (1986)]. Preliminære studier ved å anvende KC-O linjen har antydnet at det transfeksjon er mer vanskelig enn med S₂-celler. En annen cellelinje som kan være anvendbar, er en cellelinje fra *Drosophila hydei*. Proteinekspresjon kan oppnås ved å anvende *hydei*-cellelinjen; imidlertid kan transfeksjon inn i denne cellelinje resultere i at det transfekterte DNA blir uttrykt med veldig lav effektivitet [Sinclair et al., Mol. Cell. Biol., 5: 3208 (1985)]. Andre tilgjengelige *Drosophila*-cellelinjer som kan anvendes i denne oppfinnelse, inkluderer S₁ og S₃.

Drosophila-cellene selektert for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse, kan dyrkes i en rekke egnede kulturmedier, inkludert f.eks. M₃-medium. M₃-medium består av en formulering av balanserte salter og essensielle aminosyrer ved en pH på 6,6. Fremstilling av mediene er i det vesentlige som beskrevet av Lindquist, DIS, 58: 163 (1982). Andre konvensjonelle medier for vekst av *Drosophila*-celler kan også anvendes.

Et rekombinant DNA-molekyl eller en vektor som inneholder en HIV-proteingenespresjonsenhet, kan anvendes for å transfektere de selekterte *Drosophila*-celler, i henhold til oppfinnelsen. Genespresjonsenheten inneholder en DNA-kodende sekvens for et selektert HIV-protein eller for et derivat av dette. Slike derivater kan oppnås ved manipulering av gensekvensen ved å anvende tradisjonelle genetiske fremstillingsteknikker, f.eks. mutagenese, restriksjonsendonuklease behandling, ligering av andre gensekvenser, inkludert syntetiske sekvenser og lignende. Se f.eks. T. Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982).

Den HIV DNA-kodende sekvens er nylig blitt publisert. Se Ratner et al., Nature 313:277-284 (1985) eller Wain-Hobson et al., Cell 40: 9-17 (1985). Nukleotidsekvensen er også tilgjengelig fra GenBank (klone BH10, Ratner et al., *supra*).

5 DNA-molekyler som omfatter den kodende sekvens i henhold til denne oppfinnelse, kan dannes fra HTLV-III infektete celler ved å anvende kjente teknikker (se Hahn et al., Nature 312:166-169 (1984), eller, kan alternativt syntetiseres ved standard oligonukleotidteknikker. Videre er det tallrike rekombinante vertceller som inneholder de klonede DNA-kodende sekvenser, som
10 er vidt tilgjengelige.

Derivater kan så fremstilles ved standard teknikker, inkludert DNA-syntese. Slike derivater kan inkludere f.eks. gp120 eller gp160 molekyler hvor én eller flere aminosyrer er blitt substituert, addert eller deletert uten signifikant å påvirke bindingskapasiteten eller de biologiske egenskaper til proteinet på negativ måte.
15 Derivater av disse proteiner kan også fremstilles ved standard kjemiske modifiseringsteknikker, f.eks. acylering, metylering.

Også inkludert i genekspressjonsheten er regulatoriske områder nødvendige eller ønskelige for transkripsjon av den HIV-proteinkodende sekvens og dens påfølgende translasjon og ekspresjon i vertscellen. Det regulatoriske
20 området inneholder typisk et promotorområde som virker i bindingen av RNA-polymerase og initieringen av RNA-transkripsjon. Promotorområdet er typisk funnet i oppstrømsretning fra HIV-proteinet som koder for sekvensen.

Foretrukne promotorer er av *Drosophila*-opprinnelse, f.eks. *Drosophila*-metallthionein-promotoren [Lastowski-Perry et al., J. Biol. Chem., 260: 1527
25 (1985)]. Denne induserbare promotor dirigerer transkripsjon på høyt nivå av genet i nærvær av metaller, f.eks. CuSO₄. Anvendelse av *Drosophila*-metallthionein-promotoren resulterer i ekspresjonssystemet i henhold til oppfinnelsen og bevarer full regulering selv i et veldig høyt kopiantall. Dette er i direkte kontrast til anvendelse av pattedyr metallthionein-promotoren i pattedyrceller hvor den
30 regulatoriske virkning av metallet minskes idet kopiantallet økes. I *Drosophila*-ekspresjonssystemet øker denne bevarte induserbarhetsvirkning ekspresjon av genproduktet i *Drosophila*-cellen ved høyt kopiantall.

Drosophila aktin 5C-gen-promotoren [B.J. Bond et al., Mol. Cell. Biol., 6: 2080 (1986)] er også en ønsket promotorsekvens. Aktin 5C-promotoren er en

iboende promotor og krever ikke tilsetning av metall. Derfor er den bedre egnet til anvendelse i et produksjonssystem i stor skala, som et perfusjonssystem, enn *Drosophila*-metallthionein-promotoren. En tilleggsfordel er at fraværet av en høy konsentrasjon av kobber i mediet opprettholder cellene i en friskere tilstand i

5 lengre tidsperioder.

Eksempler på andre kjente *Drosophila*-promotorer inkluderer f.eks. de induuserbare varmesjokk (Hsp70) og COPIA LTR-promotorene. SV40 tidlig-promotor gir lavere nivåer av ekspresjon enn *Drosophila*-metallthionein-promotoren. Promotorer som vanligvis blir anvendt i celleekspresjonsvektorene, inkludert f.eks.

10 fugl Rous sarkoma virus LTR og simian virus (SV40 tidlig promotor) viser dårlig funksjon og ekspresjon i *Drosophila*-systemet.

En ønsket genekspresjonsenhet eller ekspresjonsvektor for HIV-proteinet kan konstrueres ved å føye sammen den HIV-proteinkodende sekvens med en ønsket signalsekvens. Signalsekvensen virker slik at den dirigerer sekresjonen av

15 proteinet fra vertscellen. En slik signalsekvens kan dannes fra sekvensen av vevsplasminogenaktivator (tPA). Andre tilgjengelige signalsekvenser inkluderer f.eks. de dannet fra Herpes Simplex-virusgen HSV-I gD [Lasky et al., Science supra]

Den HIV DNA-kodende sekvens kan også følges av et poly-adenylerings

20 (poly A) -område, slik som et SV40 tidlig poly A-område. Poly-A-området som virker i polyadenylering av RNA-transkripsjoner, viser seg å spille en rolle i stabilisering av transkripsjon. Et likt poly-A-område kan dannes fra en rekke gener hvor de er naturlig tilstede. Dette område kan også modifiseres for å forandre sekvensen, forutsatt at polyadenylering og transkripsjonsstabiliserings funksjoner

25 ikke blir signifikant påvirket på negativ måte.

Det rekombinante DNA-molekyl kan også bære en genetisk seleksjons-markør, så vel som HIV-proteingenfunksjonene. Seleksjonsmarkøren kan være et hvilket som helst gen eller gener som forårsaker en lett påvisbar fenotypisk forandring i en transfektert vertscelle. En slik fenotypisk forandring kan f.eks.

30 være medikamentresistens, slik som genet for hygromycin B-resistens.

Alternativt kan et seleksjonssystem hvor man anvender medikamentet metotrexat, og prokaryot dihydrofolat reduktase (DHFR)-gen, anvendes med *Drosophila*-celler. Den endogen eukaryote DHFR i cellene inhiberes av metotrexat. Derfor, ved å transfektere cellene med et plasmid som inneholder det

prokaryote DHFR, som er ufølsomt for metotrexat og å selektere med metotrexat, vil bare celler transfektert med og som uttrykker den prokaryote DHFR overleve. Ulik metotrexat i seleksjon av transformerte pattedyr- og bakterieceller, kan metotrexat anvendes i *Drosophila*-systemet til initielt høy-kopi antall transfektanter.

5 Bare celler som har inkorporert det beskyttende prokaryote DHFR-gen, vil overleve. Samtidig har disse celler genekspresjonsenheten av interesse.

Et illustrativt plasmid produsert i henhold til den foreliggende oppfinnelse, er pgp160 Δ 32, som inneholder et gp160-derivat som erstatter den N-terminale 32 aminosyresekvens av gp160 med den første aminosyre i tPA, serin. Dette plasmid er videre beskrevet i eksempel 1.

En annen slik plasmidvektor er pgp120F Δ 32 som inneholder gp160-sekvens som har de første 32 aminosyrer erstattet med serin og som inneholder en karboksyldelesjon på 216 aminosyrer. Dette plasmid er også beskrevet i eksempel 1.

15 Enda et annet plasmid som illustrerer derivatproteinene i henhold til den foreliggende oppfinnelse, er pgp120 Δ 32, som inneholder hele den kodende sekvens for gp120 minus de første 32 aminosyrer i N-terminalen, som er erstattet av serin. I tillegg inneholder plasmid pgp120 Δ 274 en gp120-proteinsekvens som har erstattet de første 274 aminoterminal aminosyrer med den første aminosyre i tPA, serin, og som inneholder de gjenværende aminosyrer i gp120 opptil fremstillingssetet i gp160. Disse vektorkonstruksjoner er beskrevet mer fullstendig i eksempel 1.

Så snart det er blitt konstruert et rekombinant DNA-molekyl eller en ekspresjonsvektor som inneholder HIV-protein geneksrepresjonsenheten, kan det transfekteres inn i den selekterte *Drosophila*-celle ved å anvende standard transfeksjonsteknikker. Slike teknikker er kjent for fagmenn på området og inkluderer f.eks. kalsiumfosfat ko-presipitering, cellefusjon, elektroporering, mikroinjeksjon og virustransfeksjon.

25 Et to-vektor system kan anvendes i den foreliggende oppfinnelse for å ko-transfekte i *Drosophila*-cellen en genekspresjonsenhet for det ønskede HIV-protein eller et derivat og det kodende området for seleksjonssystemet som skal anvendes. En foretrukket illustrativ utførelsesform av denne oppfinnelse er produksjonen av et HIV-protein hvor man anvender en vektor som inneholder en

HIV-protein ekspresjonsenhet, f.eks. pgp120 Δ 32, og en vektor som inneholder en hygromycin B-genekspresjonsenhet, f.eks. pCOHYGRO. pgp120 Δ 32 inneholder en ekspresjonsenhet som omfatter *Drosophila* metallthionein-promotoren, et derivat av gp120-genet, og SV40 poly A-setet. Denne gp120-ekspresjonsenhet i kombinasjon med pCOHYGRO-vektorsystemet vil produsere et gp120-derivat i *S*₂ *Drosophila*-celler ved å maksimere fordelene med hygromycin B-resistens for seleksjon. Med dette system kan det antibiotiske hygromycin B anvendes til å selektere for de celler som inneholder de transfekterte vektorer. En mer fullstendig beskrivelse av denne utførelsesform er beskrevet i eksempel 2.

Som et annet eksempel kan det anvendes et ekspresjonssystem hvor man anvender DHFR-genet/metotrexat-seleksjonssystemet, som består av vektorene pgp120 Δ 32 og pHGCO, for å selektere metotrexat-resistente celler for ekspresjon av gp120 eller et derivat av dette. Vektoren pgp120 Δ 32 omfatter en gp120-genekspresjonsenhet hvor promotoren er *Drosophila* metallthionein-promotoren. pHGCO-vektoren omfatter en DHFR-genekspresjonsenhet og blir ko-transfektet med pgp120 Δ 32-vektoren, og gir derved DHFR-genene nødvendig for seleksjon. Disse selekterbare markører sammen med ko-transfeksjon av *Drosophila*-celler, er videre beskrevet av Johansen et al., US patentsøknad serie nr. 07/047 736, inngitt 8. mai 1987 og er inkorporert ved referanse her.

I henhold til oppfinnelsen blir de to vektorer ko-transfektet inn i *S*₂ *Drosophila*-celle ved å anvende fremgangsmåten som beskrevet av Wigler et al., Cell, 16: 777 (1979). Vektorene blir ko-transfektet i varierende forhold, avhengig av det spesielle ønskede kopiantall. De transfekterte celler blir så selektert, slik som i *M*₃-medium som inneholder serum og i passende seleksjonsmiddel, f.eks. hygromycin-B eller metotrexat.

Så snart en passende vektor er blitt konstruert og transfektet inn i den selekterte *Drosophila*-cellelinje, blir ekspresjonen av gp120 induert ved tilsetning av et passende induksjonsmiddel for den induserbare promotor. For eksempel er kadmium eller kobber induksjonsmidler for metallthionein-promotoren. Varme er induksjonsmiddelet for Hsp70-promotoren. For iboende promotorer slik som aktin 5C-promotoren, kreves det ikke noe induksjonsmiddel for ekspresjon.

Transkripsjon og ekspresjon av den HIV-protein kodende sekvens i det ovenfor beskrevne systemer, kan måles. For eksempel kan Southern blot analyse

anvendes for å bestemme kopiantall av gp120-genet. Northern blot analyse gir informasjon vedrørende størrelsen av den transkriberte gensekvens [se, f.eks. Maniatis et al., nevnt ovenfor]. Transkripsjonsnivået kan også kvantifiseres. Ekspresjon av det selekterte HIV-protein i de rekombinante celler kan videre
5 verifiseres gjennom Western blot analyse og aktivitetstester på det resulterende glykoprotein [se eksempel 5].

Drosophila S₂-celler er spesielt egnet til produksjon med høyt utbytte av protein i fremgangsmåten i henhold til den foreliggende oppfinnelse. Cellene kan opprettholdes i suspensjonskulturer ved romtemperatur (24±1°C). Kulturmedium
10 er M₃ tilsatt mellom 5 og 10 % (v/v) varme-inaktivert føtalt okseserum (FBS). I den foretrukne utførelsesform av oppfinnelsen, inneholder kulturmediet 5 % FBS. Etter induksjon, blir cellene dyrket i serumfritt medium. Når pCOHYGRO-ektorsystemet anvendes, blir mediene også tilsatt 300 µg/ml hygromycin B. I dette medium kan S₂-cellene dyrkes i suspensjonskulturer, f.eks. i 250 ml til 2000 ml spinnekolber,
15 med røring ved 50-60 rpm. Celletettheter blir typisk opprettholdt mellom 10⁶ og 10⁷ celler pr. ml. I en utførelsesform av denne oppfinnelse blir cellene dyrket før induksjon i 1500 ml spinnekolber i medium som inneholder 5 % serum.

Etter cellekultur kan HIV-proteinet isoleres fra de anvendte medier, f.eks. ved anvendelse av en monoklonal antistoff-affinitetskolonnes. Andre kjente
20 proteinrensningstrinn, f.eks. metallchelater, forskjellige affinitetskromatograferings-trinn eller absorpsjonskromatografering, kan anvendes for å rense HIV-proteinet fra kulturmediet. Anvendelse av cellelinjen S₂ som utskiller genproduktet direkte inn i mediet, er en viktig side av den foreliggende oppfinnelse. Direkte sekresjon inn i mediet tillater anvendelse av et effektivt ett-trinns rensingssystem. Ved å
25 anvende en monoklonal antistoffkolonne rettet mot HIV-proteinet, kan det anvendte kulturmedium tilsettes direkte til kolonnen, og proteinet elueres ved å anvende 1,5 M KSCN i fosfatbufret saltvann (PBS).

En foretrukket rensingsteknikk som muliggjør effektiv produksjon i storskala av HIV-proteinene i henhold til oppfinnelsen, anvender en immunoaffinitetskolonnes
30 som inneholder et monoklonalt antistoff rettet mot en epitop tilstede i gp160 og tilstede i modne sekreterte gp120-proteiner. Et slikt monoklonalt antistoff er fordelaktig på grunn av dets kapasitet til å gjenvinne proteinsekvensen i mer enn én konfigurasjon. Et antistoff som har disse egenskaper, og er anvendbart i

immunoaffinitetskolonner for forskjellige HIV-proteiner, derivater eller fragmenter av dette er betegnet 178.1. Dette monoklonale antistoff er beskrevet i større detalj i eksempel 3. En slik kolonne i henhold til oppfinnelsen kan lages ved å binde et antistoff med egenskapene til 178.1 til en konvensjonell absorberende bærer, slik
5 som Sephadex, under passende konvensjonelle betingelser for pH, temperatur og lignende. En slik rensingskolonne og fremgangsmåte kan anvendes for å separere HIV-proteinene og fragmentene til den foreliggende oppfinnelse.

Andre monoklonale antistoffer kan anvendes i denne rensingsprosedyre. En rekke monoklonale antistoffer som er i stand til å binde seg til HIV-proteiner, spesielt gp160 eller gp120, er blitt beskrevet på fagområdet og er tilgjengelige.
10 Andre nye monoklonale antistoffer anvendbare i denne oppfinnelse, kan utvikles ved nye konvensjonelle teknikker. Glykoproteinene produsert av *Drosophila*-celler, i henhold til denne oppfinnelse, er fullstendig frie for forurensende materialer, f.eks. pattedyr-, gjærceller-, bakterier- og mer viktig, andre HIV-virus-materialer. *Drosophila*-produserte HIV-proteiner er også blitt vist å ha forskjellige glykosyleringsmønstre enn det som er rapportert av andre systemer, f.eks.
15 pattedyrsystemer.

HIV-proteinene og de produserte derivater i henhold til den foreliggende oppfinnelse, kan være anvendbare i en rekke produkter. For eksempel kan disse
20 rekombinante proteiner anvendes i farmasøytiske blandinger til behandling av HIV-infiserte individer. En slik farmasøytisk blanding, i henhold til den foreliggende oppfinnelse, omfatter en terapeutisk effektiv mengde av HIV-proteinet eller et derivat av oppfinnelsen i blanding med en farmasøytisk akseptabel bærer. Blandingen kan administreres systemisk, enten parenteralt, intravenøst eller
25 subkutant. Når administrert systemisk er den terapeutiske blanding for anvendelse i henhold til denne oppfinnelse, i form av en pyrogenfri, parenteralt akseptabel vandig løsning. Fremstillingen av en slik parenteralt akseptabel proteinløsning, som er passende med henblikk på pH, isotonsitet, stabilitet o.l., er innen kunnskapen på fagområdet.

30 Doseringskjemaet vil være bestemt av den praktiserende lege, idet man tar i betraktning forskjellige faktorer som modifierer virkningen av medikamenter, f.eks. pasientens tilstand, kroppsvekt, kjønn og diett, alvoret av enhver infeksjon, administreringstiden og andre kliniske faktorer. Den farmasøytiske bærer og

andre komponenter i en farmasøytisk formulering vil velges av en fagmann på området.

I tillegg kan de rekombinante proteiner i henhold til den foreliggende oppfinnelse anvendes som komponenter for vaksiner for å inokulere pattedyr-individer mot HIV infeksjon. Disse proteiner kan anvendes alene eller sammen med andre rekombinante proteiner eller terapeutiske vaksinemidler. Komponenter for en slik vaksine vil bestemmes av en fagmann på området.

Til slutt kan proteinene i henhold til den foreliggende oppfinnelse være anvendbare som diagnostiske agens for påvisning av tilstedeværelse av HIV-infeksjon eller antistoffer mot et HIV-infektivt agens i biologiske fluider, slik som blod, serum, spytt o.l. Disse proteiner i henhold til oppfinnelsen kan også anvendes i fremgangsmåter for å identifisere og/eller isolere HIV-bindingsproteiner eller andre HIV-bindende stoffer i biologiske fluider og vev, f.eks. CD4 eller derivater av dette. Proteinene kan således være komponenter i testsett for å utføre slike fremgangsmåter. For å identifisere et HIV-bindende stoff, blir det anvendt et protein i henhold til oppfinnelsen, for å bringe stoffet eller en uren blanding som inneholder stoffet i kontakt, under betingelser for å fremme binding mellom proteinet og det HIV-bindende stoff. En konvensjonell måling for å påvise forekomsten av binding, f.eks. påvisning av radioaktive markører eller lignende, er også en del av fremgangsmåten. Tilstedeværelse av binding mellom proteinet og det bindende stoff, er derfor indikativt på HIV-binding.

På samme måte, i en fremgangsmåte for å isolere et HIV-bindende stoff fra blandingen, kan bindingsforekomsten følges ved en konvensjonell fremgangsmåte for å rense den bundne enhet dannet av proteinet i henhold til den foreliggende oppfinnelse og det HIV-bindende stoff fra blandingen. Andre komponenter i slike diagnostiske systemer og testsett kan være konvensjonelle komponenter i det diagnostiske testsett og kan velges av fagmenn på området.

De følgende eksempler illustrerer konstruksjonen av eksemplise vektorer og transformanter i henhold til oppfinnelsen, det foretrukne rensingssystem og målinger for bestemmelse av produksjonsnivået av glykoproteiner gp120 og gp160. Disse eksempler må ikke betraktes som å begrense rekkevidden av denne oppfinnelse.

Restriksjonsenzymmer og andre reagenser ble anvendt i det vesentlige i henhold til oppfinnernes instruksjoner.

Eksempler

Eksempel 1. Vektorkonstruksjoner

a) pMTtPA

5 Som den basiske vektor for genekspressjon i *Drosophila*, ble tPA-ekspressjonsvektor pMTtPA (også kalt pDMtPA) anvendt. Denne vektor er et derivat av vektor pML1, en liten pBR322 vektor som inneholder beta-laktamase-genet som har deletert gift-sekvensene [Mellon et al., Cell, 27: 297 (1982)]. Disse sekvenser er inhibitoriske mot forøkning av vektoren. Denne vektor ble spaltet
10 med Sal1 og Aat2 som fjerner et lite stykke av pBR322, og de spaltede ender ble utfylt. Det manglende stykke av pBR322 blir så erstattet med en kassett som inneholder *Drosophila* metallthionein-promotoren på et ende-utfyllt EcoR1-Stu1-fragment, etterfulgt av et utfyllt HindIII-Sac1-fragment fra dDSP1 [D.S. Pfarr et al., DNA, 4•(6): 461 (1985)] som inneholder en tPA-sekvens som inneholder signal-
15 sekvensen, prepeptidet og hele det kodende området av tPA. tPA-genet på dette fragment er fulgt av et SV40 tidlig-polyadenyleringssete.

b) pgp160Δ32

Et HindIII-Xba1-fragment som inneholder hele env-genet blir isolert fra en
20 HIV-isolatklon BH10 [L. Ratner et al., nevnt ovenfor; GenBank]. Hele gp160-sekvensen ble så innskutt inn i Nco1-Xba1 spaltet vektor pDSP1. Den resulterende vektor, SU2, ble spaltet med Nde1, fulgt av behandling med mungbønne nuklease og videre digestert med Sac1, idet man således isolerte gp160-genet. Spaltingen med Nde1 kuttet gp160-sekvensen ved aminosyre nr.
25 32. Sac1 spaltingen kutter 3' i gp160-genet, inkludert i sekvensen en del av den opprinnelige pDSP1-vektor som inneholder en polylinker. Dette fragment ble innskutt i den ovenfor beskrevne ekspressjonsvektor pMTtPA som var blitt spaltet med Bg1II, endeutfylt, og videre kuttet med Sac1, som deleterer den modne tPA-sekvens. Bg1II setet er plassert i den første aminosyre i tPA. Følgelig koder den
30 resulterende vektor pgp160Δ32 for et modifisert gp160-protein som har erstattet de N-terminale 32 aminosyrer i gp160 med serin.

c) pgg120Δ32

En annen vektor som inneholder en modifisert gensekvens som koder for HIV-1 overflateglykoprotein gp160, ble konstruert ved å spalte pgg160Δ32 med HindIII og SacI, og derved fjerne karboksylterminalen i gp160. Omtrent to tredjedeler av sekvensen som koder for gp41 fjernes ved denne spaltingen. Således mangler denne gp160-sekvens de første 32 aminosyrer og de siste 216 aminosyrer i den naturlige gp160-sekvens. Den deleterte sekvens ble erstattet av en kort syntetisk linker-sekvens som koder for et stoppkodon på et HinIII-SacI-fragment. 6-aminosyre-linker sekvensen er som følger:

10 5'AGCTTTGACTGACTGAGCT 3'

d) pgg120Δ32

Ennå en annen vektor som inneholder et mutant gp160-gen, ble konstruert ved å spalte pgg160Δ32 med StyI og XbaI, for derved å spalte hele sekvensen i protein gp41 og omtrent 30 aminosyrer i karboksylterminus i gp120 glykoprotein-sekvensen. Dette fragmentet ble erstattet av en syntetisk StyI-XbaI-linkersekvens som koder for den korrekte karboksylterminus fra StyI-setet til fremstillingssetet i gp120-gp41. Denne sekvens ble fulgt av et stoppkodon. Denne sekvens inneholdt derved hele den kodende sekvens for gp120 minus de første 32 aminosyrer og ikke noe av den gp41-kodende sekvens.

20

e) pgg120Δ274

Ennå en annen eksempelvis vektor som inneholder et mutant gp120-gen, ble konstruert som følger: et 720-basepar karboksylterminal fragment av gp120 ble isolert ved delvis spalting av pgg120Δ32 med BglII etterfulgt av XbaI-spalting. Dette fragment ble nå innskutt istedenfor tPA-genet inn i den BglII-XbaI avkuttete pMTtPA-ekspressjonsvektoren. Den resulterende vektor p120Δ274 koder for et gp120-protein som har erstattet de første 274 aminoterminal aminosyrer med den første aminosyren i tPA, serin.

30

f) pCOHYGRO

Et kommersielt tilgjengelig plasmid, pUC18 (BRL) som inneholder et BamHI og SmaI-sete, ble anvendt. 5'-LTR fra et integrert COPIA-element (357 basepar) ble klonet inn i BamHI-setet i vektor pUC18, hvilket resulterte i vektoren betegnet pUCOPIA. COPIA er et representativt medlem av de spredte midtre repetisjons-sekvenser funnet spredt gjennom *Drosophila*-genomet [Rubin et al, i Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 45: 619 (1980)]. Vektor pUCOPIA ble avkuttet i SmaI-setet og *E.coli*-genet som koder for hygromycin B-fosfotransferase (hygromycin B-kasset), ble klonet inn i pUCOPIA ved å anvende standard kloningsteknikker.

Hygromycin B-kassetten ble isolert på et HindIII-BamHI-fragment på 1481 basepar fra vektoren DSP-hygro [Gertz et al., *Gene*, 25: 179 (1983)]. Hygromycin B-kassetten inneholder sekvensen som koder for hygromycin B fosfotransferase-genet og SV40 tidlig poly-A-området. HindIII og BamHI-setene ble utfyllt ved å anvende T₄ DNA-polymerase, og hygromycin B-kassetten ble ligert inn i SmaI-setet i vektor pUCOPIA som produserer vektor pCOHYGRO.

Eksempel 2. Transfeksjon inn i *Drosophila* S₂-celler

pCOHYGRO ble ko-transfektet inn i S₂ *Drosophila*-celler sammen med en av vektorene som bærer et gp160 mutantgen under kontroll av *Drosophila* metallthionein-promotoren som beskrevet ovenfor. For formål i dette eksempel er den anvendte vektor pgp120Δ32. De transfektete celler ble selektert i M₃-medium som inneholdt 5 % serum og 300 μ/ml hygromycin B. Etter 2 til 3 dager under identiske betingelser stopper de ikke-transfektete celler å dele seg og begynner å dø. Tiden for seleksjon for å oppnå stabile, voksne hygromycin B-resistente celler i de transfektete kulturer er omtrent 2 til 3 uker.

For å oppnå kulturer som har integrert forskjellig kopiantall av gp120 mutantgenet i sine kromosomer, ble forholdene mellom de to vektorene variert. Forholdet i dette eksempel var 20:1. Lignende forhold er blitt anvendt for andre gp160 mutantvektorer i henhold til denne oppfinnelse. Dette forhold er det samme når en hvilken som helst av de gp160 mutante vektorer anvendes.

Ekspresjon av pgp120Δ32 genproduktet ble verifisert etter induksjon av metallthionein promotoren med 500 μM CuSO₄. Western blot-analyse av den

anvendte supernatant fra de induserte cellekulturer åpenbarte et enkeltbånd i omtrent 100 kd.

Nivået av det mutante gp160 genprodukt i cellesupernatant-ene ble målt ved å anvende gp120 ELISA-assay, beskrevet i eksempel 4, og ved å anvende rensede virus gp120 som standarder. 5 x 10⁶ celler/ml ble sådd ut i M₃-medium uten serum og indusert i 3 til 4 dager. Nivået av gp120 målt i supernatanten er omtrent 1-2 mg/l.

Celler ble opprettholdt som suspensjonskulturer i 250 ml til 2000 ml spinnekolber. Kulturmedium var M₃ tilsatt 300 µg/ml hygromycin B. Kulturer ble inkubert ved 24±°C og rørt ved 50-60 rpm. Celletettheter ble typisk opprettholdt mellom 10⁶ og 10⁷ celler pr. ml i M₃-medium tilsatt hygromycin B. CuSO₄ ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 500 M, og kulturene ble tillatt å vokse i 3 til 4 dager i serum-fritt medium, før innhøsting av det modifiserte gp120 glykoprotein.

Proteinene produsert i henhold til denne fremgangsmåten var omtrent 100 MW, og ekspresjonsnivået var høyere enn noen annen rapportert gp120/gp160 ekspresjon i noe eukaryot celledystem. I standard biologiske aktivitetmålinger er det rensede, uttrykte modifiserte gp120, som beskrevet ovenfor, i stand til å inhibere virusinfeksjon i vevskultur, binde T₄ og reagere med antistoffer mot gp120.

Det er forventet at en med fagkunnskap på området kan uttrykke de andre gp160 og gp120-proteinene og fragmenter av disse, beskrevet ved den foreliggende oppfinnelse, ved å anvende i det vesentlige de samme systemer og fremgangsmåter som eksemplifisert ovenfor for proteinfragmenter kodet for i pgp120Δ32.

25

Eksempel 3. Monoklonalt antistoff 178.1

En affinitetsrenningskolonne hvor man anvender et nytt monoklonalt antistoff, ble anvendt i renningsskjema anvendt til de ovenfor beskrevne mutante gp160/gp120-proteiner. Dette monoklonale antistoff kan karakteriseres som å være i stand til å reagere med ikke-denaturerte HIV-glykoproteinprodukter tilstede i cellelysat og med moden gp120 som sekretert i supernatanten i en gjærcellekultur. Ett slikt monoklonalt antistoff spesifikt for epitopen som er

30

inneholdt både i det ubehandlede gp160-rekombinante molekyl og i det fullstørrelse fremstilte gp120-protein er et mus monoklonalt antistoff 178.1.

Et ekspresjonssystem hvor man anvender *C. albicans* glukosylase-promotoren og signalpeptidet, ble anvendt for å produsere delvis rensede gjærce-
5 rekombinant-gp160 for produksjon av 178.1. Produksjonen av dette gjærce-
avledete gp160 er beskrevet i US patentsøknad SN 07/236.699, inngitt 25. august 1988. Denne søknad er inkorporert her ved referanse.

Åtte-uker gamle Balb/c-mus ble injisert tre ganger subkutant og intraperitonealt med den delvis rensede (1,5 - 3 % renhet) gjærce-
10 rekombinant gp160 i Freund's adjuvans i 4-ukers intervaller. Etter en hvileperiode på 3 måneder ble en mus avlivet, og dens miltceller ble føyd sammen med myelomceller (se f.eks. R.P. Siagian et al., Meth. Enz., 92: 17 (1983); EMBO Cours on Hybridoma Production, Basel Inst. for Immunol. (1980)) De
15 anvendte myelomceller er en subklon av Sp₂/O-Ag14 linjen tidligere selektert for optimal vekst i agarmedium og høyfusjonseffektivitet [J.D. Franssen et al., Proc. XXIX Colloq. Protids Biol. Fluids, 29: 645-649 (1981)]. Etter omtrent 10 dager ble supernatanter trukket tilbake for kartlegging i en oppfangings ELISA, ved å
anvende et kommersielt monospesifikt anti-gp120-reagens [Biochorm, Seromed Ref. D7324] som oppfangende antistoff.

20 I korte trekk ble Nunc Immunoplate I (nr. 4-39454) belagt over natten ved 4°C med 50 µl av en løsning av 5 µg/ml sau anti-gp120 IgG i PBS. Platene ble vasket med vaskebuffer (PBS, Tween 20 0,1 %) og mettet med 100 µl metnings-
buffer [PBS, nyfødt kalveserum 4 %, okseserum albumin (BSA) 1 %, Tween 20
0,1 %] i 1 time ved 37°C. 50 µl/brønn av rådt Molt₃/HTLV-III_B eller Molt₃ cellelysat
25 (10⁷ celler/ml i PBS, Triton X-100 1 %) eller av supernatantfraksjon (S2-30) av den rekombinante gjærce-
gp160 (eller likt behandlede negative kontroll) ble anvendt som antigen og inkubert i platene i 3 til 5 timer ved romtemperatur. Platene ble
vasket grundig, og 50 µl hybridom supernatant ble tilsatt til hver brønn og inkubert
over natten ved 4°C. Etter et vaskingstrinn ble 50 µl/brønn av en 1:500 fortynning
30 av biotinylerede anti-muse immunoglobuliner (Igs) (Amersham Ref. RPN 1021) i metningsbuffer inkubert i platene i 1 time ved 37°C. Platene ble vasket igjen, og
50 µl/brønn av en 1:1.000 fortynning av streptavidin biotinyleret pepperrot-

peroksidasekompleks (Amersham Ref. RPN 1051) i metningsbuffer ble tilsatt til hver brønn.

Etter et tilleggsvasketrinn, ble 50 μ l av en løsning av 0,4 mg/ml ortofenylen-
diamindihydroklorid (OPD, Sigma P1526) og 1 μ l/ml H₂O₂ (30 % i sitronsyre/-
5 natriumcitrat 0,1 M pH 5) tilsatt 0,1 % Tween 20 tilsatt til hver brønn. Platene ble
så inkubert i 20 minutter ved romtemperatur i mørke, og reaksjonen ble stoppet
ved tilsetning av 50 μ l/brønn av 2M H₂SO₄. Den optiske tetthet ved lambda = 492
nm ble målt, og 50 positive kloner ble selektert for videre subkloning i bløt
agarose, i henhold til P. Herion et al., Proc. XXIX Colloq. Protids Biol. Fluids, 29:
10 627 (1981). De klonede hybridomer ble så dyrket *in vivo* ved å injisere 2 til 5 x 10⁶
hybridomceller i peritonealhulen i Balb/c-mus forbehandlet ved intraperitoneal
injeksjon av pristan (2, 6, 10, 14-tetrametylpentadekan).

De monoklonale antistoffer valgt fra fremgangsmåten ovenfor, ble
karakterisert ved Western blot analyse (WB), radioimmuno-presipiteringsmåling
15 (RIPA), rensing, biotin-merking og konkurransemålinger. Resulterende
monoklonale antistoffer ble videre karakterisert ved analyse av deres reaktivitet
mot forskjellige rekombinante og naturlige antigener.

Et høyt utbytte av hybridomer ble oppnådd ved denne fremgangsmåte. Mer
enn 200 brønner var positive i kartleggingsmålingene. Imidlertid, blant dem, ble
20 bare 50 brønner selektert, og etter kloning ble cellene ekspandert i syre fra
bukhulen. Alle bukhulefluidene ble testet i WB og RIPA. Blant de 39 testede
monoklonale antistoffer, viste 37 et gp160 bånd i RIPA. Ingen reagerte med gp120
formen i den samme måling. De monoklonale antistoffer som viste bare gp160
gjenkjennelse i RIPA, mens de var klart reaktive mot gp120 i WB, ble analysert
25 ved underklasse. Tre monoklonale antistoffer som var IgG2A, ble rensert på en
protein A-Sepharosekolonne og biotinmerket. Konkurransemålinger ved å
anvende vaccinia gp160 som antigen ble utført, og det oppnådde resultat definerte
minst fem forskjellige grupper av epitopgjenkjennelse med gp160-proteiner.
Monoklonalt 178.1 ble selektert for en epitop tilstede på moden gp120 og ikke-
30 behandlet intracellulær gp160.

En Western blot (WB) analyse ble utført i henhold til konvensjonelle
teknikker for å vise at 178.1 er i stand til å binde HIV-virus isolert fra humane celler
infektert med HTLV-III_B [Molt₃/HTLV-III_B].

Radioimmuno-presipiteringsmålinger (RIPA) ble utført som beskrevet i P.J. Kanki et al., Science, 228: 1199 (1985) for å vise at 178.1 kunne immuno-presipitere de humane celler infektet med HTLV-III virusstammer.

Reaktiviteten av de monoklonale antistoffer som gjenkjenner ikke-overlappende epitoper mot et stort panel av antigener, ble målt ved å anvende en sandwich ELISA som involverer saue anti-gp120 som oppfangende reagens. Monoklonalt antistoff 178.1 var negativt i ELISA på divergerende HIV isolater Molt₃/HTLV-III_B, H9/HTLV^{RF1} og Hut78/ARV₂, mens klart positivt når det ble testet på HTLV-III_B i RIPA, WB eller ELISA ved å anvende rekombinante antigener. Dette monoklonale antistoff gjenkjenner en epitop som tilsynelatende blir bevart mellom gp160 og gp120, og således når det anvendes i rensingsteknikken beskrevet i eksempel 4, nedenfor, gir en tilleggsfordel for produksjon av gp160/gp120-glykoproteiner i forskjellige konstruksjoner.

Eksempel 4. Rensing av gp120 Δ 32 fra *Drosophila*-kondisjonert cellekultur-medium

Det rekombinante gp120-protein fra eksempel 2 ble rensset som følger: 30 liter *Drosophila*-kondisjonert medium (CM) som inneholdt gp120 Δ 32, ble laget med 1 mM fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF), 10 mM etylendiamintetraeddiksyre (EDTA) og 70 Kallikrein inhibitorenheter. CM ble filtrert gjennom en 0,45 μ m Durapore membran ved å anvende en pellikon (Millipore) innretning. Filtrert CM ble påført på S-Sepharose fast flow (Pharmacia) (5 liter; 25,2 cm x 11 cm) ved en lineær strømhastighet (LFR) på 37 ml/cm²time ekvilibrent i buffer A, som inneholdt 20 mM 2-[N-morfolino]etansulfonsyre (MES) pH 6.0. Etter påføring av alle CM, ble kolonnen eluert i ett trinn med buffer B, som inneholdt 20 mM MES, pH 6.0, 0,4 M NaCl.

Den S-Sepharose-eluerte gp120 Δ 32 ble påført på en anti-gp120 mus monoklonal-Sepharose 4B kolonne (60 ml; 3,2 cm x 6,5 cm) ved en LFR på 10ml/cm²time. Denne kolonne ble ekvilibrent i buffer B. Etter påføring av en halv S-Sepharoseoppsamling, ble kolonnen vasket med 1 kolonnevolum av buffer B, 2 kolonnevolumer av 20 mM MES, pH 6,0, 1,0M NaCl (buffer C), og 2 kolonnevolumer av buffer A. gp120 Δ 32 ble eluert med 0,1M eddiksyre, pH 2,8,

og fraksjoner ble umiddelbart nøytralisert ved tilsetning av 0,1 volumer av 1M Tris (hydroksymetyl)aminometan (Tris), pH 10,4.

Mus anti-gp120-monoklonalt antistoff hybridom 178.1 ble produsert i henhold til eksempel 3 ovenfor. Dette hybridom ble sådd ut ved 2×10^5 celler/ml og dyrket i fire dager i Dulbecco's Modified Eagle Medium [Hazelton Research Products] tilsatt 4,5 g/l glukose, 2 μ M glutamin og 10 % serum. CM som inneholdt 178.1 antistoff ble filtrert (0,2 μ m membran) og påført på en protein A-Sepharose (Pharmacia) (17 ml; 1,5 cm x 10 cm) ekvibrert i 0,1M Tris, pH 8,2. Antistoff ble eluert med 0,1M natriumcitrat, pH 3,5 og umiddelbart nøytralisert med Tris.

Renset anti-gp120-monoklonalt antistoff ble bundet til CNBr-aktivert Sepharose 4B (Pharmacia), i henhold til produsentens instruksjoner ved en tetthet på 2 mg antistoff/ml harpiks og med en bindingseffektivitet på 98 %, hvilket resulterte i en anti-gp120-Sepharose-affinitetsharpiks. Denne affinitetsharpiks vil spesifikt binde gp120-protein gjennom vekselvirkning mellom antistoffet og en unik strukturell epitop på gp120.

Renheten av det endelige gp120 proteinprodukt i henhold til denne rensingsteknikk er 80-90 % med et estimert utbytte på 8,5 mg/30 liter kondisjonert medium. Utvinning er estimert ved mellom 25-50 %.

Denne rensingsteknikk og affinitetsharpiks er også trodd å være effektiv med andre HIV-proteiner eller fragmenter av disse som har denne epitop.

Eksempel 5. Måling

Målingen beskrevet nedenfor er en ikke-isotop måling hvor man anvender et enzym og et substrat for påvisning av gp120 eller fragmenter av dette, som var anvendt ved påvisning av gp120-proteinene fremstilt ved fremgangsmåtene og blandingene i den foreliggende oppfinnelse.

I målingen er kriteriene for påvisning av gp120 avhengig av antistoffspesifisitet. Et anti-gp120-monoklonalt antistoff [DuPont, Cat. No. 9284], fortynnet i 0,1M natriumkarbonatbuffer (pH 9,5) til 2 μ g/ml anvendes til å oppfange gp120-proteinet. 100 μ l av denne antistoff-fortynningen tilsettes til hver brønn *in duplo* i en måleplate, unntatt for slike brønner som er utformet som kontroller. Platene ble inkubert ved 4°C natten over. Antistoffet ble vasket ut den følgende dag og platen

blokket ved tilsetning av 300 µl blokkingsbuffer bestående av 1% BSA i PBS til hver brønn i 1 time ved romtemperatur.

De virale gp120-standarder ble fortynnet til 1 µg/ml, 0,5 µg, 0,25 µg/ml, 0,1 µg/ml og 0,2 µg/ml i en vaskebuffer bestående av PBS og 0,05% Tween 20.

5 100 µl av de fortynnede standarder settes til hver brønn *in duplo*. Platene ble inkubert på en plateryster i 2 timer ved romtemperatur, og deretter ble hver plate vasket fire ganger med vaskebuffer.

Til hver brønn ble 100 µl kanin anti-gp120-antistoff (beskrevet av DeBouck et al, US patentsøknad nr. 07/056,553, innlevert 29. mai 1987) fortynnet 1/1000 i 10 vaskebuffer tilsatt, og hver plate inkubert på en ryster i 1 time. Dette andre antistoffet "sandwicher" th gp120 mellom de to antistoffene. Platene ble deretter vasket fire ganger med vaskebuffer. For å påvise dette kompleks tilsettes et tredje antistoff, 100 µl peroksidase (POD) merket geit-anti-kanin-antistoff (hovedsakelig IgG og IgM-antistoff) fortynnet i vaskebuffer uten noe azid til hver brønn. Platen 15 ble så inkubert i 2 timer på en ryster ved romtemperatur.

Etter at platene var vasket fire ganger, ble 100 l av et fargeløst citrat (1 mg/ml OPD i citratbuffer med 4 µl 35 % hydrogenperoksyd pr. 10 ml buffer) tilsatt. Hydrogenperoksydet ble tilsatt rett før tilsetning av substratet til brønnene. Disse platene ble inkubert i 8 minutter på et rysteapparat, og reaksjonen stoppet 20 ved tilsetning av 100 µl 0,1 M natriumfluorid til hver brønn. I nærvær av peroksidasekonjugerte antistoffer blir substratet dypgult. Optisk tetthet, eller styrke av fargen, som er proporsjonal med mengden av det oppfangede gp120, ble avlest på en plateavleser ved 450 nm, og det ble konstruert en standardkurve med konsentrasjoner av ukjente beregnet. Mengden av gp120 i supernatant- 25 kulturen ble bestemt ved sammenligning med denne standardkurven.

Beskrivelsen ovenfor og eksempler beskriver fullt ut oppfinnelsen, inkludert foretrukne utførelsesformer av denne. Modifikasjoner av fremgangsmåtene beskrevet, f.eks. hvor man anvender andre avkuttete gp160/gp120-sekvenser som er åpenbare for en med vanlig fagkunnskap på området, molekylgenetikk og 30 relaterte vitenskaper, er tilsiktet å falle innen rekkevidden av de følgende krav.

PATENTKRAV

1. HIV-proteingenespresjonsenhet for anvendelse i produksjon av aktive HIV-proteiner i et høyt nivå,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en DNA valgt fra gruppen som koder for gp120 eller gp160, og et regulatorisk element nødvendig for transkripsjon av den kodende DNA-sekvens og translasjon i en *Drosophila*-celle.
2. Genespresjonsenhet i henhold til krav 1,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte regulatoriske element omfatter en aktin 5C-promotor eller en *Drosophila*-metallthionein-promotor.
3. Genespresjonsenhet i henhold til krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter den HIV DNA-kodende sekvens som
15 er til stede i pgp160 Δ 32, pgp120F Δ 32, pgp120 Δ 32 eller pgp120 Δ 274.
4. DNA-vektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter genespresjonsenheten i henhold til krav 1.
- 20 5. *Drosophila*-celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transfektert med vektoren i henhold til krav 4.
6. HIV gp120 eller gp160-protein som er, eller gir opphav til aktive proteiner, produsert i en kultur av insektceller i henhold til foregående krav.
- 25 7. Vaksine for å stimulere beskyttelse mot HIV-infeksjon, k a r a k t e r i s e r t v e d at en slik vaksine omfatter en immunbeskyttende og ikke-toksisk mengde av proteinet i henhold til krav 6.
- 30 8. Diagnostisk agens for påvisning av HIV-infeksjon i et humant individ *in vitro*, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter proteinet i henhold til krav 6.

9. Fremgangsmåte for produksjon av et HIV-protein i *Drosophila*-celler, karakterisert ved at den omfatter dyrking i et egnet medium av *Drosophila*-celler transfektert med en HIV-proteingenekspresjonsenhet ifølge krav 1.
- 5
10. Fremgangsmåten i henhold til krav 9, karakterisert ved at nevnte celler blir transfektert med en første vektor som inneholder den kodende sekvens for hygromycin B-fosfotransferase og en annen vektor som inneholder den kodende sekvens for en HIV-proteingenekspresjonsenhet.
- 10
11. Fremgangsmåten i henhold til krav 10, karakterisert ved at nevnte første vektor er pCOHYGRO.
- 15
12. Fremgangsmåten i henhold til krav 10, karakterisert ved at nevnte andre vektor omfatter en HIV-genekspresjonsenhet som er til stede i pgp160 Δ 32, pgp120F Δ 32, pgp120 Δ 32 eller pgp120 Δ 274.
- 20
13. Fremgangsmåten i henhold til krav 9, karakterisert ved at *Drosophila*-cellene er *D. melanogaster* S₂-celler.
14. Fremgangsmåten i henhold til krav 13, karakterisert ved at nevnte S₂-celler blir ko-transfektet med vektor pCOHYGRO og en vektor som omfatter en genekspresjonsenhet som er til stede i pgp160 Δ 32, pgp120F Δ 32, pgp120 Δ 32 eller pgp120 Δ 274.
- 25
15. Fremgangsmåte for å identifisere et HIV-bindende materiale, karakterisert ved at nevnte materiale bringes i kontakt med proteinet i henhold til krav 6, og måler forekomst av binding mellom nevnte stoff og nevnte protein, idet slik binding er indikativ på HIV-binding.
- 30

16. Fremgangsmåte for rensing av HIV-proteinet i henhold til krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes en affinitetsharpiks som inneholder et monoklonalt antistoff i stand til å reagere med en epitop til stede i ikke-denatureert gp160-proteinprodukter og i modent gp120-protein.

5

17. Fremgangsmåte for rensing av HIV-proteinet produsert ved fremgangs- måten i henhold til krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at anvendelse av en affinitetsharpiks som inneholder et monoklonalt antistoff i stand til å reagere med en epitop til stede i ikke-denatureerte gp160-proteinprodukter og i modent gp120-
10 protein.