



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1571/86	(51) Int.Cl.5	C 12 N 15/49
(22) Indleveringsdag: 07 apr 1986		C 07 K 13/00
(41) Alm. tilgængelig: 09 okt 1986		C 07 K 15/04
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 06 sep 1993		C 12 N 15/62
(86) International ansøgning nr.: -		C 12 P 21/00
		G 01 N 33/569
(30) Prioritet: 08 apr 1985 US 721237 29 apr 1985 US 728052 10 jul 1985 US 753769 07 nov 1985 US 783299		

(73) Patenthaver: *GENETIC SYSTEMS CORPORATION; 3005 First Avenue; Seattle; Washington 98121, US

(72) Opfinder: Susan Mitsue *Watanabe; US, Wesley *Cosand; US, Susan *McArdle; US, Bruce McFarland *Travis; US

(83) Deponering af mikroorganismer Udlev.t.exp.

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) DNA-sekvens, der koder for et protein, der er immunologisk reaktivt mod antistoffer for LAV, et rekombinantplasmid indeholdende DNA-sekvensen, bakteriecelle med rekombinantplasmidet, fremgangsmåde til fremstilling af proteiner som er immunologisk reaktive med antistoffer for LAV, samt proteinet og anvendelser af proteinet

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammen drag:

1571-86

Proteiner, som er immunologisk reaktive overfor antistoffer for lymfadenopatia-associeret virus (LAV), eksprimeres af bakterieværtsceller transformeret med et rekombinantplasmid, som omfatter prokaryotiske transcriptions og translationssignaler, efterfulgt af en DNA-sekvens omfattende en del af LAV-genomets env-region, hvilken del koder for et protein, som er immunologisk reaktivt overfor antistoffer for LAV eller antistoffer for virus, der er defineret som værende ækvivalente eller lig med LAV. Proteinerne kan anvendes til screening for tilstedeværelsen af antistoffer for LAV i en biologisk væske, til bestemmelse af forekomsten af LAV-antigen i en biologisk væske eller ved en fremgangsmåde til dannelselse af antistoffer for LAV ved immunisering af et dyr med proteinet.

fortsættes

ENV-3

FIG. 7 1571-86

15
Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu
30
Leu Try Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro
22 40
Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly
50 1 60
Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met
70 80
Gly Ala Gly Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser
90
Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln
100 110
Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala
120
Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly
130 1 140
Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp
150 160
Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met
170 1
Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr

Den foreliggende opfindelse angår DNA-sekvens, der koder for et protein, der er immunologisk reaktivt mod antistoffer for LAV, et rekombinantplasmid indeholdende DNA-sekvensen, bakteriecelle med rekombinantplasmidet, fremgangsmåde til fremstilling af proteiner som er immunologisk reaktive med antistoffer for LAV, samt proteinet og anvendelser af proteinet.

Erhvervet immundefekt-syndrom (AIDS) er en cellulær immunitetdefekt, der kan overføres og er karakteriseret ved opportunistiske infektioner og visse sjældne maligne lidelser. Hovedrisikogrupperne for AIDS omfatter homoseksuelt aktive mænd, intravenøse narkomaner, recipienter for transfusioner og blodprodukter og heteroseksuelle partnere og børn af individer fra disse højrisikogrupper, hvilket antyder, at infektiøst materiale, der overføres ved intim kontakt eller via blodprodukter, er involveret.

Nye undersøgelsesresultater viser, at det infektiøse materiale, der er ansvarligt for overførsel af sygdommen, er en hidtil ukendt lymfotrof retrovirus, der kendes som lymfadenopatia-associeret virus (LAV) (Barré Sinoussi et al., Science 220: 868 (1983)). Lignende virus er beskrevet af andre videnskabelige grupper (Popovic et al., Science 224: 497 (1984); Levy et al., Science 225: 840 (1984)) og betegnet human T-celle-lymfotrof virus type III (HTLV-III), AIDS-associeret retrovirus (ARV) eller immundefekt-associeret virus (IDAV). Endnu nyere data viser, at LAV, HTLV-III, ARV og IDAV deler visse vigtige egenskaber, herunder i det væsentlige nucleotidhomologi (Wain-Hobson et al., Cell 40: 9 (1985); Muesing et al., Nature 313: 450 (1985); SanchezPescador et al., Science 227: 484 (1985)), og derfor kan betragtes som isolater af den samme virus, skønt der er en sandsynlighed for, at variationer fra stamme til stamme blandt de virale isolater vil forekomme. Foruden at udvise i det væsentlige nucleotidhomologi er isolaterne ens med hensyn til morfologi, cy-

topatologi, krav til optimal revers transcriptaseaktivitet og i det mindste nogle antigene egenskaber (Levy, se ovenfor; Schupbach et al., Science 224: 503 (1984)).

Som bemærket ovenfor er det kendt, at virusen
5 kan overføres gennem blodprodukter (blod, blodserum, blodplasma og fraktioner deraf), hvilket gør det vigtigt at screene blodprodukter til bestemmelse af, om donoren har været udsat for virusen. Dette kan gøres på en række forskellige måder, herunder enzymforbundet
10 immunosorbent-assay (ELISA) til påvisning af antistoffer for LAV og beslægtede virus. Individer, hvis blod indeholder antistoffer for LAV, siges at være "seropositive". Blod fra seropositive donorer kan elimineres fra blodbeholdningerne efter påvisningen, hvilket hjælper
15 til hindring af spredning af sygdommen.

Immunresponset hos individer udsat for LAV varierer. Antistoffer kan dannes mod ethvert af en række virale proteiner, herunder p13, p18, p25, p36, gp43, p55, gp110, osv. (Schupbach et al., New Engl. J. Med.
20 312: 265 (1985)). Ikke alle individer vil danne antistoffer for de samme proteiner eller for den samme epitop på et givet protein.

Påvisningen af seropositive individer, som den i dag praktiseres, har en række iboende problemer. Det
25 vigtigste af disse problemer er nødvendigheden af at isolere antigener fra hele virus til de immunologiske assays. Denne isolation kræver håndtering af store volumener levende, potentielt infektiøse virus, og udgør således en væsentlig sikkerhedsrisiko. Desuden er der
30 bekymringer i forbindelse med udbyttet, renheden og reproducerbarheden af virus fra en produktion til en anden. Dette kan resultere i et uacceptabelt antal falske positive og/eller negative. Følgelig er der indenfor dette område et behov for alternative fremgangsmåder til fremstilling af virale antigener, som kan
35 anvendes ved blodscreenings-asays og som yderligere giver

andre fordele.

Desuden er der hidtil ikke fundet nogen effektiv
behandling af sygdommen. Idet spredningen af AIDS be-
gynder at nå overordentligt høje, hvis ikke epidemiske
5 hastigheder, og idet omfanget, med hvilket virusen kan
overføres, stadig er tvivlsomt, er der også indenfor
teknikken et behov for et farmaceutisk præparat til ge-
nerel immunisering af befolkningen. Den foreliggende
opfindelse opfylder dette behov og giver andre fordele.

10 Opfindelsen angår en DNA-sekvens, der er ejen-
dommelig ved, at den indeholder en del af LAV-genomets
env-region, især én eller flere sekvenser, der i det
væsentlige omfatter pENV-1, pENV-2, pENV-3, pENV-4 el-
ler pENV-5, hvilken del koder for et protein, som er
15 immunologisk reaktivt med antistoffer for LAV.

Desuden beskrives et rekombinantplasmid, der er
i stand til at replikere i bakterieværtsceller. Plas-
midet omfatter prokaryotiske transcriptions- og trans-
lationssignaler for ekspression, der i læsefasen efter-
20 følges af den ovenfor beskrevne DNA-sekvens. Ved en
foretrukken udførelsesform vælges signalerne blandt
opéroner, såsom trp-operonet, som er inducerbart og/el-
ler kan undertrykkes. Desuden beskrives bakteriecel-
ler, såsom E. coli, som er transformeret med rekombi-
25 nantplasmidet beskrevet ovenfor.

Et andet aspekt af opfindelsen angår en frem-
gangsmåde til fremstilling af proteiner, som er immuno-
logisk reaktive med antistoffer for LAV eller T-celler,
der er reaktive overfor LAV. Fremgangsmåden omfatter
30 indføjelse i en bakterieværtscelle af et rekombinant-
plasmid, der er i stand til at replikere i bakterie-
værtscellen. Plasmidet omfatter prokaryotiske trans-
criptions- og -translationssignaler til ekspression,
efterfulgt i aflæsningsfasen af en DNA-sekvens omfat-
35 tende en del af LAV-genomets env-region, hvilken del
koder for et protein, som er immunologisk reaktivt med

antistoffer for LAV. Efter indføjelser af plasmidet dyrkes bakterieværtscellen i et passende medium. Ekspression af proteinet induceres dernæst, og proteinproduktet af sekvensen isoleres fra bakterieværtscellerne.

5 Proteinproduktet kan renses efter isolation, f.eks. ved gelpermeationschromatografi.

Et yderligere aspekt af opfindelsen angår anvendelsen af protein, fremstillet som beskrevet ovenfor, til bestemmelse af forekomsten af antistoffer for LAV i en biologisk væske. Ved en udførelsesform omfatter fremgangsmåden inkubation af den biologiske væske med et protein fremstillet af bakterieceller transformeret med et rekombinantplasmid som beskrevet ovenfor til dannelsen af en reaktionsblanding,

10 og dernæst analyse af reaktionsblandingen til bestemmelse af forekomsten af antistoffer. Ved en foretrukken udførelsesform omfatter trinnet til analyse af reaktionsblandingen, at reaktionsblandingen bringes i kontakt med en mærket specifik bindingspartner for antistoffet.

15 Ved en anden udførelsesform bestemmes forekomsten af antistoffer for LAV ved udførelse af en kompetitiv test mellem en prøve mistænkt for at indeholde antistof og et mærket monoklonalt antistof for binding til et immobiliseret rekombinantprotein. Reaktionsblandingen analyseres derefter til bestemmelse af mængden af mærket antistof bundet til den faste fase.

20

25

Endnu et aspekt af opfindelsen angår anvendelsen af protein, fremstillet som beskrevet ovenfor til bestemmelse af forekomsten af LAV-antigen

30 i en biologisk væske, omfattende inkubation af den biologiske væske med et mærket protein fremstillet af bakterieceller transformeret med et rekombinantplasmid som beskrevet ovenfor, og enten efterfølgende eller samtidig inkubation med et antistof for proteinet, således at specifik binding sker. Dernæst analyseres reaktionsblandingen dannet under inkubationen til bestemmelse af mængden af markør bundet til antistoffet.

35

Der beskrives også anvendelsen af protein, fremstillet som beskrevet ovenfor til fremstilling af antistoffer for LAV omfattende immunisering af et dyr med et protein fremstillet af bakterieceller transformeret med et rekombinantplasmid som beskrevet ovenfor.

Yderligere et aspekt af opfindelsen angår en fremgangsmåde til bestemmelse af forekomsten af antistoffer for LAV i en biologisk væske, omfattende konjugering af latexkugler til et protein dannet af bakterieceller transformeret med et rekombinantplasmid som beskrevet ovenfor. Derefter inkuberes den biologiske væske med kugle/proteinkonjugatet til dannelse af en reaktionsblanding. Reaktionsblandingen analyseres dernæst til bestemmelse af forekomsten af antistofferne.

Opfindelsen angår yderligere proteiner fremstillet som beskrevet ovenfor, omfattende ENV-1, ENV-2, ENV-3, ENV-4 og ENV-5. Et foretrukket protein ifølge opfindelsen er ENV-3.

Proteinerne, fremstillet ifølge opfindelsen, danner, når de anvendes med en egnet bærer eller et egnet fortyndingsmiddel, et immunologisk effektivt vacci-
nepræparat. Ved administrering af en immunogent effektiv mængde af et protein kodet af en DNA-sekvens omfattende en del af LAV-genomets env-region og bundet til en fysiologisk acceptabel bærer til en person, kan infektion forårsaget af virusen, der er ansvarlig for AIDS, forebygges.

Andre aspekter af opfindelsen vil fremgå af den følgende detaljerede beskrivelse og af tegningerne. Nedenfor følger en kort beskrivelse af tegningerne:

Fig. 1 viser fremstillingen af mpSW16 og mpSW19 ud fra λ J19,

fig. 2 viser trp-E-ekspressionsvektorerne pJH 11, pJH 12 og pJH 14, indeholdende poly-linkersekvenserne,

fig. 3 viser oprindelsen af LAV-insert'ene i pENV-1, pENV-2, pENV-3, pENV-4 og pENV-5,

- fig. 4 viser fremstillingen af pENV-5 og pENV-4
ud fra pJH 12 og mpSW19,
fig. 5 viser fremstillingen af pENV-2 ud fra pJH
14 og mpSW19 og fremstillingen af pENV-3
5 ud fra pJH 11 og mpSW19,
fig. 6 viser fremstillingen af pENV-4 ud fra pJH
12 og mpSW16,
fig. 7 viser aminosyresekvensen for ENV-3, og
fig. 8 viser nucleotidsekvensen af ENV-regionen
10 og dets proteinprodukt.

Inden nærmere beskrivelse af opfindelsen kan det
være nyttigt for forståelsen deraf at fremsætte defini-
tioner på visse udtryk, der anvendes i det følgende.

15 Lymfadenopatia-associeret virus (LAV):

En human T-lymfotrof retrovirus. I forbindelse
med den foreliggende opfindelse betragtes en virus som
værende den samme som eller ækvivalent med LAV, hvis
20 den i det væsentlige opfylder de følgende kriterier:

- (a) virusen er trofisk for T-lymfocytter, især
T-hjælpeceller ($CD4^+$ ifølge den internationale nomenkla-
tur defineret i Bernard et al., red., Leucocytes
Typing, New York: Springer Verlag (1984));
- 25 (b) virusen er cytopatisk for inficerede $CD4^+$
celler (i stedet for transformerende, som HTLV-I og -II
er);
- (c) virusen koder for en RNA-afhængig DNA-poly-
merase (revers transcriptase), som er Mg^{2+} -afhængig
30 (optimal koncentration 5 mM, optimal pH-værdi 7,8, in-
hiberes ikke af actinomycin D) og kan anvende oligo-
(dT)₁₂₋₁₈ som en primer til revers transcription fra
dens 3' LTR;
- (d) virusen slutter sig sammen i en saccharose-
35 gradient ved en densitet på ca. 1,16;
- (e) virusen kan mærkes med [3H]-uridin;

(f) virusen er ud fra immunologi- og nucleotid-sekvenskriterier forskellig fra medlemmer af HTLV-I/II-familien af virus (ved dette kriterie kan HTLV-III ikke betragtes som et medlem af HTLV-I/II-familien);

5 (g) virusen er i det væsentlige immunologisk krydsreaktiv med proteinerne som gag- og env-regionerne af LAV koder for; og

(h) virusen deler i det væsentlige nucleotidhomologi (78-100%) og aminosyresekvenshomologi (90-100%)
10 med LAV.

Immunologisk reaktiv:

Et antigen og et antistof siges at være "immunologisk reaktive", hvis de er i stand til at binde specifikt med hinanden, typisk med en affinitet på mindst 10^6M^{-1} , oftest mindst 10^8M^{-1} .
15

Transformeret eller transformation:

20 Processen til stabil og vedblivende ændring af en recipientcelles eller mikroorganismes genotype ved indføring af rensat DNA.

Lymfadenopatia-associeret virus (LAV) kan isoleres fra patienter med AIDS eller lymfadenopatiasyndrom.
25 Der udføres typisk biopsi på sådanne patienters lymfeknuder, og det udtagne placeres i et kulturmedium, der er tilsat de nødvendige komponenter til opretholdelse af vækst. Et mitogen, såsom interleukin-2 (IL-2) eller phytohemagglutinin (PHA) kan være inkorporeret. Antiserum for humant interferon kan også være inkorporeret.
30 Revers transcriptaseaktivitet fremkommer typisk på ca. 15. dagen af dyrkningen, hvilket viser tilstedeværelsen af virus. Virusen kan opkoncentreres fra kultursupernatanten ved anvendelse af en ikke-ionisk detergent,
35 efterfulgt af sammenslutning i en saccharosegradient. Disse og andre fremgangsmåder til oprensning er vel-

kendte indenfor dette fagområde og er f.eks. beskrevet i Montelaro et al., J. Virology 42: 1029 (1982).

LAV kan propageres på en vilkårlig af en række forskellige måder. Den kan dyrkes i T-lymfocytter opnået ud fra navlestrengen, perifert blod eller benmarv. Alternativt kan den propageres i dræbte T-celler eller B-celler; se f.eks. Popovic et al., Science 224: 497 (1984), og Montagnier et al., Science 225: 63 (1984). Væksten af virusen måles sædvanligvis ved forekomsten af revers transcriptaseaktivitet.

En genomklon af LAV kan fremstilles ved enhver af de adskillige fremgangsmåder, der er velkendte indenfor dette fagområde, herunder, men ikke begrænset til, dem der er beskrevet af Hahn et al., Nature 312: 166 (1984); Alizon et al., Nature 312: 757 (1984); Luciw et al., Nature 313: 760 (1984); og Muesing et al., Nature 313: 450 (1985).

Kort beskrevet isoleres DNA ved en af disse fremgangsmåder (Alizon et al.) fra LAV-inficerede T-celler fra en rask donor, den nedbrydes delvist med en restriktionsendonuclease, såsom Hind III, og det opnåede nedbrydningsprodukt fraktioneres elektroforetisk. Fragmenter, som svarer i størrelse til størrelsen af hele LAVgenomet (ca. 9,2 Kb), elueres fra gelen, bundfældes, gensuspenderes og liggeres i armene af en passende restringeret vektor. Ligeringsblandingen pakkes ind i bakteriofagpartikler. Bakterier transficeres med bakteriofagen, og klonerne screenes in situ for LAV-inserts ved anvendelse af en passende probe (såsom et cDNA opnået ud fra LAV-RNA). Fra en sådan klon kan den ønskede LAV-region klones ind i en bakteriel plasmidvektor, såsom pUC 18. Yderligere subkloning kan være ønskelig til fjernelse af uønskede sekvenser og tilføjelse af yderligere restriktionssteder (i form af en polylinker) til hver ende med det formål at lette kloning ind i en ekspressionsvektor.

LAV-Sekvenserne kan dernæst subklones ind i en inducerbar ekspressionsvektor. En række ekspressionsvektorer er kendte indenfor fagområdet og omfatter λ gt 11:Tn5 (Hall et al., Nature 311: 379 (1984); trp E (Paul et al., Euro. J. Cell. Biol. 31: 171 (1983);
5 pINIII (Masui et al., Biotechnology, Jan. 1984, s. 81).

De opnåede proteiner kan delvist renses og anvendes til en række forskellige formål, herunder som immunogener og antigener i immunoassays. Til anvendelse
10 se som immunogener kan proteinerne injiceres i et dyr, såsom en mus, kanin, ged, osv., enten i pufferopløsning eller adjuvans. Alternativt kan proteinerne renses ved polyacrylamidgelelektroforese, og båndene af interesse kan udtages fra gelen, tritureres og gensuspenderes i
15 puffer til injektion i værtsdyr. Polyklonale eller monoklonale antistoffer kan fremstilles. Til anvendelse som antigener i immunoassays kan proteinerne anvendes på mærket eller ikke-mærket form. Hvor de mærkes, kan markørerne omfatte radioisotoper, fluorophorer, enzymer,
20 mer, luminescerende stoffer eller partikler. Disse og andre markører er velkendte indenfor dette fagområde og er f.eks. beskrevet i de følgende US patentskrifter: nr. 3.766.162; 3.791.932; 3.817.837; 3.996.345 og 4.233.402.

25 Assays, ved hvilke rekombinantproteinerne ifølge den foreliggende opfindelse anvendes, kan være heterogene (dvs. kræve et separationstrin) eller homogene. Hvis assayen er heterogen, kan en række separationsmetoder anvendes, herunder centrifugering, filtrering,
30 chromatografi eller magnetisme.

Et foretrukket assay til screening af blodprodukter eller andre fysiologiske væsker for tilstedeværelsen af antistoffer er en ELISA-assay. Typisk adsorberes antigen (i dette tilfælde et eller en kombination
35 af rekombinantproteiner) til overfladen af en mikrotiterbrønd. Resterende proteinbindingssteder på overfla-

den blokeres dernæst med et passende middel, såsom bovint serumalbumin (BSA), varmeinaktiveret normalt gederum (NGS) eller BLOTTO (en pufret opløsning af fedtfri tør mælk, som også indeholder et konserveringsmiddel, salte og et antiskumningsmiddel). Brønden inkuberes dernæst med en prøve, der mistænkes for at indeholde specifikt antistof. Prøven kan påføres rent, eller oftere kan den fortyndes, sædvanligvis i en pufferopløsning, som indeholder en lille mængde (0,1-5,0 vægt%) protein, såsom BSA, NGS eller BLOTTO. Efter inkubation i et tilstrækkeligt tidsrum til muliggørelse af at specifik binding kan ske, vaskes brøndene til fjernelse af ubundet protein, hvorefter de inkuberes med et mærket, anti-humant immunoglobulin-antistof (α HuIg). Markøren kan vælges blandt en række forskellige enzymer, herunder peberrodsperoxidase (HRP), β -galactosidase, alkalisk phosphatase og glucoseoxidase. Man lader tilstrækkelig tid forløbe til, at specifik binding kan ske, hvorefter brønden igen vaskes til fjernelse af ikke-bundet konjugat, og substratet for enzymet tilsættes. Farve lades udvikles, og den optiske tæthed af brøndens indhold bestemmes visuelt eller instrumentelt.

For nemheds skyld kan reagenser for ELISA-assays tilvejebringes i form af sæt. Disse sæt kan omfatte mikrotiterplader, hvortil virale proteiner fremstillet ved rekombinantteknikker er preadsorberet, forskellige fortyndingsmidler og puffere, mærkede konjugater til påvisning af specifikt bundne antistoffer og andre signaludviklende reagenser, såsom enzymsubstrater, co-faktorer og chromogener.

På grund af det faktum, at et væsentligt antal AIDS-patienter har en høj grad af immunosuppression og gradvist tabt evnen til at danne højtiter-antistoffer, anvendes der ifølge den foreliggende opfindelse dele af LAV-genomets kapselregion (env-region), hvilke dele koder for et protein, der er immunologisk reaktivt med

antistoffer for LAV. Tilstedeværelsen af antistoffer for LAV's kapselglycoprotein er en bedre indikator for LAV-infektion end forekomsten af antistoffer for andre virale proteiner, idet antistoftiterne for kapselglycoproteinerne formodes at vedblive med at være til stede under sygdommens senere stadier, medens mængden af antistoffer for andre proteiner, såsom kerneproteinet, kan falde til mindre end påviselige niveauer.

En anden anvendelse af rekombinantproteinerne ifølge opfindelsen er som humane vacciner. Rekombinantproteinerne kan renses indgående og formuleres på hensigtsmæssig måde, almindeligvis i koncentrationer på 1 µg til 20 mg pr. kg af værten. Fysiologisk acceptable bærere, såsom sterilt vand, saltvand, pufret saltvand, osv., kan anvendes. Adjuvanter, såsom aluminiumhydroxid kan også anvendes. Vaccinen kan administreres ved intravenøs, subkutan, intramuskulær eller peritoneal injektion. En injektion kan være tilstrækkelig, men oftere foretrækkes flere injektioner med ugers til måneders intervaller.

Alternativt kan man fremstilles vaccinia-virusrekombinanter, som eksprimerer regioner af LAV-genomet. F.eks. kan de konstruerede rekombinanter ifølge opfindelsen inføjes i et plasmid, såsom pMM34 (Mackett, et al., Science 227: 433, 1985), og vaccinia-virushybrider indeholdende det opnåede kimære plasmid, fremstillet ved homolog rekombination. Immunisering med sådanne rekombinantvirusvacciner har vist sig at være effektivt til frembringelse af beskyttende immunitet i dyr overfor hepatitis B virus og vesikulær stomatitis-virus (Smith et al., Nature 311: 578, 1984).

Anvendelsen af en rekombinantproteinvaccine på denne måde eliminerer behovet for at fremstille vacciner ud fra inaktiverede præparater eller avirulente stammer af patogene mikroorganismer.

Den genetiske organisation af LAV, 5'LTR-gag-

pol-Q-env-F-3'-LTR, er enestående blandt retrovirus. I alle andre kendte retrovirus med evne til replikation, overlapper pol- og env-generne. I LAV er de adskilt af en åben læseramme Q (Wain-Hobson et al., Cell 40: 9
5 (1985)).

Den åbne env-læseramme har et muligt initieringssted (methionincodon) ved den ottende triplet og forventes således at kode for et protein med en molekylvægt på 97 kd. Dette stemmer overens med den tilsyneladende molekylvægt (110 kd) af LAV-glycoproteinet på
10 denaturerende polyamidgeler. Der er 32 potentielle N-glycosyleringssteder i env-genet (Asn-x-Ser/Thr). Der er også tre hydrofobe regioner, som er karakteristiske for retrovirale kappeproteiner og svarer til et signalpeptid (som nucleotiderne 5815-5850 koder for), en anden region (7315-7350) og et tranmembransegment (7831-7896). Den anden region efterfølger en Arg/Lys-rig region, som formodes at repræsentere et proteolytisk reaktionssted (Wain-Hobson, se ovenfor).
15

Som bemærket ovenfor, opstår antistoffer for LAV-glycoproteinet (env-genproduktet) tidligt i virusinfektionens forløb, og de vedbliver med at forekomme også under sygdommens senere stadier (Kitchen et al., Nature 312: 367 (1984)). Antistoffer for glycoprotei-
25 nerne er derfor en særligt god indikator for tidligere udsættelse for LAV, hvilket gør glycoproteinerne eller dele deraf særligt anvendelige ved blodscreeningsassays.

En særligt foretrukket del af LAV-genomets env-region er ENV-3. Som vist i fig. 3 spænder ENV-3 over nucleotidsekvensen fra bp 7178 til bp 7698. Som det ses i fig. 7 er følgende underregioner inkluderet i regionen (overstreget i fig. 7): (1) et hydrofobt peptid, som bp 7315 til 7350 koder for; (2) et dodecapeptid indeholdende formodede proteolytiske bearbejdningssteder
35 for spaltning af kapselprecursorproteinet til gp 65 og

gp 43; (3) en i høj grad bevaret region omkring to cysteinrester; (4) en bevaret sekvens ved den 3'-(carboxy-)terminale ende; og (5) en bevaret sekvens ved den 5'-(amino-)terminale ende.

5 Data opnået ved anvendelse af syntetiske peptider, som svarer til de forskellige underregione af ENV-3, viser, at de vigtigste regioner er dem, der omgiver eller ligger nærved cysteinresterne, og dem der omgiver eller ligger nærved den proteolytiske bearbejdningsregion. Syntesen og screeningen af visse af disse
10 peptider er beskrevet i den samtidigt verserende US patentansøgning serie-nr. 728.052, indleveret den 29. april 1985 af Cosand og inkorporeret heri ved henvisning.

15 Desuden er ENV-3 næsten helt frit for potentielle glycosyleringssteder, hvorfor den antigene virkning af rekombinantproteinet med rimelighed kan forventes at have lighed med den antigene virkning af det naturlige protein. Hele sekvensen af env-genet og dets genprodukt er vist i fig. 8, hvori de potentielle glycosyleringssteder er overstreget. I fig. 8 kan det ses, at
20 en stor strækning af ENV-3 er fri for sådanne steder, og at ENV-3 i sammenligning med resten af genet i helhed er påfaldende underglycosyleret.

25 I det følgende eksempel blev en LAV-genomklon, betegnet λ J19, subklonet ind i den bakterielle plasmidvektor, pUC18. Den resulterende underklon, betegnet pBT-1 (tildelt ATCC accessionsnummer 53069), yderligere subklonet til opnåelse af pRS-3, som hovedsagelig indeholdt env-, F- og LTR-regionsekvenser. env-Sekvensen
30 og en del af F-sekvensen blev yderligere subklonet ind i M13mp18, og regionerne af env-sekvensen blev først ind i den trp-E-inducerbare ekspressionsvektor. env-DNA'et blev indføjet i rammen nedstrøms for trp E-genet, hvilket resulterer i ekspressionen af et trp E-envfusionsprotein, når E. coli blev transformeret med
35

dette produkt. De opnåede proteiner blev delvist renset og karakteriseret ved deres reaktivitet i ELISA med sera fra individer, som man vidste var henholdsvis seropositive og seronegative. Fem nyttige produkter, betegnet pENV-1 til pENV-5, blev identificeret.

Det følgende eksempel gives til nærmere belysning af opfindelsen og på ingen måde til begrænsning deraf.

10

Eksempel

A. Fremstilling af trp-env-ekspressionsvektorer

Enhver af en række forskellige bakterielle ekspressionssystemer kan anvendes til eksprimering af fremmede proteiner. trp E-systemet valgtes til ekspression af LAV-env-sekvenser, idet det indeholder en stærk, inducerbar promotor, men dets ekspression kan også undertrykkes, således at fremmede (og potentielt toksiske) proteiner ikke akkumuleres i bakterien i lang tid.

Idet der ikke findes nogen hurtig og bekvem måde at screene og udvælge bakterier transformeret med en vektor indeholdende et fremmed insert (i modsætning til bakterier transformeret med vektoren alene), er det hensigtsmæssigt at subklone den ønskede region af et stort DNA-stykke (såsom λ fag-DNA) ind i en vektor indeholdende et selektionssystem for inserts, inden det overføres til trp E-ekspressionsvektoren. Dette letter screeningen af transformerede bakterier for dem, der indeholder det ønskede insert.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen var derfor først at subklone det meste af LAV-genomets env-region ind i en transfervektor, M13mp18 (fig. 1), i to trin. Derefter blev forskellige fragmenter af denne subklon ligeret ind i hver af tre trp-ekspressionsvektorer (pJH11, pJH12, pJH14), som kun adskilte sig fra hinan-

den ved aflæsningsrammen for restriktionsstederne i polylinkerregionen (se fig. 2). Nogle af de opnåede subkloner (f.eks. pENV-5 og pENV-4) anvendtes som sådanne, men andre krævede yderligere modifikationer (pENV-1, 5 pENV-2 og pENV-3) til opnåelse af det ønskede produkt.

1. Subkloning af LAV-genomet

a. Fremstilling af fag-DNA.

10 Hele LAV-genomet blev tilvejebragt fra Pasteur Instituttet i form af λ fag-partikler indeholdende et 9,2 Kb genom DNA-insert i Hind III-stedet af fagen λ L47.1. Denne klon betegnes λ J19 og er beskrevet i Wain-Hobson et al., Cell 40: 9 (1985). λ J19 fagpartikler 15 blev ført ind i Q359-stammen af E. coli K-12 (genotypen af Q359 er $hsdRK^-$, $hsdMk^+$, $supF$, $\phi 80$, P2) ved fremgangsmåden ifølge Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, s. 64. En enkelt plaque blev 20 opsamlet, og fagen forøget ved pladelysatmetoden (Maniatis, se ovenfor, s. 65). Efter en ni timers inkubation ved 37°C blev pladerne (100 mm i diameter) indeholdende sammenløbende plaques overhældt med 5 ml af 100 mM NaCl/20 mM $MgSO_4$ /50 mM Tris, pH 7,5. Efter inkubation i 12 timer ved 4°C blev væsken opsamlet og 25 ekstraheret to gange med et ligeså stort volumen chloroform.

Til 10 ml af den opnåede vandige fase indeholdende fagpartiklerne sættes 2 ml 0,25 M EDTA/2,5% SDS/ 30 0,5 M Tris, pH 9, og suspensionen blev inkuberet ved 70°C i 15 minutter til nedbrydning af fagen. 2,5 ml 8 M kaliumacetat blev tilsat, og opløsningen blev inkuberet på is i 15 minutter og dernæst centrifugeret i 10 minutter ved 12.000 x g og 4°C til dannelselse af pelletter af proteinet. Supernatanten blev overført til et 35 50 ml polypropylencentrifugerør og ekstraheret med et

ligeså stort volumen phenol (pH 8, ækvilibreret med 1 M Tris, pH 8) ved 20°C. Den vandige fase blev dernæst ekstraheret med et ligeså stort volumen chloroform:iso-amylalkohol (24:1) ved 20°C. Til den vandige fase sættes dernæst 2,5 volumener 95% ethanol til bundfældning af DNA'et. Efter centrifugering blev DNA-pelletten tørret og gensuspenderet i 10 mM Tris-HCl, pH 7,4/1 mM EDTA.

10 b. Subkloning af env-regionen

Ca. 12 µg λJ19-DNA fremstillet i A.1.a ovenfor blev nedbrudt fuldstændig med restriktionsenzymet Sst I (Bethesda Research Labs. Bethesda, MD), som kun klipper i LTR-regionerne af dette isolat af LAV. Blandingen af nedbrydningsprodukterne blev udsat for elektroforese ved 1 V/cm gennem 0,9% agarose i 0,089 M Tris-borat/0,089 M borsyre/1 mM EDTA. Positionen af 9,1 Kb-fragmentet blev bestemt i forhold til molekylvægtsstandarder efter farvning med ethidiumbromid. Båndet blev elektroelueret ind i NA45-papir (Schleicher og Schuell), Keene, NH). DNA'et blev udvundet fra papiret efter instruktionerne givet af producenten.

9,1 Kb Sst I-fragmentet blev ligeret ind i den Sst-I-nedbrudte vektor pUC18 i et forhold på 10 insert molekyler: 1 vektormolekyle. E. coli stamme HB101 blev transformeret med ligeringsblandingen ved CaCl₂-metoden ifølge Maniatis et al. (se ovenfor) og udspreddt på LB-plus ampicillin (20 µg/ml) agarplader.

Enkeltkolonier blev opsamlet og fortyndet i 3 ml LB plus ampicillin-medium og dyrket natten over ved 37°C under konstant omrystning. Plasmid-DNA blev fremstillet ved den alkaliske lysemetode (Maniatis et al., se ovenfor, side 368). Der blev opsamlet en koloni, som indeholdt 9,1 Kb Sst I-insertet i en orientering, således at Eco RI-stedet i polylinkeren var nærmest

5'-enden af LAV-genomet, som bestemt ved restriktionsanalyse af plasmid-DNA'et. Denne subklon blev betegnet pBT-1 (ATCC accessionsnummer 53069) (fig. 1).

Plasmidet pBT-1 blev dernæst nedbrudt med Eco RI, og vektoren, der stadig indeholdt 3' enden af LAV-genomet, blev religeret. Dette tjente til fjernelse af 5'Eco RI-fragmenterne fra plasmidet. HB101-celler blev transformeret med ligeringsblandingen, og en koloni indeholdende insertet, pRS-3, blev identificeret ved restriktionsanalyse af det oprensede plasmid-DNA.

Sekvensen mellem Kpn I stederne ved bp 5889 og bp 8572 [nummerering efter Wain-Hobson et al., Cell 40: 9 (1985)], indeholdende det meste af env-regionen, blev dernæst overført fra pRS-3 til M13mpl8-vektoren. Dette blev gjort til yderligere fjernelse af uvedkommende sekvenser (ikke-env-sekvenser) og desuden til at placere env-sekvenserne i en vektor, som udnytter β -galactosidase i stedet for ampicillin som markøren, der kan udvælges/screenes. Dette var fordelagtigt, idet trp E-ekspressionsvektoren anvender ampicillinresistens som dens markør, der kan udvælges. Overførsel af insert fra en vektor (pUC 18), der koder for ampicillinresistensfaktoren til en anden (trp-ekspressionsvektorer pJH 11, 12 og 14) ville gøre screening for det ønskede insert og vektor vanskeligere. M13-fag blev screenet ved anvendelse af det chromogene stof 5-brom-4-chlor-3-indolyl- β galactosid (Sigma Chemical Co.) til bedømmelse af inaktivering af β -galactosidase på grund af indfø- jelse af env-sekvensen. Disse fagholdige inserts blev screenet for orienteringen af insertet i forhold til restriktionsstederne i polylinkerregionen. DNA blev isoleret fra rekombinanter (mpSW16 og mpSW19) for hver orientering (fig. 1).

2. Indføjelser af env-sekvensen i trp-vektorer

Ekspressionsvektorerne indeholdt E. coli trp-operon-promotoren, operator og trp E-gen indføjet i
5 pBR322 (fig. 2). trp E-genet var afskåret ved dets
5'-most Bgl II steder ved indføjelser af en polylinker-
sekvens (Konopka et al., J. Virol 51: 223 (1984)). De
forskellige trp-vektorer (pJH 11, pJH 12 og pJH 14) ad-
10 skilte sig fra hinanden ved restriktionsstedernes læse-
ramme i polylinkerregionen. Indføjelser af en åben læ-
seramme i vedkommende vektor resulterer i dannelse af
et fusionsprotein med trp E-sekvenser ved den aminoter-
minale ende (Spindler et al., J. Virol 49: 132 (1984)).

Man valgte fem overlappende LAV-eng-regioner til
15 ekspression (fig. 3). Valget var bestemt af grænsen på
insertstørrelsen i disse vektorer (Konopka et al., J. Virol 51: 223 (1984)) og af placeringen af hydrofobe
sekvenser, som kan være skadelige for ekspression.

pENV-5 (ATCC accessionsnummer 53074) blev frem-
20 stillet ved ligering af env-regionen, der går fra
mpSW19's Bam HI-sted i polylinkerregionen til env Hind
III-stedet (bp nr. 7698), til pJH 12 restringeret med
Bam HI og Hind III (New England Biolabs) (fig. 4). Li-
gater blev transformeret ind i E. coli HB101, der havde
25 været udsat for CaCl₂-chok, og bakterierne blev podet
på plader i tilstedeværelse af ampicillin (Sigma) i en
mængde på 100 µg/ml og tryptophan (Sigma) i en mængde
på 20 µg/ml. Tryptophanet blev tilsat til undertryk-
kelse af ekspression af det fremmede protein, hvis ak-
30 kumulering kunne være skadeligt for bakterierne. Ampicillinresistente kolonier blev screenet ved hjælp af
minilysater for tilstedeværelsen af rekombinantplasmider,
indeholdende env-fragmentet.

pENV-1 (ATCC accessionsnummer 53070) opnåedes ud
35 fra pENV-5 ved udeladelse af sekvensen mellem to Bgl
II-steder (bp 6598 og bp 7178) (fig. 4). Denne udela-

delse formindskede størrelsen af den åbne læseramme ved indførelse af et stopcodon kort efter Bgl II-stedet.

pENV-2 (ATCC accessionsnummer 53071) blev fremstillet ved indføjelse af fragmentet mellem to Bgl II-steder (bp 6598 og bp 7178) i pJH 14 restringeret med Bam H1 (fig. 5) (Bgl II og Bam H1 overlap er kompatible). E. coli HB101 blev transformeret med ligeringsprodukterne og de ampicillinresistente kolonier blev screenet ved restriktionsanalyse for tilstedeværelsen og orienteringen af env-inserts i pJH 14.

pENV-3 (ATCC accessionsnummer 53072) krævede ligering af env-regionen mellem mpSW19's Bam H1-sted (i polylinkeren) og Hind III-sted (bp 7698) til pJH 11 restringeret med Bam H1 og Hind III (fig. 5). E. coli HB101 blev transformeret med ligeringsproduktet, og ampicillinresistente kolonier blev screenet ved hjælp af minilysater. DNA fra en passende koloni blev isoleret, spaltet med Bam H1 og Bgl II (New England Biolabs) og religeret. Dette DNA blev anvendt til transformation af E. coli HB101. Den opnåede ampicillinresistente bakterie blev screenet ved restriktionsanalyse for rekombinantplasmider, hvori fragmentet fra Bam H1 til Bgl II var udeladt (fig. 5). Udeladelse af dette fragment bragte env-sekvenserne mellem Bgl II-stedet (bp 7178) og Hind III-stedet (bp 7698) ind i den korrekte læseramme.

pENV-4 (ATCC accessionsnummer 53073) blev fremstillet ved ligering af Hind III-fragmentet fra mpSW16 ind i pJH 12, som var behandlet med Hind III og intestinal, alkalisk phosphatase fra kalve (Boehringer Mannheim) (fig. 6). Rekombinantplasmider blev identificeret ved transformation af E. coli HB101 med ligatblandingen og dernæst screening ved restriktionsanalyse af minilysater.

B. Proteinekspression

1. Transformation af E. coli med trp-env-plasmiderne

Hver af rekombinant trp-env-ekspressionsplasmiderne blev overført fra E. coli HB101 til E. coli C600, idet den sidstnævnte er en potentielt bedre vært for proteindannelse. Overførslen omfattede transformation af C600 udsat for CaCl_2 -chok med superfoldet DNA fra minilysater af HB101. Bakterierne blev podet på plader i tilstedeværelse af ampicillin og tryptophan som beskrevet (Konopka et al., J. Virol. 51: 223 (1984)). Medikamentresistente kolonier blev screenet ved hjælp af minilysater til bekræftelse af forekomsten af det rette plasmid.

2. Ekspression af trp-env-proteiner

Dyrking og induktion af E. coli C600 transformeret med trp-ekspressionsvektorerne var, som beskrevet, (Spindler et al., J. Virol. 49: 132 (1984); Konopka et al., J. Virol. 51: 223 (1984)). Kort beskrevet blev minimalt medium indeholdende 20 $\mu\text{g/ml}$ tryptophan og 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin inoculeret med transformerede bakterier fra glycerolstamkulturer. Kulturerne blev dyrket under luftning ved 37°C natten over. Kulturerne, der havde stået natten over, blev dernæst inoculeret i forhold på 1:100 i frisk minimalmedium indeholdende 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin men ingen tryptophan. Disse kulturer blev dyrket under luftning i 2-3 timer (indtil den tidlige logfase) ved 37°C. Induceren, 3- β -indolacrylsyre (Sigma) tilsattes til en slutkoncentration på 20 $\mu\text{g/ml}$ fra frisk fremstillede stamopløsninger med en koncentration på 20 $\mu\text{g/ml}$ i 95%'s ethanol.

Inducerede kulturer blev dyrket ved 37°C under luftning i 4-5 timer og dernæst bragt på pelletform og eventuelt frosset. Proteinudbytter fra pENV-1, pENV-2

og pENV-3 var typisk mellem 10-30 mg/liter, medens udbytterne fra pENV-4 og pENV-5 typisk var mindre end 1 mg/liter.

5 C. Isolation og rensning af trp-env-proteinerne

Fusionsproteiner blev delvist oprenset fra cel-
lepelletter som beskrevet (Konopka et al., J. Virol.
51: 223 (1984)). Kort beskrevet blev bakterier resu-
10 spenderet i 100 ml 50 mM Tris, pH 7,5/0,5 mM EDTA/150
mM NaCl (TNE) pr. liter induceret kultur. Lysozym
(Sigma) blev tilsat til en slutkoncentration på 1 mg/
ml. Efter 15 minutter ved 0°C tilsattes NP40 til blan-
dingen til en slutkoncentration på 0,2% i 10 minutter
15 ved 0°C. 1-2 mg DNase (Sigma) tilsattes dernæst med 150
ml DNase-puffer (150 mM NaCl/12 mM MgCl₂). Reaktions-
blandingerne blev inkuberet i en time ved 0°C under
hyppig omrøring. Uopløselige proteiner blev dernæst
bragt på pelletform ved centrifugering i 15 minutter
20 ved 8000 x g og 0°C. Pelletterne blev vasket to gange
i TNE og derefter analyseret for tilstedeværelsen af
uopløselige proteiner ved denatureringspolyacrylamid-
gelelektroforese. Proteiner blev visualiseret ved farv-
ning med Coomassie Brilliant blå R.

25 Pelletten indeholdende det uopløselige materiale
fra 1 liter bakterier blev opløseliggjort i 6 ml af 6 M
guanidiniumchlorid/0,1 M Tris-HCl, pH 7,8. Til denne
opløsning sattes ca. 60 mg fast dithiothreitol (DTT),
og man lod reduktionen forløbe i 30 minutter ved 37°C.

30 Det opløseliggjorte reducerede protein blev ud-
sat for gelpermeationschromatografi på en 9,4 mm x 25
cm GF-250 Zorbax-kolonne (Du Pont, Wilmington, DE). En
delmængde på 100 µl af proteinopløsningen blev indført
i kolonnen og elueret med 6 M guanidiniumchlorid med en
35 strømningshastighed på 0,5 ml/min. Den optiske tæthed
ved 280 nm blev målt, og fraktioner blev opsamlet med

30 sekunders intervaller. Fraktion nr. 32, dvs. fraktionen elueret mellem 7,75 og 8,00 ml, blev anvendt til de følgende assays. Note: Inkorporering af DTT vil resultere i dannelse af uopløselige metalsulfider, når
5 dårligere kvaliteter af guanidiumchlorid anvendes.

trp-env-Fusionsproteinerne er også blevet oprenset som følger:

Fusionsproteinerne blev delvist oprenset fra cellepelletter som en uopløselig pellet (som beskrevet ovenfor). Pelleten indeholdende det uopløselige materiale fra 4 liter bakteriekultur blev opløseliggjort i
10 4 ml af 6 M guanidiumchlorid/0,1 M Tris-HCl, pH 7,8. Til denne opløsning sattes ca. 100 mg fast dithiothreitol (DTT), man lod reduktionen forløbe i en time ved
15 37°C.

Det opløseliggjorte, reducerede protein blev udsat for gelpermeationschromatografi på en 2,6 x 87 cm kolonne af Fractogel TSK. HW-50(S) (MCB Manufacturing Chemists, Gibbstown, NJ). De 4 ml af den reducerede
20 proteinopløsning blev pumpet til kolonnen og elueret med 2×10^{-4} M DTT/ 2×10^{-3} ethylendiamintetraeddikesyre (EDTA)/6 M guanidiniumchlorid (American Research Products Co., South Euclid, OH). Kolonnen blev drevet ved en strømningshastighed på 0,5 ml/min., den optiske
25 tæthed ved 280 nm blev målt, og fraktioner opsamledes med 10 minutters intervaller. Fraktionerne nr. 34 og 35, de to fraktioner fra midten af UV-absorptionstoppen, blev anvendt i de følgende assays.

30 D. Immunologisk reaktivitet af trp-env-proteiner

1. Analyse ved Western blots

Delmængder af de uopløselige proteinpræparater eksprimeret af pENV-1, pENV-2, pENV-3, pENV-4 og pENV-5
35 blev opløseliggjort i 2%'s natriumdodecylsulfat/100 mM Tris, pH 6,8/20% glycerol/1,5 M β -mercaptoethanol og

udsat for elektroforese på denaturerende polyacrylamid-geler. Proteinerne blev elektrooverført til nitrocel-lulose (BA85, Schleicher og Schuell, Keene, NH) og fil-trene blokeret med 5%'s bovint serumalbumin (Sigma).
5 Filtrene blev dernæst sonderet med E. coli-adsorberet humant sera opsamlet fra AIDS-patienter. Filtrene blev fremkaldt med HRP-konjugeret gede- α HuIg. De samlede blodsera reagerede med alle fem trp-env-fusionsprotei-ner, men ikke med trp E-protein alene.

10

2. Analyse ved ELISA

Uopløselige proteinpræparater af pENV-1, pENV-2, pENV-3, pENV-5 og trp E blev opløseliggjort i 3 M gua-nidiniumchlorid. Uopløseligt materiale blev fjernet
15 ved centrifugering ved 15.000 x g i 5 minutter. Kon-centrationerne af opløseliggjorte proteiner blev be-stemt ved fremgangsmåden ifølge Bradford (Analytical Biochemistry 72: 248 (1976)). Proteinerne blev fortyndet i 0,05 M carbonat/hydrogencarbonatpuffer (pH 9,6)
20 til en slutkoncentration på 1-2 μ g/ml. Delmængder af 50 μ l blev fyldt i hver mikrotiterbrønd og inkuberet ved 4°C natten over. Pladerne blev dernæst blokeret med BLOTTO (5 vægt/vol% fedtfri tørmælk/0,01%, thime-rosol/0,01%, antiskummiddel A i 0,01 M natriumphosphat,
25 pH 7,2/0,15 M natriumchlorid) i 1 time ved 37°C. Sam-menhældte seropositive sera, sera fra homoseksuelle mænd eller LASpatienter og sera fra raske heteroseksuelle blev fortyndet i forholdet 1:100 med en 1:1 blan-
30 ding af BLOTTO og PBS (0,01 M natriumphosphat, pH 7,3/0,15 M NaCl), og 50 μ l fortyndet serum tilsattes pr. brønd i 1 time ved 37°C. Serummet blev fjernet, og pladerne blev vasket tre gange i vaskepuffer (0,15 M NaCl/0,05 væg/vol% Tween 20) inden tilsætning af 100 μ l
35 gede-antihumant IgG/peberrodsperoxidasekonjugat (for-tyndet 1:10.000 i 50 mM NaCitrat/0,05% Tween 20/1% var-

meinaktiveret normalt gedeserum, opnået fra Antibodies, Ind,m Davis, CA) i 1 time ved 37°C. Kongugatet blev fjernet, og pladerne vasket tre gange med 0,15 M NaCl/0,05 væg/vol% Tween 20. ELISATesten blev frem-

5 kaldt ved tilsætning af 100 µl/brønd substratopløsning (10 mg o-phenylendiamin i 50 ml 0,05 M natriumcitrat, pH 7,0) i 30 minutter ved stuetemperatur. Reaktionen blev standset med 100 µl/brønd af 3N H₂SO₄, og den optiske tæthed ved 490 nm blev bestemt ved hjælp af et

10 automatiseret ELISA-aflæsningsapparat. Proteinerne fremstillet af pENV-1, pENV-2, pENV-3 og pENV-5 fandtes alle at reagere med sera, som man vidste var seropositive.

Yderligere screening af proteiner eksprimeret af

15 pENV-1, pENV-3 og pENV-5 udførtes ved anvendelse af materialet fra de guanidiumchlorid-opløseliggjorte pelletter beskrevet ovenfor (det pENV-1 eksprimerede protein blev renset yderligere ved gelpermeationschromatografi som beskrevet ovenfor) overfor en række på 31 humane serumprøver. Den række omfattede otte sera fra raske heteroseksuelle (defineret som negative ved en

20 helvirus-ELISA), to samlinger af serum fra AIDS-patienter og 21 sera fra individer med diagnostiseret LAS (lymfadenopatia-syndrom). Sera fra LAS-individer blev

25 bestemt som seropositive ved en helvirus-ELISA. Tolv blev yderligere bestemt ved Western blot-analyse. Resultaterne er vist i Tabel 1. Disse resultater viser, at sera fra AIDS- eller LAS-patienter var mere reaktivt med proteiner, som pENV-1, pENV-3 og pENV-5 koder for,

30 end sera fra normale personer. Denne fremstilling viser, at trp-env-fusionsproteiner kan anvendes til screening for tilstedeværelsen af sera, der reagerer med det AIDS-forårsagende virus, LAV.

Tabel 1

Sammenligning af ENV1, ENV3 og ENV5 med et hel-virus-lysats ved en Elisa-assay til påvisning af antistoffer for LAV.

5	Serum nr.	Diagnose	Hel-virus-lysats ¹	ELISA ENV1	ENV3	ENV5	Bestemt som sero-positiv ²
10	501	Positiv kontrol (sammenhældte sera)	1,109	1,744	0,744	1,685	ja
	Y-1 CDC	Positiv kontrol (sammenhældte sera)	2,000	1,564	0,854	1,499	n.d. ⁴
15	120	LAS ³ og/eller homoseksuel	1,540	1,650	1,086	1,371	ja
	121	LAS og/eller homoseksuel	1,483	2,207	1,083	1,233	ja
20	122	LAS og/eller homoseksuel	1,283	1,318	0,752	1,465	ja
	124	LAS og/eller homoseksuel	1,189	2,068	1,158	1,316	ja
25	125	LAS og/eller homoseksuel	1,232	2,233	1,255	1,802	ja
	126	LAS og/eller homoseksuel	1,233	0,878	0,689	0,816	ja
30	127	LAS og/eller homoseksuel	1,046	1,398	0,899	1,495	ja
	128	LAS og/eller homoseksuel	1,284	1,542	0,746	1,189	ja
35							

Tabel 1 (fortsat)

Sammenligning af ENV1, ENV3 og ENV5 med et hel-virus-lysats ved en Elisa-assay til påvisning af antistoffer for LAV.

5 Serum nr.	Diagnose	Hel-virus-lysats ¹	ENV1	ENV3	ENV5	Bestemt som sero-positiv ²
129	LAS og/eller homoseksuel	1,081	0,719	0,484	0,944	ja
10 130	LAS og/eller homoseksuel	0,912	1,541	1,000	1,547	ja
131	LAS og/eller homoseksuel	1,220	1,208	0,794	1,120	ja
15 132	LAS og/eller homoseksuel	1,237	1,245	0,735	1,127	ja
133	LAS og/eller homoseksuel	1,250	1,513	0,881	1,472	ja
20 134	LAS og/eller homoseksuel	1,050	1,684	0,800	1,660	ja
135	LAS og/eller homoseksuel	1,310	0,705	0,516	1,005	ja
25 138	LAS og/eller homoseksuel	1,302	0,710	0,730	0,934	ja
30 153	LAS og/eller homoseksuel	2,000	1,444	0,830	1,369	ja
154	LAS og/eller homoseksuel	1,41	0,815	0,662	0,959	ja
35						

Tabel 1 (fortsat)

Sammenligning af ENV1, ENV3 og ENV5 med et hel-virus-lysats ved en Elisa-assay til påvisning af antistoffer for LAV.

5	Serum nr.	Diagnose	Hel-virus-lysats ¹	ENV1	ENV3	ENV5	Bestemt som sero-positiv ²
10	155	LAS og/eller homoseksuel	1,069	1,824	1,199	1,644	ja
	157	LAS og/eller homoseksuel	1,349	1,679	1,098	1,433	ja
	666	ukendt	2,000	1,737	1,172	1,683	ja
15	633	Rask heteroseksuel	0,222	0,089	0,113	0,135	ikke sero-positiv
	637	Rask heteroseksuel	0,097	0,067	0,065	0,183	ikke sero-positiv
20	639	Rask heteroseksuel	0,123	0,073	0,045	0,186	ikke sero-positiv
	641	Rask heteroseksuel	0,199	0,100	0,075	0,236	ikke sero-positiv
25	667	Rask heteroseksuel	0,095	0,208	0,113	0,450	n.d.
	1890	Rask heteroseksuel	n.d.	0,093	0,082	0,311	n.d.
	1891	Rask heteroseksuel	n.d.	0,164	0,086	0,411	n.d.
30	1892	Rask heteroseksuel	n.d.	0,055	0,045	0,169	n.d.

¹ Viruslysatsen blev fremstillet ved bundfældning af supernatanten af inficerede cellekulturer med 10% polyethylenglycol (PEG 6000), og dernæst sammenslutning to gange til ligevægt i en 20-60% saccharosegradient. De forenede virus med en densitet på 1,16 blev fjernet, og viralte partikler blev yderligere koncentreret ved ultracentrifugering og derefter lyseret i RIPA-puffer (beskrevet i fodnote ²) indeholdende 0,5% natriumdodecylsulfat, og til sidst anbragt i brønde af mikrotiter-testplader.

² Radiomærkede LAV-antigener blev opløst i RIPA-puffer (Gilead et al., Nature 264: 263 (1976)) og derefter omsat med humant serum. De opnåede immunkomplekser blev skilt fra ved binding til en Staphylococcus aureus adsorbent (Kessler, J. Immunology 115: 1617 (1975)), efterfulgt af flere vaskninger. Immunudfældede antigener blev analyseret ved SDS-polyacrylamid-gelelektroforese (Laemmli, Nature 227: 680, (1970)), efterfulgt af fluorografi. Forekomsten af enten et p25 eller gp43 bånd blev undersøgt nødvendigt og tilstrækkeligt til bekræftelse af om en prøve var seropositiv.

³ LAS = lymfadenopatia-syndrom.

⁴ n.d. = ikke udført.

25 3. Fluorescens-objektglastest til påvisning af serumantistof for LAV.

Opløselige proteiner fremstillet som beskrevet i det foregående konjugeres til latexkugler, og protein/kuglepræparatet ethanolfikseres på mikroskopobjektglas. En delmængde af serum fra en patient inkuberes med protein/kuglerne på et objektglas. Objektglassene vaskes, og FITC-mærket anti-humant immunoglobulin i Evans blå modfarve tilsættes. Objektglassene vaskes, og fiksermedium og dækglas anbringes på hver.

Alternativt placeres protein/kuglepræparatet i

testrøret til inkubation med serum fra patienter. Rørene centrifugeres og vaskes, og FITC-mærket anti-humant immunoglobulin i Evand blå modfarve tilsættes. Rørene centrifugeres, og supernatanten suges fra. En
5 delmængde af kuglerne placeres på et mikroskopobjektglas og fikseres med ethanol, og dækglass anbringes.

Alle objektglassene undersøges ved fluorescensmikroskopi. Hvis testserummet er antistofpositivt, ses kuglerne som fluorescerende grønne sfærer, hvis test-
10 serummet er antistofnegativ ses kuglerne som røde sfærer.

P A T E N T K R A V

1. DNA-Sekvens, k e n d e t e g n e t ved, at den indeholder en del af LAV-genomets env-region, især én eller flere sekvenser, der i det væsentlige omfatter
5 pENV-1, pENV-2, pENV-3, pENV-4 eller pENV-5, hvilken del koder for et protein, som er immunologisk reaktivt med antistoffer for LAV.

2. DNA-Sekvens ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den koder for ENV-3.

10 3. Rekombinantplasmid, der er i stand til at replikere i bakterieværtsceller, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter prokaryotiske transcriptions- og translationssignaler for ekspression, efterfulgt i læsefasen af en DNA-sekvens ifølge krav 1 eller 2, hvilken
15 sekvens koder for et protein, der er immunologisk reaktivt med antistoffer for LAV.

4. Rekombinantplasmid ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at signalerne opnås fra trp-operonet.

5. Bakteriecelle, k e n d e t e g n e t ved, at den er transformeret med et rekombinantplasmid ifølge
20 krav 3 eller 4.

6. Transformeret celle ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at bakteriecellen er E. coli.

7. Fremgangsmåde til fremstilling af proteiner, som er immunologisk reaktive med antistoffer for LAV, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter, at man:

i en bakterieværtscelle indfører et rekombinantplasmid ifølge krav 3 eller 4.

30 dyrker denne bakterieværtscelle i et passende medium, og

isolere proteinproduktet af denne sekvens fra bakterieværtscellen.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter at man efter isolation af proteinproduktet renser det ved gelpermeations-
35 chromatografi.

9. Anvendelse af protein, fremstillet ifølge krav 7 eller 8 ved en assay til bestemmelse af forekomsten af antistoffer for LAV i en biologisk væske.

10. Anvendelse ifølge krav 9, k e n d e t e g -
5 n e t ved, at et protein fremstillet ifølge krav 7 eller 8 bringes i kontakt med den biologiske væske, og den specifikke binding mellem proteinet og antistoffet for LAV detekteres.

11. Anvendelse af protein, fremstillet ifølge
10 krav 7 eller 8 ved en assay til bestemmelse af forekomsten af LAV-antigen i en biologisk væske.

12. Anvendelse ifølge krav 11, k e n d e t e g -
n e t ved, at den biologiske væske blandes med proteiner fremstillet ifølge krav 7 eller 8, til dannelselse af en
15 blanding, hvori proteinerne er mærkede, hvilken blanding bringes i kontakt med antistoffer som reagerer med et protein fremstillet ifølge krav 7 eller 8, og den specifikke binding mellem de mærkede proteiner og antistofferne detektes, og forekomsten af LAV-antigen bestemmes på
20 baggrund heraf.

13. Anvendelse af protein, fremstillet ifølge krav 7 eller 8 ved fremstilling af antistoffer for LAV.

14. Anvendelse ifølge krav 13, k e n d e t e g -
n e t ved, at et dyr immuniseres med et protein fremstillet ifølge krav 7 eller 8.
25

15. Protein, fremstillet ifølge krav 7 eller 8, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter ENV-1, ENV-2, ENV-3, ENV-4 eller ENV-5.

16. Protein, fremstillet ifølge krav 7 eller 8,
30 k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter ENV-3.

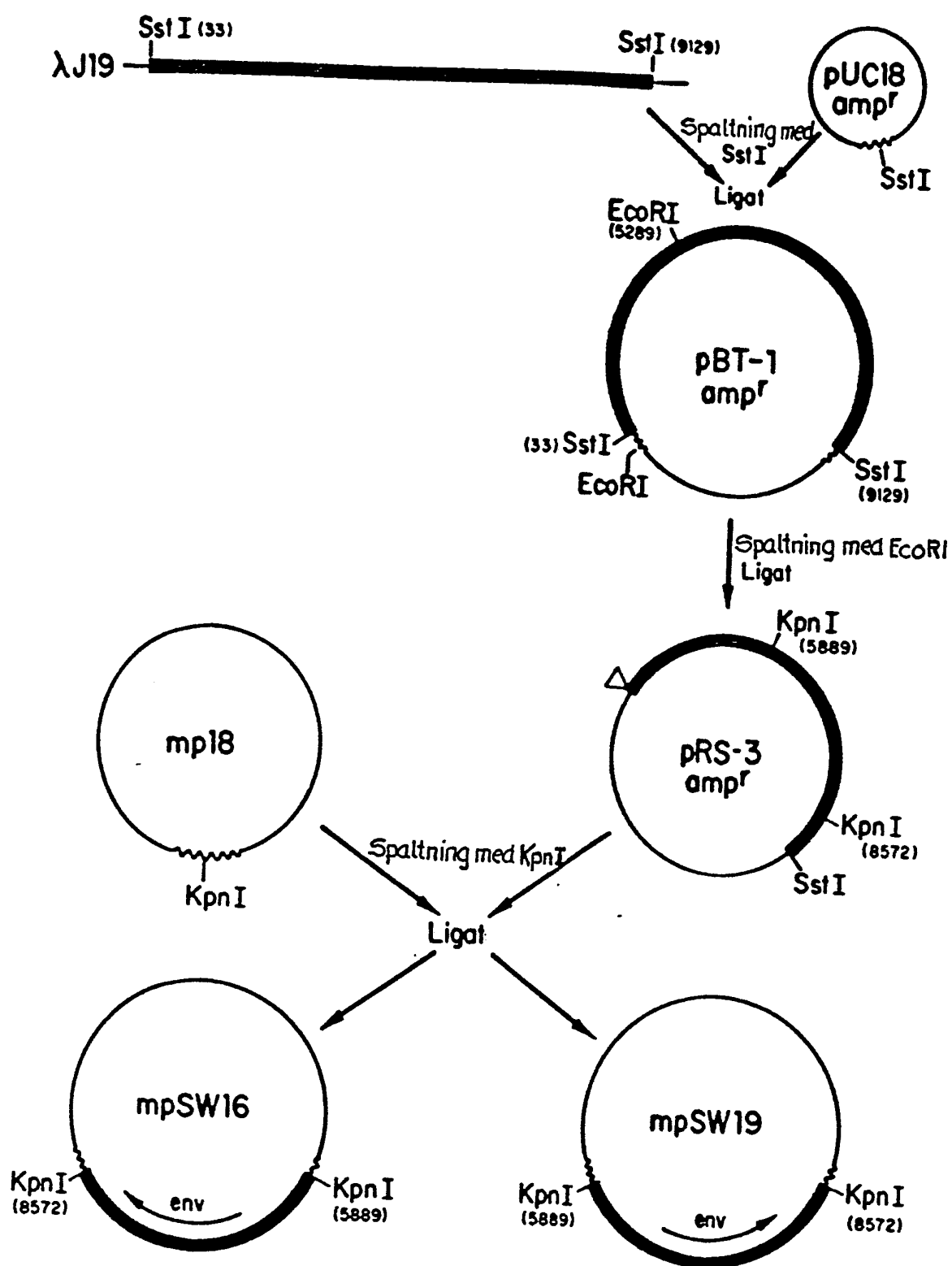
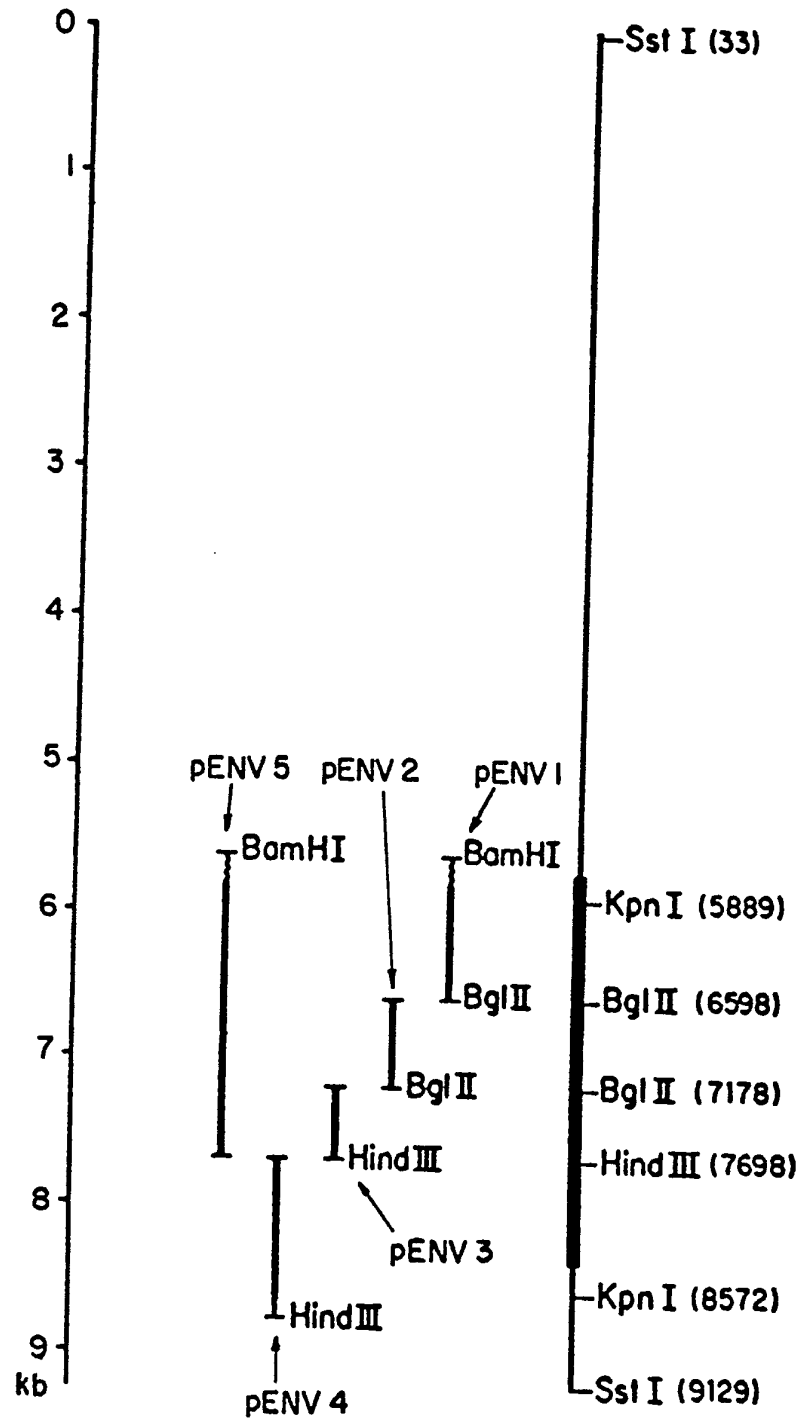


FIG. 1

FIG. 3



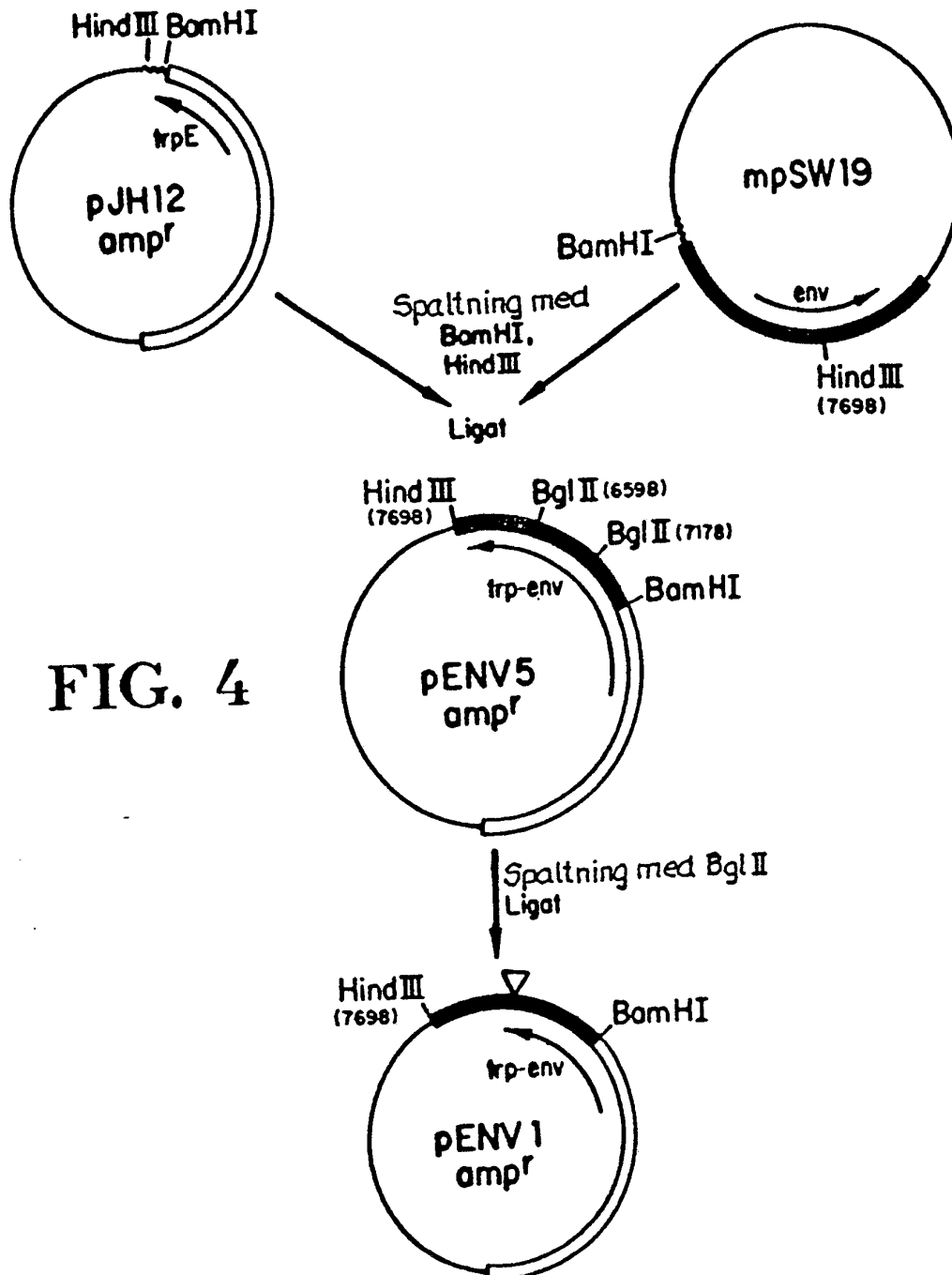


FIG. 4

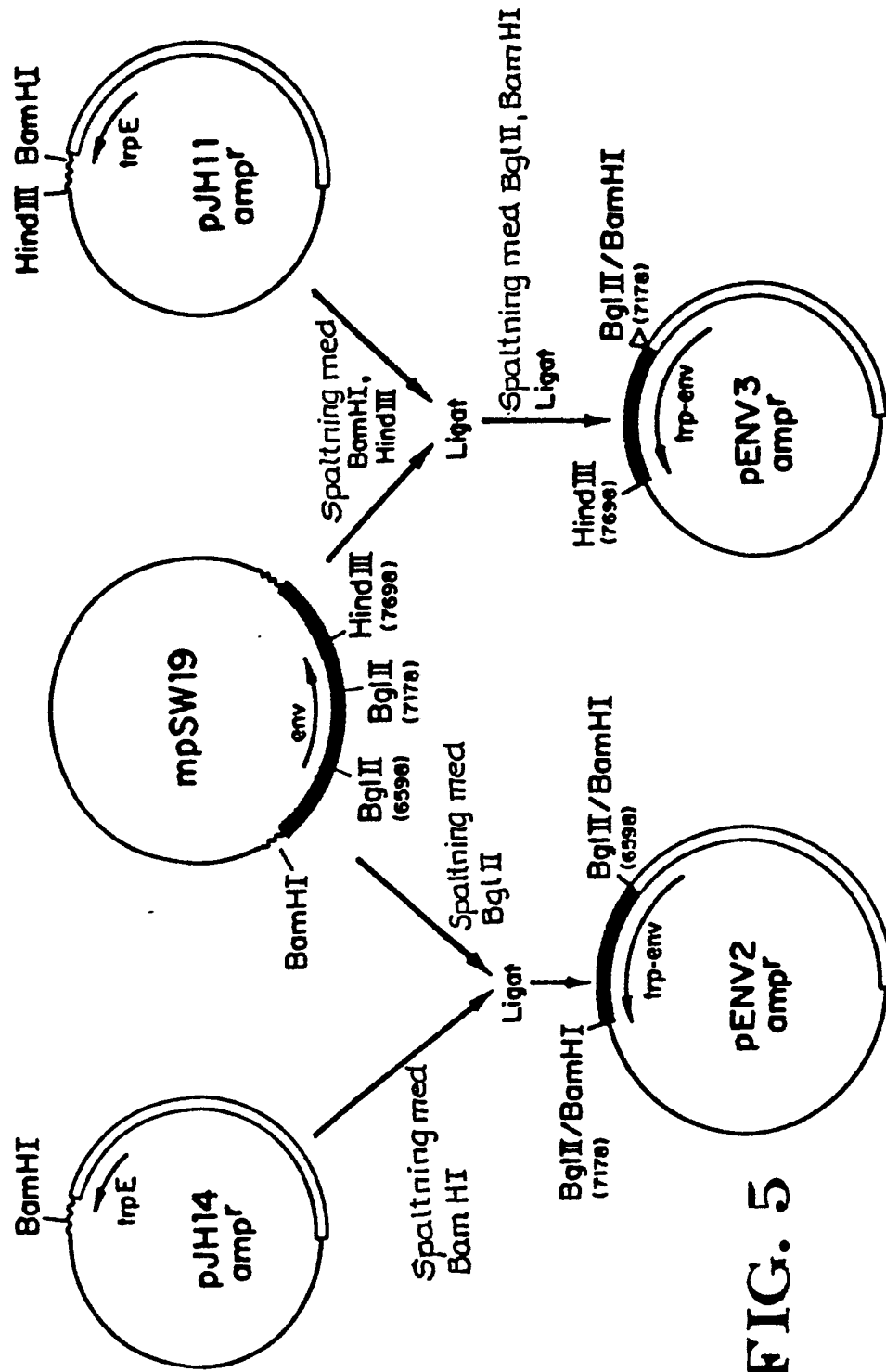
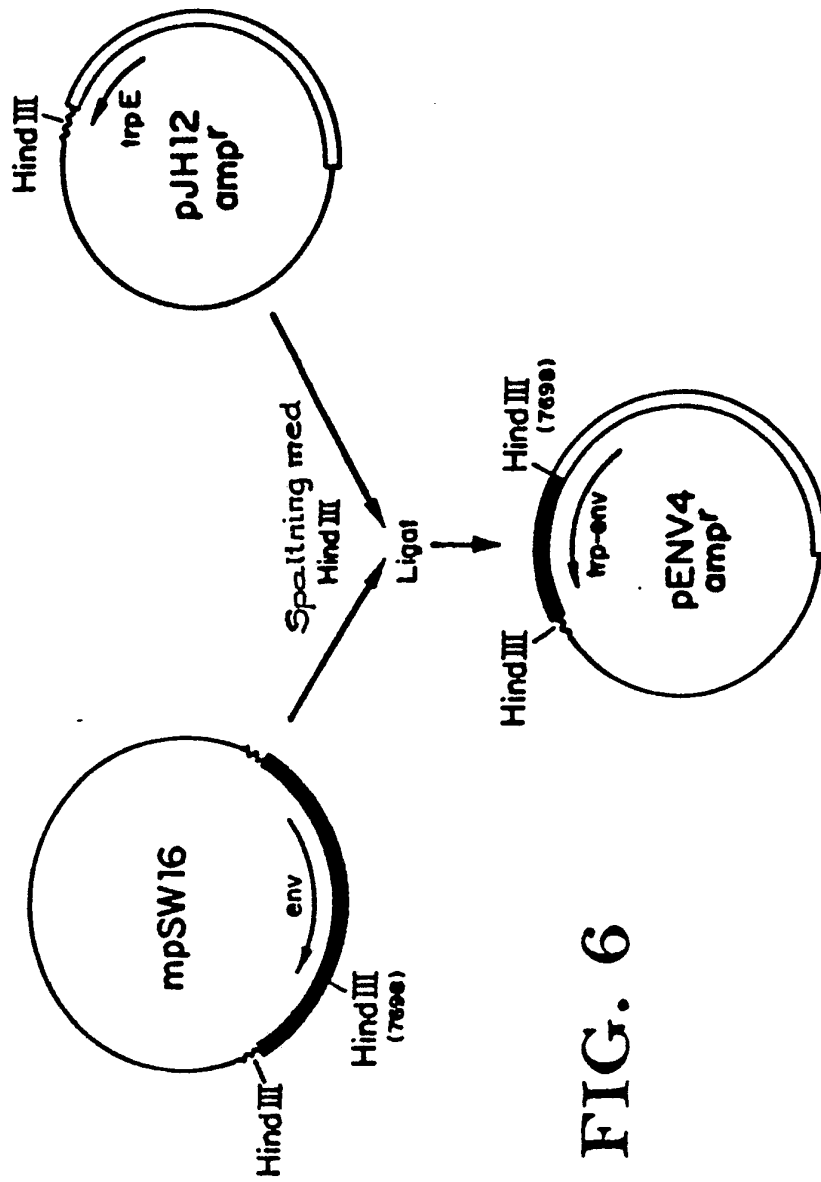


FIG. 5

**FIG. 6**

ENV-3

FIG. 7

 #5
 Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu
30
 Leu Try Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro
40
 #2
 Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly
50
 #1
 Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met
60
70
 Gly Ala Gly Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser
80
90
 Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln
100
 Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala
110
120
 Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly
130
 #3
 Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp
140
150
 Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met
160
170
 #4
 Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr

FIG.8

Lys Glu Gln Lys Thr Val Ala Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His
 AAA GAG CAG AAG ACA GTG GCA ATG AGA GTG AAG GAG AAA TAT CAG CAC

Leu Trp Arg Trp Gly Trp Lys Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Ile Leu
 TTG TGG AGA TGG GGG TGG AAA TGG GGC ACC ATG CTC CTT GGG ATA TTG
 5800

Met Ile Cys Ser Ala Thr Glu Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly
 ATG ATC TGT AGT GCT ACA GAA AAA TTG TGG GTC ACA GTC TAT TAT GGG

Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp
 GTA CCT GTG TGG AAG GAA GCA ACC ACC ACT CTA TTT TGT GCA TCA GAT
 5900

Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala
 GCT AAA GCA TAT GAT ACA GAG GTA CAT AAT GTT TGG GCC ACA CAT GCC

Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Val Val Leu Val Asn Val
 TGT GTA CCC ACA GAC CCC AAC CCA CAA GAA GTA GTA TTG GTA AAT GTG
 6000

Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asp Met Val Glu Gln Met His
 ACA GAA AAT TTT AAC ATG TGG AAA AAT GAC ATG GTA GAA CAG ATG CAT

Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys
 GAG GAT ATA ATC AGT TTA TGG GAT CAA AGC CTA AAG CCA TGT GTA AAA
 6100

Leu Thr Pro Leu Cys Val Ser Leu Lys Cys Thr Asp Leu Gly Asn Ala
 TTA ACC CCA CTC TGT GTT AGT TTA AAG TGC ACT GAT TTG GGG AAT GCT

Thr Asn Thr Asn Ser Ser Asn Thr Asn Ser Ser Ser Gly Glu Met Met
ACT AAT ACC AAT AGT AGT AAT ACC AAT AGT AGT AGC GGG GAA ATG ATG
6200

Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Ser Thr Ser
ATG GAG AAA GGA GAG ATA AAA AAC TGC TCT TTC AAT ATC AGC ACA AGC

Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Phe Phe Tyr Lys Leu Asp
ATA AGA GGT AAG GTG CAG AAA GAA TAT GCA TTT TTT TAT AAA CTT GAT

6300

Ile Ile Pro Ile Asp Asn Asp Thr Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ser Cys
ATA ATA CCA ATA GAT AAT GAT ACT ACC AGC TAT ACG TTG ACA AGT TGT

Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro
AAC ACC TCA GTC ATT ACA CAG GCC TGT CCA AAG GTA TCC TTT GAG CCA
6400

Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys
ATT CCC ATA CAT TAT TGT GCC CCG GCT GGT TTT GCG ATT CTA AAA TGT

Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr
AAT AAT AAG ACG TTC AAT GGA ACA GGA CCA TGT ACA AAT GTC AGC ACA
6500

Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu
GTA CAA TGT ACA CAT GGA ATT AGG CCA GTA GTA TCA ACT CAA CTG CTG

Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Ala Asn
TTG AAT GGC AGT CTA GCA GAA GAA GAG GTA GTA ATT AGA TCT GCC AAT
6600

Phe Thr Asp Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Gln Ser Val
TTC ACA GAC AAT GCT AAA ACC ATA ATA GTA CAG CTG AAC CAA TCT GTA

Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg
GAA ATT AAT TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT ATC CGT
6700

Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile Gly
ATC CAG AGG GGA CCA GGG AGA GCA TTT GTT ACA ATA GGA AAA ATA GGA

Asn Met Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Ala
AAT ATG AGA CAA GCA CAT TGT AAC ATT AGT AGA GCA AAA TGG AAT GCC
6800

Thr Leu Lys Gln Ile Ala Ser Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Asn
ACT TTA AAA CAG ATA GCT AGC AAA TTA AGA GAA CAA TTT GGA AAT AAT

Lys Thr Ile Ile Phe Lys Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val
AAA ACA ATA ATC TTT AAG CAA TCC TCA GGA GGG GAC CCA GAA ATT GTA

Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Ser Thr
ACG CAC AGT TTT AAT TGT GGA GGG GAA TTT TTC TAC TGT AAT TCA ACA
6900

Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Phe Asn Ser Thr Trp Ser Thr Glu Gly
CAA CTG TTT AAT AGT ACT TGG TTT AAT AGT ACT TGG AGT ACT GAA GGG

Ser Asn Asn Thr Glu Gly Ser Asp Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile
TCA AAT AAC ACT GAA GGA AGT GAC ACA ATC ACA CTC CCA TGC AGA ATA
7000

Lys Gln Phe Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
AAA CAA TTT ATA AAC ATG TGG CAG GAA GTA GGA AAA GCA ATG TAT GCC

Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu
CCT CCC ATC AGC GGA CAA ATT AGA TGT TCA TCA AAT ATT ACA GGG CTG
7100

Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn Asn Asn Gly Ser Glu Ile Phe
CTA TTA ACA AGA GAT GGT GGT AAT AAC AAC AAT GGG TCC GAG ATC TTC

Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr
AGA CCT GGA GGA GGA GAT ATG AGG GAC AAT TGG AGA AGT GAA TTA TAT

7200

Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys
AAA TAT AAA GTA GTA AAA ATT GAA CCA TTA GGA GTA GCA CCC ACC AAG

Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly
GCA AAG AGA AGA GTG GTG CAG AGA GAA AAA AGA GCA GTG GGA ATA GGA

7300

Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala
GCT TTG TTC CTT GGG TTC TTG GGA GCA GCA GGA AGC ACT ATG GGC GCA

Arg Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile
CGG TCA ATG ACG CTG ACG GTA CAG GCC AGA CAA TTA TTG TCT GGG ATA

7400

Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His
GTG CAG CAG CAG AAC AAT TTG CTG AGG GCT ATT GAG GCG CAA CAG CAT

Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile
CTG TTG CAA CTC ACA GTC TGG GGC ATC AAG CAG CTG CAG GCA AGA ATC

7500

Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp
CTG GCT GTG GAA AGA TAC CTA AAG GAT CAA CAG CTC CTG GGG ATT TGG

Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala
GGT TGC TCT GGA AAA CTC ATT TGC ACC ACT GCT GTG CCT TGG AAT GCT

7600

Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp
AGT TGG AGT AAT AAA TCT CTG GAA CAG ATT TGG AAT AAC ATG ACC TGG

Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser
ATG GAG TGG GAC AGA GAA ATT AAC AAT TAC ACA AGC TTA ATA CAT TCC

7700

Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu
TTA ATT GAA GAA TCG CAA AAC CAG CAA GAA AAG AAT GAA CAA GAA TTA

Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr
TTG GAA TTA GAT AAA TGG GCA AGT TTG TGG AAT TGG TTT AAC ATA ACA

7800

Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu
AAT TGG CTG TGG TAT ATA AAA ATA TTC ATA ATG ATA GTA GGA GGC TTG

Val Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Ile Val Asn Arg Val
GTA GGT TTA AGA ATA GTT TTT GCT GTA CTT TCT ATA GTG AAT AGA GTT

7900

Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr His Leu Pro Thr Pro
AGG CAG GGA TAT TCA CCA TTA TCG TTT CAG ACC CAC CTC CCA ACC CCG

Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Arg
AGG GGA CCC GAC AGG CCC GAA GGA ATA GAA GAA GAA GGT GGA GAG AGA

8000

Asp Arg Asp Arg Ser Ile Arg Leu Val Asn Gly Ser Leu Ala Leu Ile
GAG AGA GAG AGA TCC ATT CGA TTA GTG AAC GGA TCC TTA GCA CTT ATC

Trp Asp Asp Leu Arg Ser Leu Cys Leu Phe Ser Tyr His Arg Leu Arg
TGG GAC GAT CTG CGG AGC CTG TGC CTC TTC AGC TAC CAC CGC TTG AGA

Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg Ile Val Glu Leu Leu Gly Arg Arg
GAC TTA CTC TTG ATT GTA ACG AGG ATT GTG GAA CTT CTG GGA CGC AGG

8100

Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser
GGG TGG GAA GCC CTC AAA TAT TGG TGG AAT CTC CTA CAG TAT TGG AGT

Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val Ser Leu Leu Asn Ala Thr Ala Ile
CAG GAA CTA AAG AAT AGT GCT GTT AGC TTG CTC AAT GCC ACA GGC ATA
8200

Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala
GCA GTA GCT GAG GGG ACA GAT AGG GTT ATA GAA GTA GTA CAA GGA GCT

Cys Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu
TGT AGA GCT ATT CGC CAC ATA CCT AGA AGA ATA AGA CAG GGC TTG GAA
8300

Arg Ile Leu Leu
AGG ATT TTG CTA TAA