



(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1178/90

(51) Int.Cl.⁵ : C12N 15/13
G01N 33/577

(22) Anmeldetag: 29. 5.1990

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 5.1993

(45) Ausgabetag: 27.12.1993

(56) Entgegenhaltungen:

WO-A1-89/04370
US-PS 4851341 EP-A1 0312164

(73) Patentinhaber:

JUNGBAUER ALOIS DIPL.ING. DR.
A-1210 WIEN (AT).
KATINGER HERMANN DIPL.ING. DR.
A-1190 WIEN (AT).
RÜKER FLORIAN DIPL.ING. DR.
A-1170 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

FELGENHAUER MARTIN
WIEN (AT).
HIMMLER GOTTFRIED DIPL.ING. DR.
WIEN (AT).
JUNGBAUER ALOIS DIPL.ING. DR.
WIEN (AT).
KATINGER HERMANN DIPL.ING. DR.
WIEN (AT).
KOHL JOHANN DIPL.ING.
WIEN (AT).
STEINDL FRANZ DIPL.ING.
WIEN (AT).
RÜKER FLORIAN DIPL.ING. DR.
WIEN (AT).

(54) KOMPLEXES VIRALES ANTIGEN VON HIV-1 BINDENDES REKOMBINANTES PROTEIN

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein an ein komplexes virales Antigen von HIV-1 bindendes rekombinantes Protein. Es wird die Herstellung, Produktion, Reinigung und Anwendung dieses Proteins beschrieben. Das Protein enthält die variablen Regionen eines humanen anti-HIV-1 Antikörpers, verbunden über einen Linker. Die Produktion erfolgt in verschiedenen prokaryontischen bzw. eukaryontischen Systemen. Zur Reinigung werden biochemische chromatographische Methoden eingesetzt. Das beschriebene rekombinante Protein kann zur Detektion, zur Quantifizierung und zur Reinigung von HIV-1 Antigen eingesetzt werden.

AT 396 939 B

Humane monoklonale Antikörper (mAk) lassen sich herstellen, indem man B-Lymphozyten von Menschen, welche gegen ein Antigen beispielsweise durch Krankheit eine Immunreaktion zeigen, gewinnt, und diese B-Lymphozyten durch Fusion mit geeigneten Zelllinien, im besonderen mit Myelomzelllinien, immortalisiert. Solcherart gewonnene Hybrid-Zelllinien, Hybridomas, dienen als Produktionsvehikel für mAk's. Sie können in vitro in Form von Zellkulturen eingesetzt werden und in dem erforderlichen Maßstab kultiviert werden (1).

Die dabei produzierte Substanz stellt im Regelfall einen kompletten mAk dar, charakterisiert durch 2 schwere Ketten und 2 leichte Ketten, welche untereinander durch Disulfidbrücken und durch nicht-kovalente Bindungen verbunden sind, und in ihrer Gemeinschaft den spezifisch bindenden Antikörper bilden (2).

Die Struktur eines solchen Antikörpers lässt sich unterteilen in eine konstante Region, welche für die sogenannten Effektorfunktionen, wie z. B. Komplementaktivierung, verantwortlich ist, und in eine variable Region, welche die spezifische Bindung des jeweiligen Antigens hervorruft.

Antikörper können durch biochemische Methoden enzymatisch gespalten werden. Beispielsweise kann durch Papain bzw. durch Pepsin ein Teil der konstanten Region abgespalten werden. Die auf diese Weise hergestellten Fab' bzw. (Fab')₂ Fragmente sind in einer dem ursprünglichen Antikörper analogen Weise in der Lage, das betreffende Antigen zu binden (2). Auch die proteolytische Abspaltung der kompletten konstanten Regionen, welche zu einem sogenannten Fv Fragment führt, wurde beschrieben. Sie ist jedoch bei weitem nicht so reproduzierbar durchführbar wie die weiter oben erwähnte Papain- bzw. Pepsin-Spaltung von Antikörpern (3, 4). Mit Methoden der Gentechnik gelingt es jedoch, Fv Fragmente auf reproduzierbare Weise herzustellen. Die dazu notwendigen Voraussetzungen sowie die angewandten Methoden werden in der Folge beschrieben.

Mit Hilfe von Routinemethoden wird eine cDNA Bank von einer mAk-produzierenden Hybridomzelllinie hergestellt. Aus mAk-produzierenden Hybridomas wird gesamt-RNA isoliert. Diese RNA enthält neben ribosomaler RNA die Gesamtheit der Transkripte der Zelle. Es liegen sowohl unvollständig prozessierte, nukleäre Transkripte, als auch die reifen, cytoplasmatischen Transkripte, die sogenannten messenger RNA's, vor. Diese zeichnen sich durch einen poly-Adenosin-Schwanz am 3'-Ende aus. Diese poly-A Region kann verwendet werden, um durch Affinitätschromatographie mit oligo-dT Zellulose die reifen mRNAs zu isolieren. Mit Hilfe des Enzyms "reverse Transkriptase" kann die mRNA zu einer sogenannten cDNA umgeschrieben werden. Durch Verwendung geeigneter Vektoren kann das erhaltene Gemisch von cDNAs kloniert werden, was zu einer sogenannten cDNA Bank führt (5). Immunglobulin-spezifische Hybridisierungssonden erlauben die Identifikation und Isolierung von Klonen, welche die gewünschten Sequenzen enthalten. Durch Sequenzieren der DNA dieser Klone und Sequenzvergleich mit bekannten Immunglobulinen (EMBL Nucleotide Sequence Data Library, Heidelberg, BRD) kann Sicherheit über die Identität der Klone gewonnen werden (5). Auf diese Weise können beispielsweise Klone isoliert werden, die die Sequenzen der leichten bzw. der schweren Kette eines mAK tragen.

Durch Sequenzanalyse der solcherart erhaltenen Immunglobulin-cDNAs lassen sich durch Vergleich mit bekannten Immunglobulinsequenzen die einzelnen Domänen der schweren bzw. der leichten Kette identifizieren: es ist möglich, die variable und die konstante Region zu identifizieren und z. B. innerhalb der variablen Region die sogenannten "hypervariablen" oder "complementarity determining regions", welche eigentlich für die spezifische Antigenbindung verantwortlich sind (6).

Solcherart klonierte Antikörpervene lassen sich in verschiedenen Systemen zur Expression bringen. Einerseits können tierische Zellkulturen verwendet werden, wie z. B. Myelomzellen, wenn man geeignete Expressionsvektoren verwendet (7). Die Verwendung von Hefe (8) bzw. von Bakterienzellen (9) als Expressionsvehikel für komplettete Antikörper ist problematisch, da solche Zellen offenbar nicht in der Lage sind, die für sie sehr großen Moleküle, wie Antikörper sie darstellen, korrekt zu synthetisieren. Erfolg in dieser Richtung zeichnete sich erst ab, als versucht wurde, Subfragmente von Antikörpern in niederen Eukaryonten bzw. in Prokaryonten zur Expression zu bringen. Im Folgenden werden vier verschiedene Methoden beschrieben, welche die Expression von Fv bzw. Fab Fragmenten in *Escherichia coli* erlauben:

Skerra und Plückthun (1988, (10)) insertierten die Gene für die variablen Regionen eines murinen anti-Phosphorylcholin-Antikörpers (McPC603) im Anschluß an die LacPromoter/Operator Region, gefolgt von je einer bakteriellen Leader-Sequenz, welche zur Ausschleusung der Produkte in den periplasmatischen Raum der Bakterien dient. Es handelt sich dabei um den Leader des outer membrane protein A (ompA) sowie der Alkalischen Phosphatase (phoA). Nach Transfektion dieses Plasmids in *Escherichia coli* wurde die Expression von funktionellem, d. h. Antigen-bindendem Protein im periplasmatischen Raum der Bakterien nachgewiesen.

Better et al. (1988, (11)) produzierten das Fab-Fragment eines chimären murin/humanen Antikörpers, welcher ein Gangliosid-Antigen, wie es häufig an der Oberfläche humarer Karzinomzellen gefunden wird, erkennt. Die hiebei angewandte Plasmidkonstruktion besteht aus dem *Salmonella typhimurium* araB Promoter, sowie der pelB leader Sequenz jeweils vor der für die jeweilige Kette kodierenden Sequenz. Es wurden Antigen-bindende Fab Fragmente aus dem Kulturüberstand der transformierten Bakterien gewonnen.

Interessanterweise benützten sowohl Skerra und Plückthun (1988, (10)) und Better et al. (1988, (11)) sogenannte dicistronische Konstruktionen, d. h. solche, bei denen auf einem einzigen messenger-RNA Molekül die Information

für die beiden getrennt zu exprimierenden Ketten vorliegt. Die Autoren geben an, daß dadurch die räumliche Nähe der entstehenden Polypeptidketten gewährleistet ist, welche eine Voraussetzung für die korrekte Zusammenlagerung der variablen Region der schweren (V_H) mit der der leichten Kette (V_L) Kette bildet.

Genau dieses Problem, nämlich die Ausbildung des Fv-Peptid-Heterodimers (in der Natur nicht kovalent verbunden) wurde von Huston et al. (1988, (12)) und von Bird et al. (1988, (13)) auf andere Weise zu lösen versucht, nämlich durch kovalente Verknüpfung der Ketten über eine Aminosäure-Linkersequenz, wie sie in der Natur nicht vorkommt. Diese Linkersequenz zeichnet sich dadurch aus, daß sie aus einer bestimmten Zahl und Sequenz von Aminosäuren besteht, sodaß sie die Distanz, welche in der natürlichen Konformation eines Antikörpers zwischen den zu verbindenden Regionen besteht, überbrücken kann, ohne unnötigen Streß in die Konformation einzuführen:

Huston et al. (1988, (12)) verknüpften die variablen Regionen eines murinen anti-Digoxin Antikörpers über einen Linker von 15 Aminosäuren der Sequenz GGGGSGGGGGGGGG. Die gewählte Anordnung war: V_H - Linker - V_L. Dieses sogenannte single-chain Fv Fragment wurde in Verbindung mit der MLE Leader Sequenz unter der Kontrolle des synthetischen trp-Promoter/Operators in Form unlöslicher Inclusion bodies exprimiert. Nach deren Auflösung in 6M Guanidin-HCl und Entfernung des Leaders durch saure Hydrolyse zwischen den Aminosäuren Asp und Pro, sowie nach einigen Chromatographieschritten wurde aktives, Antigen-bindendes single-chain Fv Fragment gewonnen.

Eine im Prinzip analoge Vorgangsweise wurde von Bird et al. (1988, (13)) für die Konstruktion eines murinen Antigen-bindenden Proteins, welches spezifisch Fluoreszein bindet, gewählt. Diese Gruppe verwendete jedoch einen Linker von 18 Aminosäuren mit der Sequenz KESGSVSSSEQLAQFRSLD. Dieser Linker ist ein Teil der Sequenz der humanen "carbonic Anhydrase", und wurde aus der Brookhaven Proteinstruktur-Datenbank als Loopstruktur ausgewählt, welche räumlich genau auf die Position der miteinander zu verbindenden Aminosäuren des Fv Fragments paßt. Die Anordnung der einzelnen Regionen war hier anders als bei Huston et al. (1988, (12)), nämlich V_L - Linker - V_H.

Die oben beschriebenen Genkonstruktionen zur Produktion von Antikörperfragmenten in *Escherichia coli* beziehen sich auf murine Sequenzen bzw. in einem Fall auf ein murin/human Chimäres. Es wurden noch keine entsprechenden Versuche mit humanen Sequenzen publiziert.

Fab', (Fab')₂ und Fv Fragmente bieten verschiedene Vorteile gegenüber kompletten Antikörpern. Auf Grund ihrer Kleinheit im Vergleich zu kompletten Antikörpern können sie leichter und schneller diffundieren, sowohl *in vitro* als auch bei eventuellen *in vivo* Applikationen. Aus demselben Grund sind sie generell leichter handhabbar und sind in den meisten Fällen, bei denen die Funktionen der konstanten Regionen (z. B. Effektorfunktionen, Bindung an Zellrezeptoren, Bindung an andere Moleküle) nicht benötigt werden bzw. sogar Nachteile bringen, kompletten Antikörpern gleichwertig bzw. gegebenenfalls sogar vorzuziehen. Beispielsweise entstehen beim Tumor-Imaging bei der Verwendung kompletter Antikörper häufig Probleme durch unspezifische Hintergrundsignale, welche durch unspezifische Bindung der Antikörper an Zellrezeptoren, vermittelt durch die konstanten Regionen der Antikörper, bedingt sind. Es ist bekannt, daß bei Verwendung von Fab-Fragmenten solche Probleme reduziert werden können. Es ist demnach zu erwarten, daß der Einsatz von Fv-Fragmenten bzw. von single-chain Fv-Fragmenten weitere Verbesserungen in dieser Beziehung bringen wird (13, 12).

Bis jetzt wurde mit Antikörpern murinen Ursprungs gearbeitet, welche an kleine, gut beschriebene Antigene, wie Fluoreszein bzw. Digoxin binden. Die gesamte Genkonstruktion ist darauf aufgebaut, daß als Antigen eine niedermolekulare Substanz (MG kleiner 1000) gebunden wird. Die in der Natur bei weitem am häufigsten vorkommenden antigenen Substanzen sind Peptide, Peptidoglycane, Proteine und Polysaccharide, und als solche hochmolekular.

Erfundungsgemäß enthält das Protein der eingangs genannten Art nur die variablen Regionen eines von der Zelllinie 3D6 (Accession Nr. 87110301, PHLS, Porton Down, UK (1, 14, 15, 16)) stammenden Antikörpers. Damit wird erstmals ein Protein humanen Ursprungs erhalten, welches die gewünschten Bindungseigenschaften aufweist und welches auch in einzelligen Mikroorganismen, wie Hefe oder Bakterien, exprimiert werden kann.

Weiters wird gemäß der vorliegenden Erfundung die Herstellung einer single-chain Konstruktion, die von einem humanen Antikörper abgeleitet ist, beschrieben. Diese single-chain Konstruktion bindet an ein hochmolekulares, komplexes, virales Antigen, im Gegensatz zu kleinen, gut definierten Antigenen.

Es war nicht vorauszusehen, daß die entsprechenden Methoden zur Konstruktion der single-chain Fragmente auch bei anderen als den publizierten Antikörpern, im besonderen bei humanen Antikörpern, zu funktionellen, d. h. Antigenbindenden Molekülen führen würden.

Desgleichen liegt es nicht auf der Hand, daß komplexe Antigene wie z. B. Antigene an der Oberfläche von Viren, bei denen erfahrungsgemäß eine größere Zahl von Aminosäuren an der Antigen-Antikörperbindung beteiligt sind als bei kleinen Antigenen, in der gleichen Weise Manipulationen im Bereich der variablen Regionen der entsprechenden bindenden Antikörper tolerieren.

Ausgehend von der Zelllinie 3D6, welchen einen humanen monoklonalen Antikörper des Typs IgG1/kappa

produziert, welcher spezifisch mit HIV-1-gp41 reagiert, und eine schwache Kreuzreaktion mit HIV-1 gp120 zeigt (3D6; (1, 14, 15, 16)), wurde gesamt-RNA isoliert. Dabei wurde die Methode der Guanidin-Isothiocyanat-Extraktion und Ultrazentrifugation über einen Polster von 5,7M CsCl angewandt (5).

5 Aus der gesamt-RNA wurde durch Adsorption an oligo-dT-Cellulose die poly A+ - Fraktion, also die mRNA isoliert. (mRNA purification Kit, Fa. Pharmacia, Schweden).

Die mRNA diente als Substrat für die Synthese von cDNA (cDNA synthesis Kit, Fa. Pharmacia, Schweden).

Die Klonierung der cDNA Bank erfolgte im Plasmidvektor pUC19. Die rekombinanten Plasmide wurde in Escherichia coli, Stamm HB101, transformiert und auf LB Medium (5) kultiviert.

10 Positive Klone wurden durch Hybridisierung mit spezifischen Oligonucleotid-Sonden identifiziert. Die Sequenzen für die Sonden wurden der EMBL DNA-Sequenz Datenbank aus konstanten Regionen von humanen IgG1-schweren bzw. Kappa-leichten Ketten entnommen. Die durch positive Hybridisierungssignale identifizierten Klone wurden durch Restriktionsanalyse weiter charakterisiert, und diejenigen Klone, welche die Plasmide mit den längsten Inserts tragen, identifiziert. Durch Sequenzanalyse dieser Klone wurde je ein Klon mit der kompletten kodierenden Region für die schwere bzw. für die leichte Kette des Antikörpers identifiziert. Diese Klone tragen die Bezeichnung 15 pUC3D6HC (SEQ ID NO: 1) bzw. PUC3D6LC (SEQ ID NO: 2).

Beispiel 1

20 In der Sequenz der Inserts der Klone pUC3D6HC (SEQ ID NO: 1) bzw. pUC3D6LC (SEQ ID NO: 2) wurden die Übergangsstellen zwischen der Region des Leaderpeptids und der variablen Region sowie zwischen der variablen Region und der konstanten Region identifiziert. Durch Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese (in vitro mutagenesis system, Amersham, UK) wurden an diesen Übergangsstellen die folgenden Mutationen durchgeführt (siehe auch Fig. 1 - 4):

- 25 1) Erkennungssequenzen für bestimmte Restriktionsenzyme wurden hineinmutiert. Mit Hilfe dieser Restriktionsstellen wurden die variablen Regionen der schweren bzw. der leichten Kette des Antikörpers 3D6 aus den jeweiligen Plasmiden herausgeschnitten.
- 2) Die für die spätere Expression benötigten Start- und Stopcodons wurden einmutiert.

30 Um die variablen Regionen des Antikörpers 3D6 mit einem Linker verknüpfen zu können, wurden zwei synthetische Oligonucleotide hergestellt, welche die beiden DNA-Stränge des Linkers bilden. Die beiden Oligonucleotide wurden so gewählt, daß, wenn sie miteinander hybridisieren, eine Doppelstrang-DNA entsteht, an deren Enden überhängende einzelsträngige DNA Regionen vorliegen, welche genau denjenigen überhängenden Enden entsprechen, die beim Schneiden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen an den oben erwähnten einmutierten Restriktionsstellen entstehen. Dies erlaubt die Ligation der mit Hilfe dieser Restriktionsenzyme 35 isolierten variablen Regionen mit den synthetischen Oligonucleotiden des Linkers.

35 Durch Ligation der 3 entsprechend vorbehandelten Fragmente (VH, Linker, VL) miteinander wurde ein Gen erhalten, welches an den Übergangsstellen zwischen den variablen Regionen und dem Linker noch die hineinmutierten Restriktionsstellen trug, welche Nucleotide beinhalten, die nicht den an diesen Stellen natürlich vorkommenden Nucleotiden entsprechen. Dadurch ergab sich auch eine veränderte Aminosäuresequenz (Fig. 5 und 6).

40 Um die ursprüngliche Aminosäuresequenz wiederherzustellen, wurde an den erwähnten Übergangsstellen durch einen neuerlichen Mutationsvorgang die erwünschte DNA Sequenz hergestellt (Fig. 5 und 6).

Mit Hilfe dieser Methoden wurde also ein Gen konstruiert, daß die Struktur V_H - Linker - V_L besitzt. Dieses Konstrukt wird als sc3D6 (single-chain 3D6) bezeichnet, und wurde in den Klonierungsvektor pUC19 insertiert (SEQ ID NO: 3). Der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pUCsc3D6.

45 Das sc3D6-Gen wurde aus dem Plasmid pUCsc3D6 durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten, und in den bakteriellen Expressionsvektor pKK223-3 (Pharmacia) insertiert, welcher den mit Isopropyl-β-thio-galactosid (IPTG) induzierbaren tac-Promoter enthält. Der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pKKsc3D6 und wurde in den E. coli Stamm JM105 transformiert.

Kultivierung der Bakterien

50 Die transformierten Bakterien wurden in einem Laborfermenter bis zu einer OD₆₀₀ von 2,0 in LB Nährmedium (5) kultiviert. Danach erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von Isopropylthiogalaktosid (IPTG). Die Bakterien wurden 3 Stunden in Gegenwart von IPTG weiterkultiviert, sodann durch Zentrifugation geerntet und bei -80 °C gelagert. Danach wurde das Protein extrahiert und gereinigt.

Extraktion und Reinigung

55 Für jeden Versuchsansatz wurden 10 g Biomasse (Naßgewicht) eingesetzt. Die Zellen wurden mittels Lysozym

aufgeschlossen. Die gefrorene *E. coli*-Paste wird in kleine Stücke gebrochen und mit STE-Puffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) wird eine 10 %-ige Suspension bereitet. Zu dieser Suspension wird ein Aufschlußcocktail, der Nukleasen, Lysozym und Inhibitoren enthält, hinzugefügt (siehe Tabelle 1).

Diese *E. coli*-Suspension wird 15 Minuten bei 42 °C inkubiert. Durch Zugabe von Triton-X-100 (Endkonzentration 0,5 %) und einer weiteren fünfminütigen Inkubation bei 42 °C werden die Zellen lysiert.

Ernten der Inclusionbodies

Das Sediment wird in STE-Puffer resuspendiert und 8 h bei 4 °C gerührt. Die Inclusionbodies werden durch Zentrifugation angereichert. Hierzu wird ein Glycerinkissen (50 % Glycerin/in Phosphate Buffered Saline (PBS)) in Zentrifugenröhren vorgelegt, mit dem gleichen Volumen Suspension überschichtet und zentrifugiert. (30 Minuten, 6000 rpm, 4 °C, JA-20 Rotor, J2-21 Zentrifuge, Fa. Beckman).

Lösen der Inclusionbodies

Die angereicherten Inclusionbodies werden in 6M GuHCl (Guanidinhydrochlorid) in PBS, pH 8,3 unter Rühren bei 4 °C (12 h) gelöst. Anschließend wird der Proteingehalt photometrisch bestimmt.

Refolding

Das in GuHCl gelöste Protein wird in Gegenwart von Fremdproteinen umgefaltet. Zunächst erfolgte eine Proteinbestimmung. Die gelösten Inclusionbodies werden mit Refolding-Puffer (GuHCl 1M, Glutathion reduziert 30 mM, Glutathion oxidiert 3 mM, EDTA 100 µM, in PBS, pH 8,3) so verdünnt, daß die Endkonzentration 80 mg Protein/l beträgt.

Das Verdünnen der gelösten Inclusionbodies erfolgt im Labormaßstab unter Verwendung einer Burette durch langsames Zutropfen der Proteinlösung in den Refolding Buffer. Man arbeitet am besten bei 37 °C.

Die Rückfaltung wurde mittels Reversed-phase HPLC verfolgt. Dazu wurden Proben entnommen, der pH-Wert auf 5,5 gestellt, um ein weiteres Refolding zu unterbinden, die Proben zentrifugiert (Millipore Tischzentrifuge, 4700 rpm, Zimmertemperatur), sterilfiltriert (Porenweite 0,22 µm, low protein binding), falls nötig aufkonzentriert (Millipore, Tischzentrifuge, 4700 rpm, 20 °C) und jeweils 250 µl mittels Reversed Phase Chromatography HPLC analysiert (Nucleosil 300, 5 µm, 4 x 125 mm., Fa. Macherey und Vogel, BRD. Ein linearer Gradient 0,1 % TFA/Acetonitril 10 - 60 % wurde innerhalb von 40 Minuten an die Säule angelegt).

Der umgefaltete sc3D6 wird ultradialfiltriert. Es wird eine 10000 Dalton cutoff Polysulfonmembran verwendet. Die dialillierte Proteinlösung wird auf einen Anionentauscheraufgetragen und dann mit 100 mM NaCl von der Säule eluiert. Der sc3D6 wird mit Sephadex G-25 (Fa. Pharmacia, Schweden) Gelfiltration entsalzt und nach der Methode von Nakane et al. (17) mit alkalischer Phosphatase konjugiert.

Das gereinigte sc3D6 Protein wurde durch SDS-PAGE kontrolliert (Fig. 7). Zum Nachweis der Funktionalität des sc3D6 Proteins wurde ein Western Blot Test mit HIV-1-Teststreifen (Fa. BioRad, USA) durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde ein analoger Test mit dem aus tierischen Zellen isolierten, natürlichen Antikörper durchgeführt. Als negative Kontrolle diente eine Präparation von gesamt-Protein aus *E. coli*. Das Ergebnis dieses Tests war positiv und ist in Fig. 8 gezeigt.

Reinigung von sc3D6 Protein mittels Affinitäts-chromatographie

Mit dem entsprechend gereinigten sc3D6 Protein wurde ein Kaninchenserum unter Standardbedingungen mit komplettem Freundschen Adjuvans hergestellt. Mit Hilfe von CM-Sepharose Fast Flow Chromatographie (Fa. Pharmacia, Schweden) wurde die IgG Fraktion aus dem Kaninchenserum gewonnen. Die Spezifität der Antikörper wurde mittels ELISA festgestellt. Mit Hilfe eines Peptidsynthesizers wurde das 15 Aminosäuren lange Linkerpeptid (Sequenz: GGGGSGGGGSGGGGS) hergestellt und anschließend mittels Carbodiimidkondensation mit Rinderserumalbumin (BSA) im molaren Verhältnis von 6:1 konjugiert. Mit diesem Konjugat wurden Mikrotiterplatten beschichtet. Die Serumprobe wurde in den beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert, und der gebundene Antikörper wurde mit einem Peroxidase-markierten Ziege-Anti-Kaninchen IgG nachgewiesen. Das derartig hergestellte und überprüfte anti-sc3D6 IgG an eine BrCN aktivierte Sepharose 4B (Fa. Pharmacia, Schweden) gebunden. Das nicht gebundene Material wurde ausgewaschen. Ein vorgereinigter Extrakt von sc3D6 Protein, der wie oben beschrieben rückgefaltet und mit Sephadex G-25 (Fa. Pharmacia, Schweden) entsalzt wurde, wurde auf die anti-sc3D6 Säule aufgetragen. Das nicht gebundene Material wurde ausgewaschen und das spezifisch gebundene sc3D6 Protein wurde mit einem 0,1M Glycin HCl Puffer pH 2,5 eluiert. Anschließend wurde das Eluat mit 1M Tris Puffer neutralisiert und sc3D6 Protein wie beschrieben auf mittels SDS-Elektrophorese charakterisiert und mittels Western Blot auf Funktionalität überprüft.

Eine andere Methode zur immunaffinitätschromatographischen Reinigung von sc3D6 Protein ist wie folgt:

Mit dem oben beschriebenen an BSA gekoppelten Linkerpeptid wurde ein Kaninchenserum mit Hilfe von

komplettem Freundschen Adjuvans hergestellt. Die IgG Fraktion wurde durch CM-Sepharose Fast Flow Chromatographie (Fa. Pharmacia, Schweden) gewonnen und über eine BSA-Sepharose 4B Säule (Fa. Pharmacia, Schweden) weitergereinigt, um die anti-BSA Antikörper zu entfernen. Das so gewonnene anti-Linker IgG wurde an eine BrCN aktivierte Sepharose 4B (Fa. Pharmacia, Schweden) gekoppelt. Ein vorgereinigter Extrakt von sc3D6 Protein, der wie oben beschrieben rückgefaltet und mit Sephadex G-25 (Fa. Pharmacia, Schweden) entsalzt wurde, wurde auf die anti-Linker Säule aufgetragen. Das nicht gebundene Material wurde ausgewaschen und das spezifisch gebundene sc3D6 Protein wurde mit einem 0,1M Glycin HCl Puffer pH 3,0 eluiert. Anschließend wurde das Eluat mit 1M Tris Puffer neutralisiert und das sc3D6 Protein wie beschrieben mittels SDS-Elektrophorese charakterisiert und mittels Western Blot auf Funktionalität überprüft.

10

Immunaffinitätschromatographische Reinigung von HIV-1 gp160

Zur Herstellung einer sc3D6-Immunaffinitätsäule wurde das gereinigte sc3D6 Protein auf eine 1 ml NHS Säule (Fa. Pharmacia, Schweden) gebunden (lt. Protokoll der Fa. Pharmacia).

Die Vorreinigung des gp160 (des coat Proteins von HIV-1, welches vom Antikörper 3D6 sowie vom sc3D6 Protein spezifisch gebunden wird) wurde nach Barrett et al. (18) durchgeführt.

Das vorgereinigte Material, welches das rekombinante gp160 enthält, wurde über eine Ultra/Diafiltration ankonzentriert und für die sc3D6-Immunaffinitätschromatographie konditioniert. Dieses konditionierte Material wurde auf die sc3D6-Immunaffinitätsäule aufgetragen. Als Äquilibrierungspuffer wurde ein 100 mM Tris Puffer pH 7,4 mit 0,1 % Tween 20 verwendet. Das rekombinante Antigen wurde mit 3M Rhodanid eluiert. Die Ausbeuten der einzelnen Stufen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Beispiel 2

Eine andere Klonierung des sc3D6, bei der das sc3D6-Gen mit dem aus *Escherichia coli* isolierten Gen für Alkalische Phosphatase (EcphoA) fusioniert wurde, wurde wie folgt ausgeführt:

Das sc3D6-Gen wurde aus dem Plasmid pUCsc3D6 durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten, und in den Vektor pEcphoAMut3 (19) insertiert. Der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pAPsc3D6. Der Vektor pEcphoAMut3 enthält das aus *Escherichia coli* isolierte Gen für Alkalische Phosphatase (20) in welches durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese am 3'-Ende der codierenden Region eine Restriktionsstelle einmutiert wurde, welche die Fusion des EcphoA-Gens mit anderen Genen erlaubt. Auf diese Weise können durch Expression eines Fusionsgens Fusionsproteine, d. h. Proteine, bei denen die jeweiligen codierenden Regionen untereinander durch Peptidbindungen über Aminosäuren verknüpft sind, hergestellt werden.

Das EcphoA - sc3D6 Fusionsgen wurde aus pAPsc3D6 mit Restriktionsenzymen herausgeschnitten und in den bakteriellen Expressionvektor pKK223-3 (Fa. Pharmacia, Schweden) insertiert. Das resultierende Plasmid trägt die Bezeichnung pKKAPsc3D6.

Das Plasmid pKKAPsc3D6 wurde in den *Escherichia coli* Stamm JM 105 transformiert und die transformierten Bakterien in LB Nährmedium (5) kultiviert. Nach Induktion mit IPTG wurde aktives EcPhoA - sc3D6 Fusionsprotein aus dem periplasmatischen Raum der Bakterien wie folgt gereinigt:

Die Bakterien werden durch Zentrifugation geerntet und mit einem 10 mM Tris Puffer pH 7,5, der mit 30 mM NaCl versetzt ist, gewaschen. Die gewaschenen Bakterien werden in 33 mM Tris Puffer pH 7,5 resuspendiert und mit dem gleichen Volumen 40 % Saccharoselösung in (33 mM Tris Puffer) versetzt und EDTA auf eine Endkonzentration von 0,1 mM zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Bakterien abzentrifugiert und in 0,5 mM MgCl₂ Lösung aufgenommen. Nach 10minütiger Inkubation bei 0 °C wird ein Proteaseinhibitierungcocktail, der aus PMSF und EGTA besteht, zugesetzt und die Bakterien abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 1M Tris Lösung pH 7,5 auf eine Endkonzentration von 25 mM Tris gebracht. Durch diese Prozedur wird der periplasmatische Raum der *E. coli* Zellen freigelegt.

Durch Zentrifugation bei 12000 g wird die Proteinlösung geklärt und anschließend über Ultrafiltration ankonzentriert.

Das EcPhoA-sc3D6 Protein wird mit Hydrophobic Interactionchromatographie weiter gereinigt. Eine Phenylsepharose Fast Flow (Fa. Pharmacia, Schweden) wurde mit 60 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung in 25 mM Tris Puffer pH 7,5 äquilibriert. Die Proteinlösung wurde abwechselnd mit dem Äquilibrierungspuffer auf die Säule aufgetragen. Das sc3D6 wird mit einem linearen Gradienten von 60 % Ammoniumsulfat auf 0 % Ammoniumsulfat eluiert. Die Fraktionen welche das EcPhoA-sc3D6 Protein enthalten werden durch Gelfiltration entsalzt.

Zum Nachweis der Funktionalität des EcPhoA-sc3D6 Proteins wurde ein Western Blot Test mit HIV-1-Teststreifen (Fa. BioRad, USA) durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein analoger Test mit dem aus tierischen Zellen isolierten, natürlichen Antikörper durchgeführt. Als negative Kontrolle diente eine Präparation von gesamt-Protein aus *E. coli*. Das Ergebnis dieses Tests war positiv und ist in Abbildung 8 gezeigt.

Direkter Nachweis von HIV-1 Antigen mittels ELISA

Ein gp120-spezifischer monoklonaler Antikörper (Klon 25 C2, Accession Nr. 89120601, PHLS, Porton Down, UK) wurde auf Mikrotiterplatten (Grade I, Fa. Nunc, Dänemark) beschichtet. HIV-1 hältiger Kulturüberstand (16) wurde auf die beschichteten Mikrotiterplatten aufgetragen. Als Standard wurde rekombinantes gp160 (18) verwendet.

Nach Auswaschen des ungebundenen Materials wurde das EcPhoA-sc3D6 Protein aufgetragen und inkubiert. Das ungebundene Material wurde neuerlich ausgewaschen und mit p-Nitrophenylphosphat wurde das gebundene EcPhoA-sc3D6 Protein photometrisch bei 602 nm nachgewiesen. In Abbildung 9 ist die Standardkurve und verschiedene Proben von HIV-1 positiven Kulturüberständen dargestellt.

Kompetitiver Anti-HIV-1 ELISA

Mikrotiterplatten (Grade I, Fa. Nunc, Dänemark) wurden mit einer Lösung von 10 mg/ml rekombinantem gp160 (18) beschichtet. Sodann wurden die Platten mit PBS + 0,1 % Poly(oxyethylen)_n-sorbitan-monolaurat (Tween 20) + 1 % BSA gewaschen.

Eine Lösung von 5 µg/ml EcPhoA-sc3D6 Fusionsprotein wurde im Verhältnis 1:1 mit HIV-1 positiven bzw. HIV-1 negativen Seren gemischt und auf die beschichteten Platten aufgetragen. Als Kontrolle wurde mit Verdünnungspuffer gemischtes EcPhoA-sc3D6 Fusionsprotein aufgetragen und bei 37 °C 60 min. inkubiert. Danach wurde das ungebundene Material ausgewaschen.

Durch Zugabe von p-Nitrophenylphosphat wurde der Anteil an gebundenem EcPhoA-sc3D6 Protein nachgewiesen. Die entstandene Farbe wurde photometrisch bei 602 nm quantifiziert. Die Inhibition der Sera wurde in Prozenten der Extinktion von EcPhoA-sc3D6 Protein ohne Serum ermittelt. Wie in Abbildung 10 dargestellt, inhibieren alle HIV-1 positiven Sera die Bindung von EcPhoA-sc3D6 Fusionsprotein an gp160. Alle HIV-1 negativen Sera zeigten weniger Inhibition als die HIV-1 positiven Sera.

Beispiel 3

Eine andere Expressionsart für das sc3D6 Protein, bei welcher Maus-Myelomzellen als Wirtszellen benutzt wurden, wurde wie folgt ausgeführt:

Der 3' Teil des sc3D6-Gens wurde aus dem Plasmid pUCsc3D6 (SEQ ID NO: 3) durch partiellen EcoRV Verdau sowie durch kompletten HindIII Verdau isoliert (Länge des Fragments: 401 bp). Aus dem Plasmid pUC3D6HC (SEQ ID NO: 1) wurde der 3' Teil des Gens für die schwere Kette durch Schneiden mit EcoRV und HindIII entfernt. In den verbleibenden Vektor wurde das über Agarose-Gelelektrophorese isolierte und gereinigte 401 bp Fragment des sc3D6-Gens insertiert. Das so rekombinierte Gen besteht also aus der Sequenz für das Leaderpeptid der schweren Kette des Antikörpers 3D6, gefolgt von der Sequenz des sc3D6 Gens. Das Plasmid trägt die Bezeichnung pLsc3D6. Diese Konstruktion erlaubt die Ausschleusung des sc3D6 Proteins in tierischen Zellen. Das codierende Gen wurde aus pLsc3D6 mit den Enzymen NcoI und HindIII isoliert, die überhängenden Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und in die SmaI Stelle des für tierische Zellen geeigneten Expressionsvektors pRcRSV (Invitrogen, USA) kloniert. Die SmaI Stelle dieses Expressionsvektors liegt zwischen dem Long Terminal Repeat von RSV, also einem starken viralen Promoter, und Transkriptions-Terminationssequenzen, welche ursprünglich vom Rinder-Wachstums-hormon stammen. Durch Insertion in diese Restriktionsstelle ist es möglich, beliebige Strukturgene in eine molekulare Umgebung zu bringen, welche die Expression der Gene in tierischen Zellen erlaubt. Außerdem besitzt der Vektor pRcRSV noch einen Selektionsmarker "Neomycinresistenz", welcher die Selektion von erfolgreich transformierten tierischen Zellen in der Kultur erlaubt.

Das solcherart konstruierte Plasmid trägt die Bezeichnung pRcRSVSc3D6. Es wurde in Mausmyelomzellen der Linie P3-X63-Ag8.653 (21) transfiziert. Nach Selektion von transformierten Zellen mit dem Antibiotikum Neomycin wurden in 2 Klonierungs- und Screeningrunden insgesamt 5 Klone selektiert, welche das sc3D6 Gen exprimieren. Die Expressionslevel der einzelnen Klone wurden mittels Antigen-spezifischem ELISA getestet und liegen zwischen 0,5 und 1 µg/ml.

Der das sc3D6 Protein enthaltende Kulturüberstand der transfizierten Mausmyelomzellen wurde durch Zentrifugation bei 5000 g in einer Becherzentrifuge geklärt. Der geklärte Kulturüberstand wurde um das 10-fache durch Ultrafiltration (Minitan, PTGC, cut off 10000 Dalton, Fa. Millipore) aufkonzentriert und mit einem 50 mM Tris Puffer pH 7,2 mit dem 5-fachen Volumen diafiltriert.

Die diafiltrierte Proteinlösung wurde mit Q-Sepharose Fast Flow (Fa. Pharmacia, Schweden) weitergereinigt (Äquilibrierungspuffer 50 mM Tris Puffer pH 7,2). Die Elution des sc3D6 Proteins erfolgte mit 150 mM NaCl. Das gereinigte Protein wurde mittels Antigen-spezifischem ELISA getestet.

Die Ausbeuten der einzelnen Reinigungsstufen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Beispiel 4

Das Plasmid pRcRSVLsc3D6 wurde in Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen transfiziert. In analoger Weise wie in Beispiel 3 beschrieben, wurden transformierte Zellen selektiert und gescreent und das sc3D6 Protein aus dem Zellkulturüberstand gereinigt. Die Testung der Expressionslevels mittels Antigen-spezifischem ELISA brachte Werte zwischen 1 und 5 µg/ml Antikörper.

Beispiel 5

Das sc3D6-Gen wurde aus dem Plasmid pUCsc3D6 durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten und in den Hefe-Expressionsvektor pG1 (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA) insertiert. In dieser Konstruktion wird das sc3D6-Gen unter die Regulation des durch Galaktose induzierbaren GAL1-Promoters gestellt. Das Konstrukt wurde in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm SHY2 (*trp1*⁻) transfiziert und in Medium ohne Tryptophan auf Komplementierung der Tryptophan-Auxotrophie selektiert. Positive Transformanten wurden isoliert und zur Produktion von sc3D6 Protein herangezogen. Die Bedingungen für die Kultivierung des Produktionsstammes, sowie für die Isolierung, Aufarbeitung und Reinigung des Produktes erfolgten gemäß Standardprotokollen (22).

15

Beispiel 6

Das sc3D6-Gen wurde aus dem Plasmid pUCsc3D6 durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten und in den Vector pAc373 insertiert (23). Dieses rekombinante Plasmid wurde gemeinsam mit DNA des Baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) in die von *Spodoptera frugiperda* stammende Zelllinie Sf9 transfiziert. Die Kultivierung der Sf9 Zellen erfolgte gemäß Standardmethode, wie im Katalog der American Type Culture Collection beschrieben. 3 bis 5 Tage nach der Transfektion wurden Plaques von rekombinanten Viren mikroskopisch identifiziert und isoliert. Um sicher zu gehen, daß die isolierten rekombinanten Viren nicht durch Wildtypviren kontaminiert sind, wurden drei weitere Plaquereinigungsvorgänge angeschlossen. Infektion von Sf9 Zellen mit rekombinantem Virus führte nach 3 bis 5 Tagen zur Lyse der infizierten Zellen, und, damit verbunden, zur Produktion von sc3D6 Protein im Überstand des Zellsatzes. Das sc3D6 Protein wurde aus diesem Überstand in analoger Weise wie in Beispiel 3 beschrieben gereinigt und analysiert. Auf diese Weise konnte die Funktionalität dieses rekombinanten Proteins nachgewiesen werden.

Beispiel 7

Die für das Protein Avidin codierende Sequenz (24) wurde durch synthetische Oligonucleotide als synthetisches Gen hergestellt, und zwar so, daß zusätzlich am 5'-Ende des Gens die Sequenz des Leaderpeptids für *E. coli* Alkalische Phosphatase (20) und am 3'-Ende eine Polylinkerregion zur Insertierung anderer Gene vorliegt. In dieser Polylinkerregion insertierte Gene werden unter geeigneten Bedingungen als Fusionsproteine mit Avidin als Fusionspartner exprimiert. Mit Hilfe des am 5'-Ende befindlichen Leaders werden diese Fusionsproteine in aktiver Form in den periplasmatischen Raum von *Escherichia coli* ausgeschleust. Dieses Konstrukt wurde in eine geeignete Restriktionsstelle des bakteriellen Expressionsvektors pET-3a (25) insertiert, welcher zur Expression klonierter Gene den Bacteriophage T7- ϕ 10 Promotor sowie den ϕ Terminator enthält. Der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pET-3a-Av.

Der Bacteriophage T7- ϕ 10 Promotor hat die Eigenschaft, in Abwesenheit der Bacteriophage T7 RNA Polymerase in *E. coli* Zellen nicht transkribiert zu werden. Wird jedoch beispielsweise eine dichtgewachsene *E. coli* Kultur mit einem Phagen-Vektor, welcher die genetische Information für die T7 Polymerase trägt, infiziert, so führt die dadurch produzierte T7 Polymerase zur Expression von Genen, die beispielsweise in Vektoren wie dem oben beschriebenen kloniert vorliegen. Diese Eigenschaft ist für die Expression von Avidin und Avidin-Fusionsproteinen in *E. coli* sehr wichtig, da das Avidin für wachsende *E. coli* Kulturen toxisch ist.

Das sc3D6 Gen wurde aus dem Vektor pUCsc3D6 durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten und in die Polylinkerregion des Vektors pET-3a-Av insertiert. Der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pET-3a-Av-sc3D6. Geeignete *E. coli* Wirtszellen (z. B. HMS174) wurden mit diesem Vektor transformiert und kultiviert. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatte, wurde mit dem Bacteriophagen CE6 (Lambda cts857Sam7) (25) welcher das Bacteriophage T7 Gen1 trägt, infiziert. Die dadurch gebildete T7 Polymerase führte zur Expression des Avidin-sc3D6 Fusionsproteins im periplasmatischen Raum der *E. coli*. Sobald die Expression ihr Maximum erreicht hatte (je nach Kulturbedingungen zwischen 3 und 12 Stunden nach Infektion mit dem Phagen), wurde das rekombinante Protein in analoger Weise wie in Beispiel 2 beschrieben freigesetzt und durch Ultrafiltration ankonzentriert.

Die konzentrierte Proteinlösung wird über eine Gelchromatographiesäule (Sephacryl S 200 Fa. Pharmacia) weitergereinigt und ein zweites Mal mittels Ultrradiation ankonzentriert. Diese Lösung wird auf eine Biotinsäule aufgebracht. Das entsprechende Fusionsprotein Avidin-sc3D6 bleibt spezifisch gebunden. Die Verunreinigungen werden ausgewaschen. Die so hergestellte Affinitätsäule wurde für die Reinigung von rekombinantem gp160 analog

Beispiel 1 eingesetzt, das heißt, die vorgereinigte Proteinlösung nach Barrett et al. (18) wurde auf die Affinitätssäule aufgetragen und nach Auswaschen des ungebundenen Materials wurde das rekombinante gp160 mit 3M Rhodanid eluiert. Die dabei erzielten Ausbeuten verhalten sich analog den in Tabelle 2 dargestellten Ergebnissen.

5

Tabelle 1Aufschlußchemikalien in der Zellsuspension.

10

Substanz	Endkonzentration
Lysozym	0,2 mg/ml
RNase	15 U/ml
DNase	15 U/ml
EDTA	100 mM

15

20

Tabelle 2Ausbeuten der einzelnen Stufen der immunaffinitätschromatographischen Reinigung von rekombinantem gp160 mit sc3D6 als Affinitätsligand

25

Stufe	Volumen (ml)	Protein (mg)	gp 160 (mg)	Ausbeute
Extraktion	7000	38200	600	100 %
Lentil-Sepharose	520	1000	372	62 %
sc3D6-Affinitätschromatographie	130	148	144	24 %

35

Tabelle 3Ausbeuten der einzelnen Stufen der Reinigung von sc3D6 Protein aus dem Kulturüberstand von transformierten Mausmyelomzellen.

40

Stufe	Volumen (ml)	Protein (mg)	Titer
Kulturüberstand	3500	7600	1: 256
Ultradiafiltration	350	5300	1: 2048
Q-Sepharose	50	72	1:10000

50

Literatur

- 55 1. Grunow, R., S. Jahn, T. Porstmann, S. T. Kiessig, H. Steinkellner, F. Steindl, D. Mattanovich, L. Gürler, E. Deinhardt, H. Katinger and R. von Baehr. 1988. The high efficiency, human B cell immortalizing heteromyeloma CB-F7, J. Immunol. Methods 106:257

2. Watson, J. D., N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, and A. M. Weiner. 1987. Molecular Biology of the Gene, vol. 1 and 2, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- 5 3. Inbar, D., J. Hochmann, and D. Givol. 1972. Localisation of antibody combining sites within the variable portions of heavy and light chains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2659-2662
4. Hochman, J., D. Inbar, and D. Givol. 1973. An active antibody fragment (Fv) composed of the variable portions of heavy and light chains, Biochemistry 12:1130-1135
- 10 5. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory
6. Kabat, E. A., T. T. Wu, M. Reid-Miller, H. M. Perry, and K. S. Gottesman. 1987. Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service
- 15 7. Neuberger, M. S. 1983. Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells, EMBO J. 2:1373-1378
8. Wood, C. R., M. A. Boss, J. H. Kenten, J. E. Calvert, and N. A. Roberts. 1985. The synthesis and in vitro assembly of functional antibodies in yeast, Nature (London) 314:446-449
- 20 9. Boss, M. A., J. A. Kenten, C. R. Wood, and J. S. Emtage. 1984. Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesised in *E. coli*, Nucl. Acids Res. 12:3791-3806
10. Skerra, A., and A. Plückthun. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*, Science 240:1038-1041
- 25 11. Better, M., P. Chana, R. R. Robinson, and A. H. Horwitz. 1988. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment, Science 240:1041-1043
- 30 12. Huston, J. S., D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M.-S. Tai, J. Novotny, M. N. Margolies, R. J. Ridge, R. E. Brucolieri, E. Haber, R. Crea, and H. Oppermann. 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883
- 35 13. Bird, R. E., K. D. Hardman, J. W. Jacobson, S. Johnson, B. M. Kaufman, S.-M. Lee, T. Lee, S. H. Pope, G. S. Riordan, and M. Whitlow. 1988. Single-Chain Antigen-Binding Proteins, Science 242:423-426
- 40 14. Döpel, S.-H., T. Porstmann, R. Grunow, A. Jungbauer, and R. v. Baehr. 1989. Application of a human monoclonal antibody in a rapid competitive anit-HIV ELISA, J. Immunol. Methods 116:229-233
15. Döpel, S.-H., T. Porstmann, P. Henklein, and R. von Baehr. 1989. Fine mapping of an immunodominant region of the transmembrane protein of the Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) by different peptides and their use in anti-HIV ELISA, J. Virol. Meth. 25:167-178
- 45 16. Jungbauer, A., C. Tauer, E. Wenisch, F. Steindl, M. Purtscher, M. Reiter, F. Unterluggauer, A. Buchacher, K. Uhl, and H. Katinger. 1989. Pilot Scale Production of a Human Monoclonal Antibody Against Human Immunodeficiency Virus HIV-1, J. Biochem. Biophys. Meth. 19(2-3):223-240
- 50 17. Nakane, P. K. and A. Kawaoi. 1974. Peroxidase labeled antibody: a new method of conjugation, J. Histochem. Cytochem. 22:1084-1091
18. Barrett, N., A. Mitterer, W. Mundt, J. Eibl, M. Eibl, R. C. Gallo, B. Moss, and F. Dorner. 1989. Large-scale production and purification of a Vaccinia recombinant-derived HIV-1 gp160 and analysis of its immunogenicity, Aids Res. and Human Retroviruses 5(2):159-171

19. Kohl, J., F. Rüker, G. Himmler, D. Mattanovich, and H. Katinger, 1990. Engineered gene for *Escherichia coli* alkaline phosphatase for the construction of translational fusions, *Nucl. Acids Res.* **18**(4):1069
- 5 20. Shuttleworth, H., J. Taylor, and N. Minton, 1986. Sequence of the gene for alkaline phosphatase from *Escherichia coli* JM83, *Nucl. Acids Res.* **14**(21):8689
- 10 21. Kearney, J. F., A. Radbruch, B. Liesegang, and K. Rajewsky, 1979. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines, *J. Immunol.* **123**:1548-1550
- 15 22. Glover, D. M. 1987. DNA cloning. A practical approach, vol. 1, 2 and 3, IRL Press Oxford, Washington DC
23. Smith, G. E., M. D. Summers, and M. J. Fraser, 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector, *Mol. Cell. Biol.* **3**:2156-2165
- 15 24. Gope, M. L., R. A. Keinänen, P. A. Kristo, O. M. Conneely, W. G. Beattie, T. Zarucki-Schulz, B. W. O'Malley, and M. S. Kulomaa, 1987. Molecular cloning of the chicken avidin cDNA, *Nucl. Acids. Res.* **15**(8):3595-3606
- 20 25. Studier, F. W., and B. A. Moffatt, 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.* **189**:113

Sequenzprotokoll:

SEQ ID NO: 1

ART DER SEQUENZ: Nucleotide mit entsprechendem Protein

SEQUENZLÄNGE: 1548 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: zirkulär

ART DES MOLEKÜLS: Plasmid-DNA mit Insert von humaner cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS: Mensch

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT:

NAME DER ZELLINIE: 3D6

MERKMALE: von 1 bis 36 bp Plasmid pUC19 Polylinker
 von 37 bis 1527 bp Insert schwere Kette des Antikörpers 3D6
 von 37 bis 98 bp 5' nicht translatierte Region
 von 99 bis 1526 bp codierende Region
 von 99 bis 155 bp Signalpeptid
 von 156 bis 1526 bp reifes Peptid
 von 156 bis 533 bp variable Region
 von 156 bis 245 bp Rahmenregion 1
 von 246 bis 260 bp Hypervariable Region 1
 von 261 bis 302 bp Rahmenregion 2
 von 303 bis 353 bp Hypervariable Region 2
 von 354 bis 449 bp Rahmenregion 3
 von 450 bis 500 bp Hypervariable Region 3
 von 501 bis 533 bp Rahmenregion 4
 von 534 bis 1526 bp konstante Region
 von 1527 bis 1547 bp Plasmid pUC 19 Polylinker

EIGENSCHAFTEN: cDNA Klon der schweren Kette des Antikörpers 3D6 insertiert in das Plasmid PUC19.

AT 396 939 B

	GTGAATTCTGA GCTCGGTACCC GGGGATCCTC TAGAGTCCC GCCCTGAGAT TCCCAGGTGT	60
	TTCCATTCAAG TGATCAGCACT GAAACACAGAG GACTCACC	98
	ATG GAG TTG GGA CTG AGC TGG ATT TTC CTT TTG GCT ATT TTA AAA	143
5	MET Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys	
	-15 -10 -5	
	GGT GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG	188
	Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu	
	1 5 10	
10	GTA CAG CCT GGC AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA	233
	Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly	
	15 20 25	
15	TTC ACC TTT AAT GAT TAT GCC ATG CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA	278
	Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala MET His Trp Val Arg Gln Ala Pro	
	30 35 40	
	GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA CGT ATA AGT TGG GAT AGT AGT	323
	Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asp Ser Ser	
20	45 50 55	
	AGT ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC	368
	Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser	
	60 65 70	
25	AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG	413
	Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu	
	75 80 85	
	AGA GCT GAG GAC ATG GCC TTA TAT TAC TGT GTA AAA GGC AGA GAT	458
	Arg Ala Glu Asp MET Ala Leu Tyr Tyr Cys Val Lys Gly Arg Asp	
30	90 95 100	
	TAC TAT GAT AGT GGT GGT TAT TTC ACG GTT GCT TTT GAT ATC TGG	503
	Tyr Tyr Asp Ser Gly Gly Tyr Phe Thr Val Ala Phe Asp Ile Trp	
	105 110 115 120	
35	GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA GCC TCC ACC AAG GGC	548
	Gly Gln Gly Thr MET Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly	
	125 130 135	
	CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG	593
40	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly	
	140 145 150	
	GGC ACA GCA GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA	638
	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
	155 160 165	
45	CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG	683
	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val	
	170 175 180	
	CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC	728
50	His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu	
	185 190 195	
	AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC	773
	Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	
	200 205 210	
55	TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC	818
	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp	
	215 220 225	

~

AT 396 939 B

3	AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro 230 235 240	863
5	CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu 245 250 255	908
10	TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu MET Ile Ser Arg Thr Pro 260 265 270	953
	GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu 275 280 285	998
15	GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala 290 295 300	1043
20	AAG ACA AAG CCG CGG GAG CAG TAC AAC TCC ACG TAC CGT GTG Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 305 310 315	1088
	GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 320 325 330	1133
25	GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile 335 340 345	1178
30	GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 350 355 360	1223
	GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln 365 370 375	1268
35	GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 380 385 390	1313
40	GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 395 400 405	1358
	ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr 410 415 420	1403
45	AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val 425 430 435	1448
50	TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA Phe Ser Cys Ser Val MET His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 440 445 450	1493
55	CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Stop 455 460	1526
	GACCTGCAGG CATGCAAGCT T	1547

AT 396 939 B

SEQ ID NO: 2

ART DER SEQUENZ: Nucleotide mit entsprechendem Protein
SEQUENZLÄNGE: 945 Basenpaare

5 STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: zirkulär
ART DES MOLEKÜLS: Plasmid-DNA mit Insert von humaner cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

10 ORGANISMUS: Mensch
UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT:
NAME DER ZELLINIE: 3D6

15 MERKMALE: von 1 bis 21 bp Plasmid pUC19 Polylinker
von 22 bis 732 bp Insert leichte Kette des Antikörpers 3D6
von 22 bis 27 bp 5' nicht translatierte Region
von 28 bis 732 bp codierende Region
von 28 bis 93 bp Signalpeptid
von 94 bis 732 bp reifes Peptid
20 von 94 bis 408 bp variable Region
von 94 bis 162 bp Rahmenregion 1
von 163 bis 195 bp Hypervariable Region 1
von 196 bis 240 bp Rahmenregion 2
von 241 bis 261 bp Hypervariable Region 2
25 von 262 bis 357 bp Rahmenregion 3
von 358 bis 378 bp Hypervariable Region 3
von 379 bis 408 bp Rahmenregion 4
von 409 bis 732 bp konstante Region
von 733 bis 905 bp 3' nicht translatierte Region
30 von 906 bis 945 bp Plasmid pUC 19 Polylinker

EIGENSCHAFTEN: cDNA Klon der leichten Kette des Antikörpers 3D6 insertiert in das Plasmid PUC19.

35 GTGAATTCTGA GCTCGGTACC CCACAGC 27
ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTG CTC 72
MET Asp MET Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu
-18 -13 -8
40 TGG CTC CCA GGT GCC AAA TGT GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCT 117
Trp Leu Pro Gly Ala Lys Cys Asp Ile Gln MET Thr Gln Ser Pro
-3 3 8
45 TCC ACC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC 162
Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
13 18 23
50 CGG GCC AGT CAG AGT ATT AGT AGG TGG TTG GCC TGG TAT CAG CAG 207
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
28 33 38
55 AAA CCA GGG AAA GTC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAG GCA TCT AGT 252
Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser
43 48 53

AT 396 939 B

	TTA GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly 58 63 68	297
5	ACA GAA TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAT GAT TTT Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gin Pro Asp Asp Phe 73 78 83	342
10	GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAT TCT TTC GGC CCT Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Phe Gly Pro 88 93 98	387
15	GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val 103 108 113	432
20	TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala 118 123 128	477
25	TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys 133 138 143	522
30	GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln 148 153 158	567
35	GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu 163 168 173	612
40	AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys 178 183 188	657
	GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val 193 198 203	702
45	ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Stop 208	732
50	CACCTGCTCC TCAGTTCCAG CCTGACCCCCC TCCCCATCCTT TGGCCTCTGA CCCCTTTTCC ACAGGGGACC TACCCCTATT GCGGTCTCC AGCTCATCTT TCACCTCACC CCCCTCCTCC TCCTTGGCTT TAATTATGCT AATGTTGGAG GAGAATGAAT AAATAAAAGTG AATGGGGATC CTCTAGAGTC GACCTGCAGG CATGCAAGCT TGG	792 852 912 945

45 SEQ ID NO: 3

ART DER SEQUENZ: Nucleotide mit entsprechendem Protein
SEQUENZLÄNGE: 776 Basenpaare

50 STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: zirkulär

ART DES MOLEKÜLS: Plasmid-DNA mit Insert von engineerter humaner cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

55 ORGANISMUS: Mensch

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT:

NAME DER ZELLINIE: 3D6

AT 396 939 B

MERKMALE: von 1 bp bis 13 bp Plasmid pUC19 Polylinker
 von 14 bp bis 760 bp Insert sc3D6
 von 14 bp bis 16 bp Start codon
 von 14 bp bis 394 bp Variable Region schwere Kette
 von 17 bp bis 106 bp Rahmenregion 1 schwere Kette
 von 107 bp bis 121 bp Hypervariable Region 1 schwere Kette
 von 122 bp bis 163 bp Rahmenregion 2 schwere Kette
 von 164 bp bis 214 bp Hypervariable Region 2 schwere Kette
 von 215 bp bis 310 bp Rahmenregion 3 schwere Kette
 von 311 bp bis 361 bp Hypervariable Region 3 schwere Kette
 von 362 bp bis 394 bp Rahmenregion 4
 von 395 bp bis 440 bp Linker
 von 441 bp bis 760 bp Variable Region leichte Kette
 von 441 bp bis 508 bp Rahmenregion 1 leichte Kette
 von 509 bp bis 542 bp Hypervariable Region 1 leichte Kette
 von 543 bp bis 588 bp Rahmenregion 2 leichte Kette
 von 589 bp bis 607 bp Hypervariable Region 2 leichte Kette
 von 608 bp bis 703 bp Rahmenregion 3 leichte Kette
 von 704 bp bis 724 bp Hypervariable Region 3 leichte Kette
 von 725 bp bis 757 bp Rahmenregion 4
 von 758 pb bis 760 bp Stop codon
 von 761 bp bis 776 bp Plasmid pUC 19 Polylinker

EIGENSCHAFTEN: Klon des Einzelketten-Fv-Fragments des Antikörpers 3D6 insertiert in das Plasmid PUC19.

	AAAAGAATTC CCC	13
25	ATG GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GCC TTG GTA CAG CCT MET Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro	58
30	5 10 15	
	GGC AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	103
35	20 25 30	
	AAT GAT TAT GCC ATG CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC Asn Asp Tyr Ala MET His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly	148
40	35 40 45	
	CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATA AGT TGG GAT AGT AGT AGT ATA GGC Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asp Ser Ser Ser Ile Gly	193
45	50 55 60	
	TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn	238
50	65 70 75	
	GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu Arg Ala Glu	283
55	80 85 90	
	GAC ATG GCC TTA TAT TAC TGT GTA AAA GGC AGA GAT TAC TAT GAT Asp MET Ala Leu Tyr Tyr Cys Val Lys Gly Arg Asp Tyr Tyr Asp	328
	95 100 105	
	AGT GGT GGT TAT TTC ACG GTT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG Ser Gly Gly Tyr Phe Thr Val Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly	373
55	110 115 120	
	CA ATG GTC ACC GTC TCT TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT Thr MET Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	418
	125 130 135	

AT 396 939 B

	GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCT Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln MET Thr Gln Ser Pro 140	145	150	463
5	TCC ACC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys 155	160	165	508
10	CGG GCC AGT CAG AGT ATT AGT AGG TGG TTG GCC TGG TAT CAG CAG Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln 170	175	180	553
	AAA CCA GGG AAA GTC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAG GCA TCT AGT Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser 185	190	200	598
15	TTA GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly 205	210	215	643
20	ACA GAA TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAT GAT TTT Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe 220	225	230	688
	GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAT TCT TTC GGC CCT Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Phe Gly Pro 235	240	245	733
25	GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA CGA TAA Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Stop--- 250			760
	GCTTCTGCAC CATCTG			776
30				

PATENTANSPRÜCHE

35

1. An ein komplexes virales Antigen von HIV-1 bindendes rekombinantes Protein, dadurch gekennzeichnet, daß es nur die variablen Regionen eines von der Zelllinie 3D6 stammenden Antikörpers enthält.

40

2. Rekombinantes Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die variable Region der schweren Kette gemäß SEQ ID NO: 1 enthält.

45

3. Rekombinantes Protein nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es die variable Region der leichten Kette gemäß SEQ ID NO: 2 enthält.

4. Rekombinantes Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es gemäß SEQ ID NO: 3 aufgebaut ist, wobei die variable Region der schweren Kette mit der variablen Region der leichten Kette über einen Linker verbunden ist.

50

5. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA Insertion sc3D6 bzw. eine mit dieser Insertion hybridisierende Sequenz oder eine durch Degeneration aus dem exprimierten Protein abgeleitete Sequenz in ein Plasmid eingeführt, mit diesem Plasmid ein Wirt transformiert und das Konstrukt exprimiert wird.

55

6. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es als Fusionsprotein, insbesondere zusammen mit Alkalischer Phosphatase oder zusammen mit Avidin, exprimiert wird.

7. Insertion zum Einsatz in dem Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertion sc3D6 die in SEQ ID NO: 3 angegebene Nucleotidsequenz aufweist.

5 8. Verfahren zur Reinigung des rekombinanten Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß spezifische Antikörper gegen das Protein und/oder gegen den Linker zwischen den beiden variablen Anteilen eingesetzt werden.

10 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Reinigung eingesetzten Antikörper an einem Träger immobilisiert sind.

15 10. Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von HIV-1 Antigen, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung und/oder Reinigung durch Affinitätschromatographie erfolgt, wobei, gegebenenfalls nach entsprechender Vorreinigung, das sc3D6 Protein oder das Avidin-sc3D6 Protein als Ligand für die Affinitätschromatographie eingesetzt wird.

15 11. Verfahren zum direkten Nachweis von HIV-1 Antigen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Fusionsprotein eingesetzt wird, welches EcpHOA-sc3D6 Protein als kombiniertes Detektions- und Signalprotein beinhaltet.

20 12. Verfahren zum Nachweis von HIV-1-positiven Seren in kompetitiven Immunassays, dadurch gekennzeichnet, daß ein Fusionsprotein eingesetzt wird, welches EcpHOA-sc3D6 Protein als kombiniertes Detektions- und Signalprotein enthält.

25 Hiezu 5 Blatt Zeichnungen

30

35

40

45

50

55

Ausgegeben

27.12.1993

Int. Cl.⁵: C12N 15/13

G01N 33/577

Blatt 1

→ Leader | Variable Region →
 → K G V Q C | E V Q L V →
 141 AAA CGT GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG GTG 170 Wildtyp
 AAA GAA TTC CCC ATG GAA GTG CAG CTG GTG mutiert
 *** * ***
 EcoRI NcoI
 Start

Fig. 1: Mutation am Übergang zwischen der Leaderregion und der variablen Region der schweren Kette des Antikörpers 3D6 (SEQ ID NO: 1). Mutierte Basen sind mit "*" gekennzeichnet. Die kodierten Aminosäuren in der Wildtyp-DNA sind angeführt, außerdem die durch die Mutation entstandenen Restriktionsstellen EcoRI und NcoI sowie das Startcodon ATG.

~variable Region | konstante Region →
 V T V S S | A S T K G →
 519 GTC ACC GTC TCT TCA GCC TCC ACC AAG GGC 548 Wildtyp
 GTC ACC GTC TCT TCA GGA TCC ACC AAG GGC mutiert
 **
 BamHI

Fig. 2: Mutation am Übergang zwischen der variablen Region und der konstanten Region der schweren Kette des Antikörpers 3D6 (SEQ ID NO: 1). Mutierte Basen sind mit "*" gekennzeichnet. Die kodierten Aminosäuren in der Wildtyp-DNA sind angeführt, außerdem die durch die Mutation entstandenen Restriktionsstelle BamHI.

→ Leader Region | variable Region →
 P G A K C | D I Q M T →
 79 CCA GGT GCC AAA TGT GAC ATC CAG ATG ACC 108
 CCA GGT GCC AAA GTC GAC ATC CAG ATG ACC

 SalI

Fig. 3: Mutation am Übergang zwischen der Leaderregion und der variablen Region der leichten Kette des Antikörpers 3D6 (SEQ ID NO: 2). Mutierte Basen sind mit "*" gekennzeichnet. Die kodierten Aminosäuren in der Wildtyp-DNA sind angeführt, außerdem die durch die Mutation entstandenen Restriktionsstelle SalI.

Ausgegeben

27. 12.1993

Int. Cl.⁵: C12N 15/13

G01N 33/577

Blatt 2

→ variable Region | konstante Region →
 →V D I K R | T V A A P →
 397 GTG GAT ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA 426
 GTG GAT ATC AAA CGA TAA GCT TCT GCA CCA
 *** ***
 HindIII
 Stop

Fig.4: Mutation am Übergang zwischen der variablen Region und der konstanten Region der leichten Kette des Antikörpers 3D6 (SEQ ID NO: 2). Mutierte Basen sind mit "*" gekennzeichnet. Die kodierten Aminosäuren in der Wildtyp-DNA sind angeführt, außerdem die durch die Mutation entstandenen Restriktionsstelle HindIII sowie das Stopcodon TAA.

→ VH | Linker →
 * **
 380 GTC ACC GTC TCT TCA GGA TCC GGT GGC TCG GGC 412
 GTC ACC GTC TCT TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC
 →V T V S S G G G G S G →

Fig.5: DNA Sequenz der Verknüpfungsstelle VH - Linker vor und nach der Rückmutation zur Wiederherstellung der natürlichen Aminosäuresequenz im Bereich der VH Region (SEQ ID NO: 3). Mutierte Basen sind mit "*" gekennzeichnet. Die endgültige Aminosäuresequenz ist angegeben.

→ Linker | VL →

 422 TCG GGT GGC GGC GGA GTC GAC ATC CAG ATG 451
 TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATC CAG ATG
 →S G G G S D I Q M →

Fig.6: DNA Sequenz der Verknüpfungsstelle Linker - VL vor und nach der Rückmutation zur Wiederherstellung der natürlichen Aminosäuresequenz im Bereich der VL Region (SEQ ID NO: 3). Mutierte Basen sind mit "*" gekennzeichnet. Die endgültige Aminosäuresequenz ist angegeben.

Ausgegeben

27. 12.1993

Int. Cl.5: C12N 15/13

G01N 33/577

Blatt 3

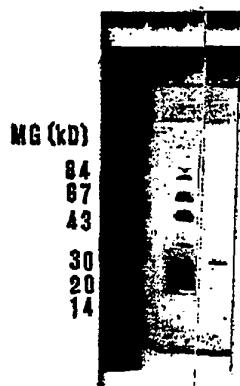


Fig.7: SDS Gel des gereinigten sc3D6. Molekulargewichte des verwendeten Standards sind angegeben.

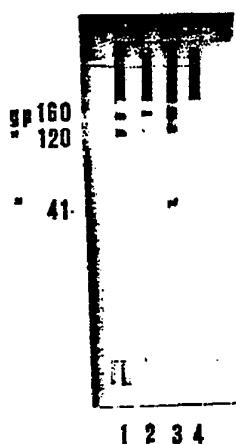


Fig.8: HIV-1 Westernblot Streifen.
Antigen bindended Protein: 1. sc3D6 Protein
2. APsc3D6 Fusionsprotein
3. Antikörper 3D6
4. gesamt-Protein aus E. coli

Ausgegeben

27. 12.1993

Int. Cl.⁵: C12N 15/13

G01N 33/577

Blatt 4

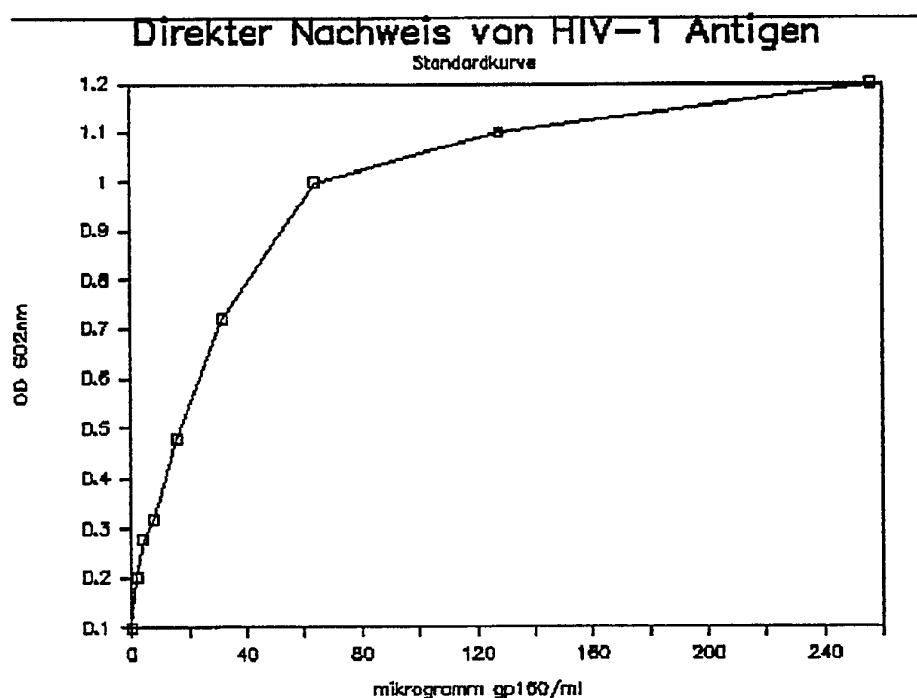


Fig. 9: Standardkurve des ELISA zum direkten Nachweis von HIV-1 Antigen mit sc3D6 Protein

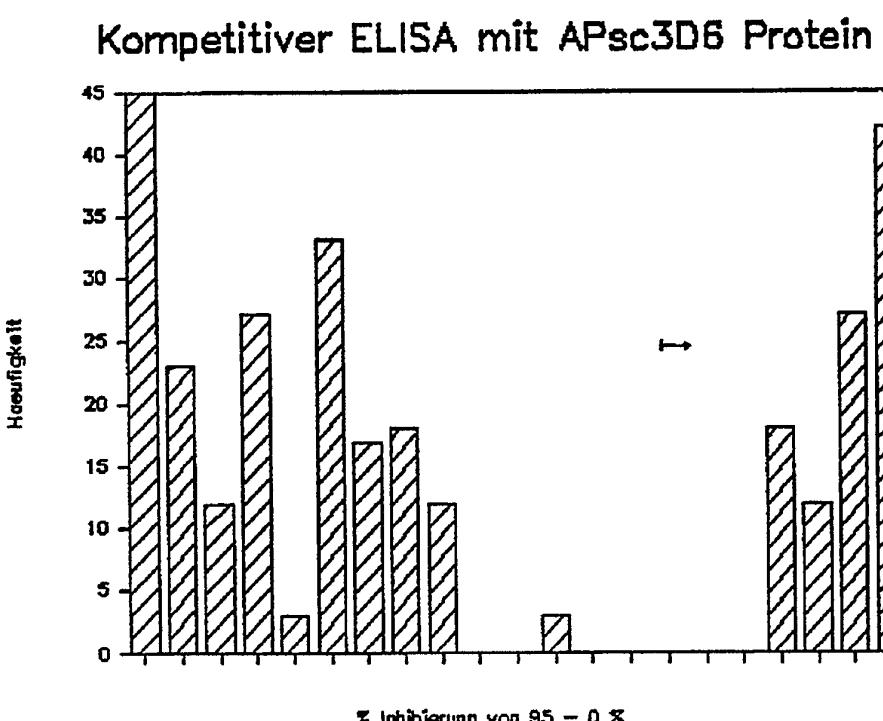


Fig. 10: Kompetitiver ELISA mit APsc3D6 Protein. Bei Proben rechts vom Pfeil handelt es sich um HIV-1 negative Sera