



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **176996**

(13) B

(51) Int Cl⁶ A 61 K 39/12, 39/21, C 12 N 15/48

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	880380	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	28.01.88	søknadsnummer	29.05.87, PCT/US87/01278
(24) Løpedag	29.05.87	(85) Videreføringsdag	28.01.88
(41) Alm. tiggj.	28.01.88	(30) Prioritet	30.05.86, US, 868585
(44) Utlegningsdato	27.03.95		

(71) Patentsøker Cambridge Bioscience Corp, 365 Plantation Street, Worcester, MA 01605, US
(72) Oppfinner Gerald Beltz, Lexington, MA, US
Dante J. Marciani, Hopkinton, MA, US
Chung-Ho Hung, Milford, MA, US
Charlotte A. Kensil, Milford, MA, US
(74) Fullmektig Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse Fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for beskyttelse av felin leukemivirus (FeLV)**

(56) **Anførte publikasjoner** EP A2-A3 156299
EP A2-A3 173997
US 4406885, US 4264587, WO A1 85/02625
-Journal of Virology, vol.46, juni 1983, s.871-
-Journal of Virology, vol.49, feb. 1984, s.629-
-Journal of Virology, vol.49, feb. 1984, s.452-
-Proc. Natl. Acad. Sci, vol.81, juni 1984, s.3675

(57) **Sammendrag**

Oppfinnelsen vedrører antigene preparater som kan benyttes for å indusere fremstilling av antistoffer i en katt som vil bindes til epitoper på katte-leukemivirus. Immunogene preparater og metoder for immunisering av en katt for å muliggjøre fremstilling av antistoffer til katte-leukemi-virus er også beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremgangsmåter for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning som kan beskytte en katt overfor felin leukemivirus (FeLV).

5 Katte-leukemiviruser (FeLV) er replikasjonskompetente type C retroviruser, som er epidemiologisk assosiert med den horisontale overføring av leukemi, aplastisk anemi, og akutt immunosupresjon (katte-AIDS) i katter. Genomet til FeLV består av en 60-70S enkelt-trådet RNA som består av et gag-
10 gen som koder for virale kjerneproteiner, et pol-gen som koder for revers transkriptase, og et env-gen som koder for gp70 og p15E virale kappeproteiner.

Isolater av FeLV kan bli inndelt i subgruppene A, B og C som
15 er basert på deres interferens-mønstre (Sarma et al., Virology 44:352-358 (1971)). FeLV-A finnes i alle isolater, mens FeLV-B finnes i omtrent 40% av alle isolater. FeLV-C er ganske sjelden og som FeLV-B finnes den alltid i kombinasjon med FeLV-A (Jarrett et al., International Journal of Cancer 21:334-337 (1978)). FeLV-C finnes i bare omtrent 1% av alle
20 virusinnholdende katter og bare i katter med anemi (Onions et al., Nature (London) 296:156-158 (1982)).

Mange forsøk på å fremstille en vaksine mot katte-leukemi har
25 ikke vært vellykket. Disse forsøkene innbefatter virus drept ved bestråling, hydroksylamin, eller paraformaldehyd, og vaksiner som benytter mitomycin D inaktiverte virus (U.S. Patent nr. 3,966,907, 4,034,081, og 4,086,134) eller basert på bruk av hele levende infekterte celler og inaktiverte
30 infekterte celler.

Nylig har man vært interessert i bruk av rensede FeLV molekyler (Osterhaus et al., Journal of Immunology 135(1);591-596 (1985)) og på bruk av et FOCMA (Katte-on-cornavirus assosiert cellemembran-antigen) preparat (U.S. patentnummer 4,331,791 og 4,434,157). En vaksine som
35 innbefatter et FOCMA-preparat er kommersielt tilgjengelig

(Norden Laboratories, Lincoln, Nebraska). En studie av virkningen av denne vaksinen førte til at man tviler sterkt på om den kan beskytte katter fra FeLV-sykdom (Pedersen et al., Feline Practice 15:7-20 (1985)). Det er derfor et behov for antigene preparater som kan stimulere immunsystemet til katter og indusere antistoffer til FeLV.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig en fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning som kan beskytte en katt overfor felin leukemi virus (FeLV), kjennetegnet ved å blande sammen en immunologisk effektiv mengde FeLV subgruppe A gp70R- Δ eller en biologisk aktiv analog derav og en vesentlig ren saponin adjuvant valgt fra gruppen bestående av QA-7, QA-17, QA-18 og QA-21.

Oppfinnelsen er også kjennetegnet ved å blande en fremstilling av en farmasøytisk sammensetning som kan beskytte en katt overfor felin leukemi virus (FeLV), og å blande en immunologisk effektiv mengde FeLV subgruppe A gp70R eller en biologisk aktiv analog derav og en vesentlig ren saponin adjuvant valgt fra gruppen bestående av QA-7, QA-17, QA-18 og QA-21, og å blande en immunogen effektiv mengde FeLV subgruppe A gp90R eller en biologisk aktiv analog derav og en vesentlig ren saponin adjuvant valgt fra gruppen bestående av QA-7, QA-17, QA-18 og QA-21. En fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning som kan beskytte katt overfor felin leukemivirus (FeLV), kjennetegnet ved å blande en immunogeneffektiv mengde FeLV ved subgruppe A gp70R- Δ sammen med saponin adjuvant QA-21 og aluminiumhydroksid, er også beskrevet.

Kort beskrivelse av figurene.

Figur 1 skisserer konstruksjonen av pFU3 proben som brukes til å detektere tilstedeværelse av FeLV DNA-sekvenser. Restriksjonsendonuklease-seter på DNA eksisterer som vist. R:Eco RI; P:Pst I; K:Kpn; T:Tag I.

Figur 2 viser restriksjonskartet til klon 32-50. Restriksjonsendonuklease-setene på DNA eksisterer som vist. R:Eco RI, Bg:Bgl II; S:Sac I; H:Hind III; K:Kpn I; B:Bam HI.

5 Figur 3 viser restriksjonskartet for FeLV kappegenet som er subklonet inn i PUC-9.

Figur 4 viser den virale DNA-sekvensen og den korresponderende aminosyresekvensen til gp70 og p15E.

10

Figur 5 viser subkloneringen av gp70-p15E fragmentet for å få ekspresjon av gp70 viralgenene for å fremstille gp70R.

15 Figur 6 viser DNA-sekvensen som er i, og korresponderende aminosyresekvens til gp70R- Δ slik den blir fremstilt av ekspresjonsvektor pJLBOT.

20 Figur 7 viser DNA-sekvensen som er i, og korresponderende aminosyresekvens til gp70R slik den blir fremstilt av ekspresjonsvektor pJLBOT.

25 Figur 8 viser DNA-sekvensen i, og korresponderende aminosyresekvens til gp90R slik den blir fremstilt av ekspresjonsvektor pJLBOT.

Figur 9 viser rensing av silika-fraksjonene til Quillaja saponins ved bruk av revers fase HPLC.

Figur 10 viser resultatene av immunisering med gp70R- Δ .

30

Figur 11 viser resultatene av immunisering med alkylert gp70R- Δ .

Kort beskrivelse av de foretrukne fremstillinger.

35

Oppfinnerene har beskrevet en metode for fremstilling av polypeptiddelen av gp70 glykoprotein til FeLV ved bruk av

rekombinante DNA-teknikker. Dette ble gjort ved kloning av det virale genet for gp70 inn i en plasmid-vektor som deretter ble brukt til å transformere E.coli. Når de virale gp70-genene kommer til uttrykk i E.coli, blir det produserte polypeptidet ikke glykosylert; derfor, er molekylvekten omtrent 45 Kd i stedet for 70 Kd. Derfor, betegnes det virale proteinet fremstilt i prokaryoter fra de virale genene som koder for gp70 betegnet "gp70R" eller "rec-gp70". I tillegg, når et gen som koder for FeLV viral gp70 kappeprotein også koder for aminosyrene 1-40 til p15e kappeprotein til FeLV, er molekylvekten til det polypeptidet som kommer til uttrykk i E.coli 55 Kd. Det virale proteinet fremstilt i prokaryoter fra de virale genene som koder for gp70 og de 40 aminoterminala aminosyreresidene til p15e polypeptidet blir betegnet "gp70R- Δ " eller "rec-gp70- Δ ". I tillegg, koder genet som koder for FeLV gp70 kappe og hele p15e kappe-proteinet for et polypeptid som har en molekylvekt på 65-70 Kd og blir betegnet "rgp90", "gp90R", eller "rec-gp90". Disse rekombinante proteinene blir samlet betegnet "gp70 inneholdende rekombinant protein".

Betegnelsen "immunologisk relaterte virus" betegner de virus som har en signifikant genomisk homologi med FeLV slik at produktene som kommer til uttrykk fra disse genene viser signifikante grader av immunologisk kryss-reaktivitet. Et eksempel på et slikt immunologisk relatert virus er katte sarcoma-virus (FeSV).

FeSV er et retrovirus sterkt relatert til FeLV. FeSV kan bli isolert fra svulster som kommer fra FeLV-infiserte katter. I praksis, er FeSV et defekt virus som bare kan bli propagert sammen med FeLV som et hjelpevirus. Man tror at FeLV-genomet først integreres inn i katte-DNA. Ved lytisk transformasjon, når retroviralt DNA blir fjernet fra katte-DNA, tar den med seg visse kattegener kjent som oncogener. Det resulterende retrivirus, FeSV, er veldig lik FeLV og er lik når det

gjelder kappe-glykoproteiner som er tilstede på FeLV. FeSV isolert fra infiserte katter inneholder også FeLV.

5 Betegnelsen "vert" som det blir brukt i denne oppfinnelsen skal innbefatte ikke bare prokaryoter men også eukaryoter slik som gjær og trådformet sopp og likeledes plante og dyreceller.

10 Betegnelsen "prokaryot" er ment å innbefatte alle bakterier som kan bli transformert med det virale genet for ekspresjon av gp70 kappe-proteiner til FeLV.

15 De virale genene for gp70-inneholdende protein kan bli avledet fra en hvilken som helst FeLV-subgruppe. Det eneste som er nødvendig er at den genetiske sekvensen for glykoproteinet kommer til uttrykk i den prokaryote organismen. Det virale genet for gp70-inneholdende protein fra FeLV subgruppe A er å foretrekke. Spesielt å foretrekke er det virale genet for gp70 til FeLV subgruppe A fremstilt av cellelinje 3281.
20 Denne cellelinjen er tilgjengelig fra the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, og har aksesjonsnr. CRL 9116.

25 Et rekombinant DNA-molekyl som koder for det virale gp70-inneholdende proteinet kan bli brukt til å transformere en vert ved bruk av hvilke som helst av teknikkene som er kjente innenfor fagområdet. Bruk av et plasmid som inneholder det virale gp70 kodende sekvensen for prokaryot transformasjon er spesielt å foretrekke.

30 Det gp70-inneholdende rekombinante proteinet har mer eller mindre aminosyrer ved dets flankerende ender sammenlignet med aminosyresekvensen til nativt gp70. For eksempel, kan de flankerende aminosyresekvensene innbefatte hele eller deler
35 av p15E-peptidet slik som gp70R- Δ og gp90R polypeptidene har. Alternativt, kan det rekombinante proteinet i denne

oppfinnelsen, for eksempel ha to mindre arginin-residier ved C-termini, som vist i figur 7.

5 Betegnelsen "vesentlig ren form" betyr når den blir brukt til å betegne polypeptid i denne oppfinnelsen at polypeptidet er vesentlig fri for andre virale proteiner som polypeptid i denne oppfinnelsen vanligvis er assosiert med i naturen.

10 Betegnelsen "vesentlig ren" når brukt til saponiner betyr vesentlig fri for forbindelser som vanligvis er assosiert med saponin i naturlig form og som utøver konstante og reproduserbare kromatografisk respons, elueringsprofiler, og biologisk aktivitet. Betegnelsen "vesentlig ren" er ikke ment å utelukke kunstige eller syntetiske blandinger av
15 saponin med andre forbindelser.

Fremgangsmåter for fremstilling av sammensatte, opererbare sammensatte gener og uttrykking av dem i bakterier er kjent og er vist, for eksempel, i U.S. patentnummer 4,366,246. De
20 genetiske konstruksjonene og fremgangsmåtene beskrevet deri kan bli benyttet for ekspresjon av gp70 fra FeLV i prokaryote verter.

Prokaryote verter kan innbefatte Gram negative, Gram positive
25 bakterier, slik som E.coli, S. thmphimurium, Serratia marcescens, og Bacillus subtilis.

Generelt, blir ekspresjonsvektorer som inneholder promoter-sekvenser som letter effektiv transkripsjon av det innskutte
30 virale genfragmentet brukt sammen med verten. Ekspresjonsvektoren inneholder vanligvis et replikasjonsorigo, promoter(e), terminator(er), likeledes spesifikke gener som medfører fenotypisk seleksjon i transformerte celler. De transformerte vertene kan bli fermentert og dyrket i henhold
35 til fremgangsmåte som er kjent innenfor fagområdet for å oppnå optimal cellevekst.

Eksempler på promotere som kan bli anvendt i oppfinnelsen er: rec A, trp, lac, tac, og bakteriofag lambda p_R eller p_L. Eksempler på plasmider som kan bli anvendt i oppfinnelsen er betegnet i Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories, 1982.

En hvilken som helst vert modifisert i henhold til metodene beskrevet, eller modifisert ved bruk av andre metoder, som er kjent innenfor fagområdet, så som, for eksempel, ved overføring av genetisk materiale ved bruk av en lysogen fag, som fører til en prokaryot som uttrykker FeLV genet for gp70-inneholdende protein kan anvendes.

Verter, helst prokaryoter, som er transformert med FeLV virale genomet for gp70-inneholdende protein er spesielt nyttige for fremstilling av gp70R, gp70R-delta og gp90R polypeptid som kan bli anvendt til immunisering av en katt. Som før nevnt, når det virale genomet for gp70-inneholdende protein blir uttrykt i bakterier, skjer det ingen glykosylering. Dette medfører at det rekombinante gp70 har en molekylvekt på 45 Kd istedenfor 70 Kd som når genomet blir uttrykt i virus.

gp70R-delta inneholder hele aminosyresekvensen til FeLV viral gp70 kappe-protein og de 40 amino-terminale aminosyreresidene til p15e kappe-protein til FeLV subgruppe A fra cellelinje 3281. p15e-avledete sekvensen ligger ved karboksyltermini til det rekombinante polypeptidet. Molekylvekten til gp70R-Δ polypeptidet som uttrykkes i E.coli er 55Kd. Det virale proteinet fremstilt i prokaryoter fra de virale genene som koder for gp70 og p15e polypeptidet (gp70R-Δ) er mere hydrofobt enn gp70R på grunn av de hydrofobe egenskapene til den p15e-avledete sekvensen. Både i den naturlig forekommende (gp70) og rekombinante (gp70R, gp70R-Δ, og gp90R) former, er aminosyresekvensen for gp70-delen av molekylet essensielt like. En katt som er immunisert med gp70 rekombinant protein vil fremstille antistoffer som vil binde seg til

epitoper som er tilstede på gp70R, gp70R- Δ , gp90R og gp70 polypeptider. Derimot, kan man utføre kommersiell fremstilling av FeLV gp70-inneholdende rekombinante proteiner.

5 Betegnelsen "immunogen effektiv mengde", som den blir brukt i oppfinnelsen, skal betegne mengden FeLV-antigen som er nødvendig for å indusere fremstilling av antistoffer i en katt som vil bindes til FeLV-epitopene.

10 gp70-inneholdende rekombinante proteiner i denne oppfinnelsen er spesielt nyttig for å sensibilisere immunsystemet til en katt slik at, som et resultat derav, det fremstilles anti-
stoffer som er reaktive til epitoper som er tilstede på FeLV. gp70R og gp70R- Δ proteiner avledet fra cellelinjer fremstilt
15 av FeLV subgruppe A er å foretrekke. Spesielt å foretrekke er FeLV subgruppe A-inneholdende cellelinje 3281.

gp70-inneholdende rekombinante proteiner kan bli administrert parenteralt ved injeksjon, rask infusjon, absorpsjon gjennom
20 nesesvelgrommet, absorpsjon gjennom hud, og oralt. Prepara-
ter for parenteral administrasjon innbefatter sterile eller
vandige eller ikke-vandige løsninger, suspensjoner, og
emulsjoner. Eksempler på ikke-vandige løsningsmidler er
propylen-glykol, polyetylglykol, vegetabile oljer slik som
25 olivenolje, og injiserbare organiske estere slik som etyl-
oleat. Bærere for tettende dressinger kan bli brukt til å
øke skinn-permeabiliteten og øke antigen-absorpsjonen. Væske-
doseformer for oral administrering innbefatter generelt en
liposom-løsning som inneholder væske-doseformen. Egnede
30 former for suspensjon av liposomene innbefatter emulsjoner,
suspensjoner, løsninger, siruper, og eliksirer som inneholder
inerte tilsetningsstoffer som vanligvis brukes innenfor
fagområdet, slik som rensset vann. Ved siden av inerte
tilsetningsstoffer, kan slike preparater også inneholde
35 adjuvans, fuktemidler, emulsifiserende og suspenderende
midler, og søtnings-, smaks-, og parfymende midler.

Det er også mulig å tilsette en adjuvans til de antigene preparatene som inneholder gp70-inneholdende rekombinante proteiner i denne oppfinnelsen. Adjuvans er forbindelser som kan bli brukt til å uspesifikt forsterke en spesifikk immunoresponse. Normalt, blir adjuvans og antigenet blandet før presentasjonen for immunsystemet, eller presentert separat, men inn i det samme stedet i det dyret som blir immunisert. Adjuvans kan bli delt inn i forskjellige grupper basert på deres sammensetting. Disse gruppene innbefatter olje adjuvans (for eksempel, Freund's komplette og ikke-komplette), mineraler (for eksempel, $AlK(SO_4)_2$, $AlNa(SO_4)_2$, $AlNH_4(SO_4)$, kisel, aluminium, $Al(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$, kaolin og karbon), polynukleotider (for eksempel poly IC og poly AU syrer), og noen naturlige forbindelser (for eksempel, voks D fra *Mycobacterium tuberculosis*, likeledes forbindelser funnet i *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, og medlemmer av *Brucella*). Blant de forbindelser som er spesielt nyttige som adjuvanter er rå blanding av saponiner slik som, for eksempel, Quil A (Superfos A/S, Danmark) eller høyt rensede fraksjoner derav.

Betegnelsen "saponin" som det blir brukt heri innbefatter glykoside triterpenoide forbindelser som lager skum i vandige løsninger, har hemolytisk aktivitet, og har immun adjuvansaktivitet. Det innbefatter saponin per se, likeledes naturlige og farmasøytiske akseptable salter og farmasøytisk akseptable derivater. Betegnelsen "saponin" innbefatter også biologiske aktive fragmenter derav.

Saponiner er en blanding av triterpene glykosider ekstrahert fra barken av treet *Quillaja saponaria*. Saponiner er veldig mye brukt som adjuvanter i vaksiner mot munn- og klovsyke, og i å forsterke den beskyttende immuniteten som fremkommer ved bruk av eksperimentelle vaksiner mot protozoal-parasitter slik som *Trypanosoma cruzi* plasmodium og den humerale responsen til saue rødt blod celler (SRBC). (Bomford, Int. Arch. Allerg. appl. Immun., 67:127 (1982)). Nylig, har saponin-

adjuvanter fra Quil-A, en rå blanding av saponiner, blitt rensed ved bruk av høytrykks-væske kromatografi (HPLC). De rensende fraksjonene ble fremstilt som beskrevet i U.S. patentsøknaden til Kensil et al., med tittelen "Saponin adjuvanter", som er inkorporert heri som referanse. Disse rensede fraksjonene (vesentlig rene saponiner) og blandinger derav, er spesielt nyttige i denne oppfinnelsen.

Den fysiske formen av det gp70-inneholdende rekombinante antigenet som blir brukt til å immunisere en katt kan være enten aggregert eller ikke-aggregert. Studier foreslår at immunisering med den aggregerte formen av gp70R i bakterier er mest effektiv når det gjelder forbedring av den skadelige effekten av den senere utsetting for viral infeksjon. Dette utelukker ikke fremstilling av aggregert gp70R fra ikke-aggregert form av gp70R ved bruk av vanlige teknikker, som for eksempel, behandling med glutaraldehyd eller andre kryssbindende midler. Aggregert gp70R som fremkom på denne måten kunne deretter bli brukt for fremstilling av en viral infeksjons-forbedrende sammensetning som er effektiv i å indusere en aktiv immunreaksjon som beskytter mot senere utsetting for FeLV eller immunologisk relaterte virus.

Uansett om et dyr blir immunisert med aggregert eller ikke-aggregert gp70R, vil begge disse formene av gp70R føre til fremstilling av antistoffer dertil. Det er derfor mulig å bruke disse antig-gp70R antistoffene diagnostisk, som for eksempel i et kit som kan detektere tilstedeværelse av gp70 i en prøve.

FeLV-antigene preparater i denne oppfinnelsen kan bli brukt i en katt til å indusere fremstilling av antistoffer som vil binde seg til epitope determinanter til FeLV. Spesielt egnet metode for å øke produksjonen av katte-antistoffer til FeLV er først å immunisere en katt med FeLV-antigene preparater i denne oppfinnelsen etterfulgt av en senere immunisering.

Selv om alderen på katten ved den første immuniseringen ikke er kritisk, er det ønskelig at dyret er minst åtte uker gammelt, siden kattene blir avvent når de er omtrent fire uker, og ved å vente til en alder på åtte uker, vil inter-
5 ferensen som kan komme av sirkulerende moderlige antistoffer ha sunket.

En måte til å bestemme når en katt helst bør bli immunisert er å bestemme kattens immunstatus med hensyn på gp70. Denne
10 evalueringen kan bli gjort ved å bruke gp70-inneholdende rekombinante proteiner i en immunanalyse så som, for eksempel, en ELISA-analyse for å detektere katte-antistoffer til gp70R. Ved å gjøre dette, er det mulig å bestemme når
15 kattens antistoff-titer til gp70R er tilstrekkelig lav ved å fremme immunisering og beskytte mot infeksjoner av FeLV og immunologisk relaterte virus.

Mange forskjellige teknikker eksisterer for tidsbestemmelse av immuniseringene når et multippel immuniseringssystem blir
20 benyttet. Det er mulig å bruke det antigene preparatet i denne oppfinnelsen mer enn en gang for å øke graden og diversiteten av uttrykking av immunoglobulin-repertoaret uttrykt av den immuniserte katten. Hvor multiple immuniser-
inger blir gitt, er det mest vanlig å immunisere med en til
25 to måneders mellomrom.

Dosen av gp70-inneholdende rekombinant protein administrert til en katt vil variere avhengig av slike faktorer som alder, tilstand, kjønn, og grad av sykdom, hvis noen, og andre
30 variabler som kan bli justert av en som er kjent innenfor fagområdet.

De antigene preparatene fremstilt ifølge oppfinnelsen kan bli administrert som enten enkelt eller flere doser og kan
35 variere fra 10-1,000 ug/ml når det gjelder FeLV gp70R eller gp70R-Δ antigen per dose, helst 100-700 µg/ml gp70R eller gp70R-Δ antigen per dose, aller helst 100-300 µg/ml gp70R

eller gp70R- Δ antigen per dose. Lignende dosenivåer for gp70-inneholdende rekombinante proteiner blir benyttet.

5 Nå er oppfinnelsen generelt beskrevet, og en mer fullstendig forståelse kan bli oppnådd ved referanse til følgende spesifikke eksempler.

Eksempel 1

ISOLERING AV EN SUBGRUPPE AV EN GENOM KLON

10

Genomt DNA med høy molekylvekt ble fremstilt fra 3281-celler, kuttet fullstendig med endonuklease Eco RI, og 8-20 kilobase (kb) fragmenter isolert på en sukrosegradient. Et lambda fag bibliotek ble fremstilt fra disse fragmentene ved bruk av Charon 4A Eco RI armer. Dette biblioteket ble screenet med 15 en probe som inneholdt U3 regionen til Gardner-Arnstein FeLV subgruppe B genome klon som beskrevet av Mullins et al., Journal of Virology 38:688-703, 1981. DNA-hybridiseringer ved bruk av dette området av FeLV lange terminale repeterende 20 sekvens (LTR) har vist seg å være spesifikke for horisontalt overført FeLV DNA-sekvenser (Casey et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 78:7778 (1981)). Denne endogene U3 proben kryss-hybridiserer ikke med endogene FeLV-sekvenser som blir funnet i DNA fra uinfekterte katteceller. 25 Konstruksjonen av U3 proben er beskrevet i figur 1.

Plasmid pFGB ble konstruert ved subkloning av et 9.1 kb Eco RI fragment fra FeLV DNA inneholdende genom klon lambda-HF60 (Mullins et al., supra.) inn i pBR322. Dette plasmidet 30 inneholder 4 Kpn I seter, to i den indre regionen i det virale genomet og en i området av hver lange terminale repetererte sekvens (LTR). Kutting av pFGB med Kpn I etterfulgt av religering resulterer i en klon (pFLTR) som inneholder flankerende cellulære genetiske sekvenser og en LTR, men 35 ingen andre virale sekvenser. Deretter ble pFLTR kuttet med endonuklease Tag I og et 550 bp fragment ble isolert. Dette fragmentet ble derfor subklonet inni restriksjonssete Cla I

til pBR322. Denne klonen, pFU3, ble direkte nick-translatert og brukt som hybridiseringsprobe.

Seleksjon av rekombinante fag ble gjort ved DNA-hybridisasjon til den reaktive nick-translaterte pFU3 proben. På denne måten, ble 42 rekombinante fag selektert og isolert og deres DNA fremstilt. Disse genome klonene ble restriksjonskuttet og analysert ved Southern hybridisering ved bruk av pFU3 proben, en FeLV kappe-probe (pFGB-env) fra Gardner-Arnstein-molekylære klon, og en probe (pFGB) i tillegg som inneholder hele FeLV Gardner-Arnstein genomet. Basert på denne analysen, ble 28 distinkte kloner identifisert. Av disse 28 klonene viste det seg av 24 var defekte i det at de hadde en omfattende delesjon i gag/pol gen-regionen. De gjenværende fire klonene hadde ikke denne delesjonen og var i full lengde.

Klon med full lengde (32-50), og hvor restriksjonskartet er vist i figur 2, ble valgt for videre analyse. Et 2.0 kb Pst I fragment som inneholder FeLV kappe-genet ble subklonet inn i PUC-9 og et begrenset restriksjonskart ble bestemt (figur 3). Forskjellige fragmenter ble videre subklonet inn i M13 og DNA-sekvensen bestemt (også vist i figur 4).

Eksempel 2

EKSPRESJON I E.COLI AV FeLV gp70 OG gp70-Δ

Det er to Bal I restriksjonssteder i kappe-genet til FeLV subgruppe A genome klon 32-50. En av disse setene ligger ved nukleotid 161 (figur 4), som er veldig nær grensen mellom ledersekvensen og sekvensen som koder for aminoenden av nativt gp70. Det andre restriksjonsstedet er omtrent 120 nukleotider etter gp70/p15E grensen. Bal I fragmentet ble isolert, Bam HI linkere ble tilsatt og det modifiserte fragmentet klonet inn i Bam HI setet til PUC-9 (penv-1) som vist i figur 5. Dette Bam HI fragmentet ble også subklonet inn i P_L-baserte ekspresjonsvektor, pJLBOT, hvor den

5 resulterende subklonen som blir kalt R16-38, og protein-
ekspresjon induisert. Dette 55Kd proteinet blir betegnet
"gp70R-delta" og er også kjent som "rec-gp70-delta" eller
rgp70-delta". Hele DNA-sekvensen og den korresponderende
aminosyresekvensen er vist i figur 6.

10 E.coli stamme R16-38, som inneholder den virale genome
sekvensen for gp70-delta i plasmid pJLBOT, ble deponert 22
mai, 1987 ved the American Type Culture Collection, Rock-
ville, Maryland, og gitt aksjonsnummer 67411.

15 Konstruksjonen av ekspresjonsplasmid pJLBOT oppsto ved
modifisering av plasmid PJLA16. Konstruksjonen av plasmid
PJLA16 er beskrevet i Lautenberger et al., Gene Anal. Tech.
1:63-66 (1984). pJLA16 plasmidet inneholder bakteriofag
20 lambda P_L promoter (P_L), og Shine-Dalgarno sekvensen og
ledersekvensen fra bakteriofag lambda C_{II} genet. Opprinnelig
ble ekspresjonsplasmid pJLBO fremstilt ved kutting av pJLA16
med restriksjonsendonuklease Nru I. Etter kutting, ble en
25 Bam HI linker ligert til det kuttete plasmidet. Denne
fremgangsmåten plasserer et Bam HI restriksjonssete ved enden
av C_{II} bakterielederen i translasjonsleseramme hensiktsmessig
for ekspresjon av gp70R. Deretter ble et syntetisk oligo-
nukleotid, som inneholder translasjonsterminatorer i alle tre
30 leserammene, klonet inn i plasmid pBR322 som deretter ble
satt inn i pJLBO etter Bam HI kloningssete. Det resulterende
plasmidet ble betegnet pJLBOT.

30 Western blot-analyser av de totale proteinekstraktene fra
induserte kulturerer ved bruk av kanin-antisera med høy titer
til gp70 indikerte at et FeLV protein på omtrent 55 Kd var
tilstede. Dette proteinet inneholder nesten hele gp70 og 40
aminosyrer av p15E.

35 For å danne kloner som fremstiller gp70 sekvenser uten de som
ble avledet fra p15E, ble penv-1 først linearisert med Eco
RI. Omtrent 100 bp ble fjernet fra hver ende med Bal 31

eksonuklease, Bgl II linkere ble tilsatt og DNA-fragmentene ble resirkularisert med DNA ligase. Rekombinante kloner ble selektert og grad av nukleasekutting og posisjonen til Bgl II linkere innenfor FeLV 32-50 kappe-genet ble bestemt ved DNA-sekvenseringer ved bruk av M-13/Sanger dideokso-metode og et kommersielt tilgjengelig kit (Amersham). pUC-R16-12 klonen hadde FeLV sekvenser som terminerte innenfor fem nukleotider av 3' enden til gp70 kodende region. Beliggenheten av denne 3' enden er vist i figur 4.

Bam HI/Bgl II fragmentet fra pUC-R6-12 ble isolert og subklonet inn i pL ekspresjonsvektor pJLBOT. Ved induksjon, ble et protein på omtrent 45 Kd fremstilt som reagerte med antisera til gp70. Den fullstendige aminosyresekvensen til dette proteinet er vist i figur 7. Den resulterende klonen ble kalt R16-12.

E.coli stamme R16-12, som inneholdt den virale genome sekvensen for gp70 i plasmid pJLBOT, ble avgitt 22 mai, 1986, ved American Type Culture Collection, Rockville, Maryland og gitt aksesjonsnr. 67119.

Eksempel 3

EKSPRESJON AV FeLV gp90 I E.COLI

En rekombinant DNA-klon som uttrykker FeLV gp90 ble konstruert slik at den begynner med plasmid FEA-3281. FEA-3281 ble konstruert ved subkloning av det 2 kb Pst I fragmentet fra genomt klon 32-50 inn i PUC-9, og inneholder kodende sekvenser for FeLV kappe-genet. Et restriksjonskart for FEA-3281 er presentert i figur 3, og sekvensen til den FeLV avledete delen til plasmidet er presentert i figur 4. FEA-3281 ble også brukt som utgangsmateriale for dannelsen av plasmider som uttrykker gp70R og gp70R-delta.

FEA-3281 ble kuttet med HindIII for dannelsen av to DNA-fragmenter på 3.3 og 5.5 kb. 3.3 kb fragmentet ble isolert

og resirkulert ved bruk av T4 DNA ligase. Det resulterende plasmidet ble kalt FEA-env-5'.

5 FEA-env-5' ble kuttet med Ball. BamHI linkere ble tilsatt og plasmed resirkularisert. Dette plasmidet ble kalt FEA-env-5'-BH.

10 FEA-env-5'-BH ble kuttet med HindIII, og 1.5 kb HindIII fragmentet som ble dannet fra FEA-3281 ble subklonet inn i dette setet i den opprinnelige orienteringen. Dette plasmidet ble kalt ENV-L-.

15 ENV-L- ble kuttet med PstI og svakt kuttet med Bal 31 eksonuklease. BglIII linkere ble tilsatt og plasmidet resirkularisert. Det resulterende plasmidet ble kalt PUC-gp90. Lokalisering av BglIII i FeLV kappe-genet ble bestemt ved DNA-sekvensering.

20 2.0 kb BamHI/BglIII fragmentet fra PUC-gp90 ble isolert og subklonet inn i BamHI setet til pLCBC00. pLCB00 er identisk til pJLBOT med unntagelse av at pLCBC00 inneholder et PvuII restriksjonssete mellom DNA-sekvensen som stammer fra bakteriofag lambda pL og bakteriofag cII. Dette plasmidet ble kalt pCBC00gp90. Ekspresjon ble indusert på en lignende
25 måte som for gp70R og gp70R-delta. Et 65-70 kd protein som var reaktiv med kanin anti-gp70 antisera ble produsert ved induksjon. Dette proteinet ble kalt gp90R. Hele DNA-sekvensen som koder for gp90R og korresponderende aminosyresekvenser er presentert i figur 8.

30 E.coli stamme R16-12, som inneholder den virale genome sekvensen for gp90 i plasmid pLCBC00, ble avgitt 28. mai, 1987, ved American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, og gitt aksjonsnummer 67412.

35

Eksempel 4

RENSING AV FeLV REKOMBINANT gp70

Rekombinant E.coli klon R16-12 ble tillatt vokse i LB-medium
5 supplementert med 1% glukose og 0.1% casaminyrer ved 32°C
til en optisk tetthet (560 nm) på 0.4-0.6. Kulturen ble
deretter skiftet til 42°C og inkubert i ytterligere to timer.
Etter dette ble cellene samlet ved sentrifugering med 4,000 g
i 30 minutter, vasket med 50 mM Tris HCl, pH 7.5, innehold-
10 ende 50 mM EDTA og 50 mM NaCl, og lysert ved enzymatisk
kutting med lysozym (5 mg/g celler) i 25 mM Tris HCl, pH 7.5,
inneholdende 0.5% Triton X-100. Cellelysate ble deretter
fraksjonert ved sedimentering i 30 minutter ved 30,000 g.
Cellepelleten ble resuspendert i 50 mM Tris HCl, pH 7.5,
15 inneholdende 50 mM MgCl₂ og DNase I (0.1 mg/g celler). Etter
inkubasjon ved romtemperatur i 30 minutter med røring av og
til, ble suspensjonen sentrifugert ved 6,000 g i 30 minutter
og pelleten ble vasket to ganger 25 mM Tris HCl, pH 7.5,
inneholdende 0.5 M NaCl, 0,5% Triton X100, 25 mM EDTA, og 1%
20 beta-merkaptotanol. Denne behandlingen ble etterfulgt av to
vasker med 4 M urea i 25 mM Tris HCl, pH 7.5, inneholdend
e 0.5 M NaCl og 25 mM EDTA. Denne pelleten inneholdt mer enn
90% av det rekombinante proteinet uttrykt i E.coli R16-12.
Gelelektroforese-analyser viste at gp70R proteinet som delvis
25 var opprenset og presentert i bakteriesammenhenger i aggre-
gert form. Dette materialet består av 60-80% gp70R protein
mens det gjenværende materialet består av bakterielle
proteiner. Dette materialet ble betegnet preparat I.

30 Et annet gp70R preparat (Preparat II) ble utviklet, begyn-
nende med Preparat I. Den rekombinante proteinpelleten til
Preparat I ble løst opp ved resuspending av den vaskede
pelleten i 50 mM Tris HCl, pH 9.0, ved tilstedeværelse av 6 M
urea og 1% beta-merkaptotanol. Suspensjonen ble gjort klar
35 til sentrifugering ved 10⁵g i 30 minutter.

For å rense gp70R Preparat II, ble supernatanten etter sentrifugeringen applisert på en Sepharose CL-4B kolonne ekvilibrert med 50 mM Tris HCl, pH 9.0, inneholdende 6 M urea og 1 mM beta-merkaptoetanol. Kolonnen ble eluert med den samme buffer ved romtemperatur. Fraksjonene ble samlet og undersøkt ved SDS-gelelektroforese for tilstedeværelse av gp70R. Fraksjonene som inneholder antigen ble slått sammen og dialysert mot en serie buffere ved 4°C: først, 10 volumer 50 mM Tris HCl, pH 7.7, inneholdende 4 M urea; deretter, 10 volumer buffer inneholdende 2 M urea; deretter, 10 volumer buffer inneholdende 1 M urea; og deretter, 100 volumer buffer uten urea. Etter endt dialyse, omtrent 50% av gp70R var fremdeles løselig i 50 mM Tris HCl, pH 7.5. I motsetning til gp70R i Preparat I, eksisterte ikke gp70R fra Preparat II i aggregert form.

Den aggregerte formen av gp70R er tilstede i Preparat I likeledes den løselige, ikke-aggregerte gp70R fra Preparat II ble brukt i katter for å produsere antistoff til FeLV.

Eksempel 5

RENSING AV FeLV REKOMBINANT gp70R- Δ
innbefattet preparat.

Rekombinant E.coli klon R16-38 ble latt vokse i LB-medium supplementert med 1% glukose og 0.1% casamiosyrer ved 32°C til en optisk tetthet (560nm) på 0.4.-0.6. Kulturen ble deretter skiftet til 42°C og inkubert i ytterligere 2 timer. Ved slutten av denne tiden ble cellene samlet etter sentrifugering ved 4,000 g i 30 minutter, vasket med 50 mM Tris HCl, pH 7.5, og til slutt resuspendert i 200 ml 50 mM Tris HCl, til hvilket man tilsetter 1 ml 0.1 M fenylmetylsulfonylfluorid i isopropanol (final konsentrasjon = 0.5 mM) og 0.4 ml 5 mg/ml aprotinin (final konsentrasjon = 10.0 μ g/ml). Cellene ble lysert ved enzymatisk kutting ved lysozym (final konsentrasjon = 0.5 mg/ml) ved tilstedeværelse av 0.2% Triton X-100. Etter røring i 30 minutter, 2 ml MgCl₂ (0.5M), 5 ml

DNaseI (1 mg/ml) og 1 ml 0.1 M fenylmetylsulfonylfluorid ble tilsatt. Etter røring i 30 minutter til, ble 40 ml EDTA (0.25 M, pH 7.5) og 4 ml Triton X-100 (10% w/v) tilsatt. Preparatet ble sentrifugert ved 10,000 x g i 30 minutter ved 4°C, og pelleten ble resuspendert i 50 ml 50 mM Tris HCl, pH 7.5. Pelleten ble homogenisert ved lav hastighet i 15 sekunder. Lysozym ble satt til til en konsentrasjon på 0.5 mg/ml og 0.6 ml 10% Triton X-100 ble tilsatt. Etter 15 minutters røring, ble 10 ml MgCl₂ (0.5 M) og 1 ml DNase I (1 mg/ml) tilsatt og røringen fortsatte i 15 minutter. Etter justering av volumet til 300 ml med 50 mM Tris, pH 9.0, 40 ml 10% Triton X-100 og 51.2 ml EDTA (0.25 M, pH 7.5) tilsatt og det finale volumet justert til 400 ml med 50 mM Tris, pH 9.0. Etter 30 minutters røring, ble suspensjonen sentrifugert ved 10,000 x g i 30 minutter ved 4°C, og pelleten ble resuspendert i 400 ml 50 mM Tris HCl, pH 7.5, inneholdende 4 M urea, 50 mM EDTA, og 1% Triton X-100. Etter 15 minutters røring, ble suspensjonen sentrifugert ved 10,000 x g i 30 minutter ved 4°C, og pelleten ble resuspendert i 400 ml 50 mM Tris HCl, pH 7.5, inneholdende 1.0 M NaCl. Etter 15 minutters røring, ble suspensjonen sentrifugert ved 10,000 x g i 30 minutter ved 4°C, og pelleten ble resuspendert i 400 ml 50 mM Tris HCl, pH 7.5, inneholdende 6 M urea, og 5 mM EDTA. Etter 15 minutters røring, ble suspensjonen sentrifugert ved 10,000 x g i 30 minutter ved 4°C. Ved dette tidspunktet ble pelleten enten frosset for senere bruk eller løst opp i 50 mM Tris HCl, pH 9.5, inneholdende 6M guanidin HCl, 50 mM EDTA, og 0.5% beta-merkaptoetanol. gp70R-delta polypeptider ble deretter rensset ved bruk av DNA-metoden i eksempel 6, nedenfor.

Eksempel 6

RENSING AV FeLV REKOMBINANT gp70R- Δ

Fremgangsmåte I.

5

Det oppløste proteinet i eksempel 5 ble dialysert mot 6 M urea, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 5 mM EDTA, og 1 mM Ditiotreitol (DTT). Omtrent 120 mg protein ble applisert på en CM-TSK kolonne (EM Science, 1.5 cm ID x 4 cm) ekvilibrert med samme buffer. Proteinet ble eluert med en lineær gradient bestående av NaCl (0-1.0 M i 150 ml) i den samme bufferen. Fraksjonene ble samlet og analysert ved elektroforese på 10% SDS-polyakrylamidgeler. Coomassie-blue-farging av gelen ble brukt til å identifisere gp70R-delta proteinet. Fraksjoner 15 25-31, som eluerte ved omtrent 0.1 M NaCl, ble slått sammen og brukt ved immunisering.

Fremgangsmåte II.

20

For å senke hydrofobisiteten til gp70R- Δ , ble sulfhydrylgruppene alkylert med iodoacetamid og lysinresidene ble N-acylerte med citraconic anhydrid. Proteinet fremstilt som i eksempel 5 ble løst opp i 6 M guanidin-HCl i 50 mM borat, pH 9.0, 0.5% beta-merkaptoetanol (v/v). Iodoacetamid blir tilsatt ved et molart forhold på 1:1 (iodoacetamid : totale sulfhydrylgrupper). Alkyleringen ble utført i mørke i 1 time ved romtemperatur. Alkyleringen av alle sulfhydrylgrupper (i proteinet og beta-merkaptoetanol) ble undersøkt med DTNB (Ellmans reagens) for å forsikre fullstendig alkylering. 25 30 Proteinkonsentrasjonen ble justert til 2 mg/ml.

Proteinet ble citraconylert i mørke ved tilsetting av citracon-anhydrid (0.0022 ml per mg protein; omtrent 50 molart overskudd over frie lysiner). Preparatet ble dialysert flere ganger i mørket mot 50 mM borat, pH 9.0. Fullføring av acyleringen av protein-lysingruppene ble bestemt ved reaksjon med trinitrobenzen sulfonsyre (TNBS) som måler 35

gjenværende frie lysingrupper. TNBS (200 μ l av 10 mM) ble satt til 200 μ g alkylert, citraconylert, dialysert gp70R-delta i 1 ml 50 mM natriumborat, pH 9.0. Blandingen ble inkubert 2 timer i mørke ved 40°C, og reaksjonen quenchet med 0.5 ml 1 N HCl og 0.5 ml 1% SDS, og absorbansen ble lest ved 340 nm. Den molare ekstinksjonskoeffisienten ved 340 nm for TNP-lysin er 10,4000.

Rensing av den alkylerte, citraconylerte gp70R-delta ble utført ved pH 9.0 for å forhindre deblokkering av lysingrupperne. Urea med en final konsentrasjon på 4 M ble tilsatt til det modifiserte proteinet. Proteinet ble konsentrert til 3 mg/ml ved ultrafiltrering og applisert på en Sepharose 6B-Cl kolonne (1.5 x 86 cm). gp70R-delta proteinet ble eluert ved en elueringshastighet på 6.6 ml/hr med 4 M urea, 50 mM natriumborat, pH 9.0. Fraksjonene (5.3 ml/fraksjon) ble samlet og gp70R-delta ble bestemt ved proteinanalyse og SDS-polyakrylamidelektroforese til å være i fraksjonene 13-15.

Citraconyleringen av gp70R-delta ble reversert ved dialysering av 5 ml alkylert, citraconylert gp70R-delta (1.0 mg/ml) mot 6 M urea i 50 mM natriumcitrat, pH 5.5 i 48 timer ved romtemperatur. gp70R-delta ble dialysert mot 6 M urea i 100 mM natrium bikarbonat, pH 8.0 og proteinkonsentrasjon justert til 0.8 mg/ml før absorpsjon til aluminiumhydroksyd.

Fremgangsmåte III.

En modifikasjon av ovenfor nevnte rensing av alkylert, citraconylert gp70R- Δ ble utviklet. Kort fortalt, alkylert, citraconylert gp70R-delta ble modifisert og dialysert mot 50 mM natriumborat, pH 9.0 som beskrevet ovenfor. Urea ble tilsatt til en final konsentrasjon på 8.0 M. Proteinet ble konsentrert ved ultrafiltrering med en PM-30 membran som ga 2.5 mg protein/ml. Proteinløsningen ble applisert på en Sephacryl S-400 kolonne (1.5 x 90 cm) i en 50 mM natriumborat-buffer, pH 9.0 inneholdende 8 M urea og eluert med

samme buffer. Fraksjonene (2.9 ml/fraksjon) ble samlet og fraksjoner 34-37 inneholdende gp70R-delta ble slått sammen. 21 mg protein fra disse fraksjonene ble fortynnet til en final konsentrasjon på 4M urea med 50 mM natriumborat, pH 9.0 og applisert på en DEAE-TSK kolonne (1.5 x 11 cm). Proteinet ble eluert med en lineær gradient av NaCl (0-0.5 M) i 50 mM natriumborat, pH 9.0 inneholdende 4M urea. Tre ml fraksjoner ble samlet. Fraksjoner 89-95 inneholdende gp70R-delta ble slått sammen og 15 mg gp70R-delta ble oppnådd.

Eksempel 7

FREMSTILLING AV RENSEDE SAPONINER

Vandige ekstrakter av Quillaja saponaria molina bark ble dialysert mot vann. De dialyserte ekstraktene ble ekstrahert med metanol og det metanol-løselige ekstraktet ble videre fraksjonert på silikagel-kromatografi og ved revers fase høytrykks-væskekromatografi (RP-HPLC). De individuelle saponinene ble separert ved revers fase HPLC. Minst 22 topper som var detekterbare ved brytningsindeksen (betegnet QA-1 til QA-22) var mulig å separere. Hver topp korresponderte til en karbohydrat-topp og viste bare et enkelt bånd på revers fase tynn-skikt kromatografi. De individuelle komponentene ble identifiserte ved retensjonstid på en Vydac C₄ HPLC kolonne som følger:

<u>Topp</u>	<u>Retensjonstid (minutter)</u>
QA-1	løsningsfront
QA-2	4.6
QA-3	5.6
QA-4	6.4
QA-5	7.2
QA-6	9.2
QA-7	9.6
QA-8	10.6
QA-9	13.0
QA-10	17.2
QA-11	19.0
QA-12	21.2
QA-13	22.6
QA-14	24.0
QA-15	25.6

QA-16	28.6
QA-17	35.2
QA-18	38.2
QA-19	43.6
QA-20	47.6
QA-21	51.6
QA-22	61.0

5

Fraksjoner som inneholdt hemolytisk aktivitet, som indikerer saponinaktivitet, ble rekromatografert på RP-HPLC. Immun adjuvans-aktivitet ble testet ved å måle evnen som de rensede saponinene har til å øke immunresponsen i mus mot eksogent administrerte antigener. De rensende saponinene demonstrerte adjuvans-effekter ved lavere doser enn råekstraktene. Spesielt, de dominerende saponinene i barkekstrakt (QA-7, QA-17, og QA-18) demonstrerte adjuvans-aktivitet ved doser på 4.5 µg karbohydrat eller mindre (analysert ved anthrone). De rensede saponinene ble videre karakterisert ved karbohydrat-innhold, revers fase og normal fase TLC, UV, og infrarødt spekter.

10

15

20

25

Milligrammengder av QA-7, QA-17, og QA-18 ble rensert fra Superfos Quil-A ved fremgangsmåten beskrevet nedenfor. Et g "Quil-A" ble suspendert i 75 ml metanol og varmet ved 60°C i 15 minutter og filtrert. Det uoppløste materialet ble ekstrahert for annen gang med 50 ml metanol ved 60°C og filtrert. Filtratene ble fordampet til tørrhet på en rotaevaporator. En LiChroprep Silica Si 60 kolonne (E.M. Science, 25 mm ID x 310 mm L, 40-63 µm partikkelstørrelse) ble pre-ekvilibrert i 40 mM eddiksyre i kloroform/metanol/vann (62/32/6, v/v/v).

30

35

Den tørkede "Quil-A" ble løst opp i 5 ml kolonne-oppløsning og eluert gjennom kisel isokratisk i dette løsningssystemet ved en elueringshastighet på 1 ml/min. Karbohydratanalyser, tynn-skikt kromatografi, og HPLC ble brukt til å detektere fraksjonene for QA-7, QA-17, og QA-18. Fraksjonene 60-90 hadde forøkte mengder av QA-8 og QA-18 mens 150-190 hadde forøkte mengder av QA-7 og QA-17. Disse fraksjonene ble

slått sammen og hurtigfordampet før videre rensing ved RP-HPLC på Vydac C4 (figur 9) ved bruk av en metanolgradient til å eluere de rene adjuvantene.

Eksempel 8

IMMUNISERING AV KATTUNGER MED gp70R

5 Ti kattunger, med alder på seks til åtte uker ble brukt i immuniseringseksperimentene. Før immuniseringen, ble alle
10 dyrene testet og ble funnet å være negative for FeLV antistoffer.

Dyrene ble delt inn i to grupper og immunisert med enten gp70R Preparat I eller gp70R Preparat II fremstilt som
15 beskrevet i eksempel 3. Begge dyregruppene ble immunisert med 100 µg av den hensiktsmessige gp70R preparatet emulgert i Freund's komplette adjuvans. Dyrene ble immuniserte parenteralt tre ganger med intervaller på 21 dager. 21 dager etter den siste immuniseringen, ble begge dyregruppene tilført 400
20 katte sarcoma virus (FeSV) partikler per dyr.

Etter hver immunisering, ble hvert dyr målt for antistoffnivåer til FeLV og for nivåer av nøytraliserende antistoffer til FeLV. Fjorten til enogtyve dager etter utsetting for
25 FeSV, i tillegg til antistofftesting, ble dyrene undersøkt for tilstedeværelse av virus i serum og dannelsen av svulster. Tilstedeværelse av virus i serum ble målt ved virus-titrering (DeNoronha et al., Journal of the National Cancer Institute 58:129-130 (1977)), og ELISA ved bruk av antistoff
30 som var spesifikke for gruppen antigen (p27) til FeLV som også er felles med FeSV. Resultatene av dette eksperimentet er vist i Tabell 1.

Selv om alle ni dyrene i begge gruppene, som var i live i
35 løpet av studiet, produserte antistoff til gp70R, viste bare de dyr i Gruppe I som ble immunisert med Preparat I noen synlig motstandsgrad til utsetting for virus med FeSV. Mulig-

heten som et dyr hadde til å fremstille antistoffer som kunne nøytralisere FeLV hang direkte sammen med muligheten som et dyr hadde til å vise motstandsdyktig til utvikling av svulster og viremi.

5

10

15

20

25

30

35

TABELL I

Kattens respons til immunisering med gp70R

Vaksine	Katt	Pre-utsetting antistoff titer	Svulst tilstede	TilstedeværelseViral	
				av virus	nøytralisasjon ^b
				Titer ^a	Elisa 1:2C1:4
	11	400	+	0 1 ⁺	0 0
	22	400	0	0 0	50 5
PREP I	24	200	0	0 0	100 99
	25	800	0	0 0	99 98
	32	800	+	330 3+	0 0
	12	1600	+	300 3+	0 0
	13		DØD		
PREP II	21	800	+	9 3+	0 0
	23	400	+	200 3+	0 0
	31	800	+	100 3+	0 0

aFoci formende enheter
 bI prosent
 cserum fortynning

Eksempel 9

IMMUNISERING MED ALUMINIUMHYDROKSYD-ABSORBERT

gp70R- Δ

5 Aluminiumhydroksyd som har en adjuvant effekt for mange proteiner og som vanligvis brukes i vaksiner ble brukt som en bærer for gp70R- Δ . gp70R- Δ fremstilt med fremgangsmåte I i eksempel 6 ovenfor absorberes sterkt til 10% aluminiumhydroksyd med tilstedeværelse av 50 mM Tris-Cl, pH 8.0
10 inneholdende 6 M urea. Omtrent 3 μ g gp70R- Δ ble absorbert per 100 μ g aluminiumhydroksyd. gp70R- Δ absorbert til aluminiumhydroksyd ble vasket med fosfatbufret saltvann (PBS), resuspendert i PBS og brukt til immunisering av dyr.

15 CD-1-mus (8-10 uker gamle) ble immuniserte intradermalt med gp70R- Δ absorbert til Al(OH)₃ i et totalt volum på 200 μ l PBS ved tilstedeværelse eller uten HPLC-rensede saponiner QA-17 eller QA-18 eller en blanding av QA-17 og QA-18.20 til 25 μ g gp70R- Δ ble injisert per dose. HPLC-rensede saponiner QA-
20 17 eller QA-18 eller en blanding av QA-17 og QA-18 ble brukt ved en tørr vektdose på 10 μ g. To mus ble injisert for hver formulering. Mus ble gitt en forsterket (booster) injeksjon bestående av gp70R- Δ /aluminiumhydroksyd seks uker etter den opprinnelige injeksjonen. Museserum ble analysert for
25 reaktivitet til FEA, en FeLV subgruppe A, ved 2, 4, og 8 ukers post-immunisering ved bruk av en ELISA immunoanalyse. Fire uker etter immuniseringen, ble en anti-FeLV respons utløst av gp70R- Δ observert. HPLC-renset saponin adjuvantene QA-17 og QA-18 forsterket denne responsen. Responsen var to
30 ganger større ved fire ukers post-immunisering med tilstedeværelse av QA-17 sammenlignet med immunisering uten saponinadjuvans. Resultatene av dette eksperimentet er vist i figur 10.

35 Anti-FEA IgG ble analysert ved bruk av en ELISA-analyse. FEA-virus (10 μ g/ml i PBS) ble absorbert til Immulon II plater over natt ved 4°C (100 μ l/brønn). Platene ble vasket med PBS

og uspesifikk IgG binding ble blokkert ved 1 times inkubasjon med 10% normal geitoserum i PBS (100 μ l/brønn) ved romtemperatur. Platene ble deretter vasket med 0.05% Tween-20 i destillert vann. Serum ble fortynnet i 10% normal geitoserum i PBS og inkubert i 1 time ved romtemperatur på platen med serumfortynninger på 10, 10², 10³ og 10⁴ (100 μ l/brønn). Etter vasking av platen med 0.05% Tween-20 i destillert vann, ble det inkubert i 30 minutter ved romtemperatur med 100 μ l/brønn peroksidase-konjugert geit anti-muse IgG fortynnet 1/5000 i PBS (Boehringer-Mannheim). Etter vasking av platene med 0.05% Tween-20 i destillert vann, ble IgG-mengden bestemt ved peroksidase-reaksjon med 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin fra absorbansen ved 450 nm bestemt på en Dynatech mikrotiterplate-avleser.

Eksempel 10

IMMUNISERING MED ALUMINIUMHYDROKSYD-ABSORBERT
gp70R- Δ

CD-1 mus (8-10 uker gamle) ble immunisert intradermalt med 15 μ g/dose alkylert gp70R- Δ renset ved fremgangsmåte II i eksempel 6 (absorbent til aluminiumhydroksyd som beskrevet i eksempel 6) i 200 μ l PBS. HPLC-rensede adjuvanter QA-7, QA-17, QA-18 og blandinger av de tre adjuvantene ble brukt ved tørr vektdose på 10 μ g. Tre mus ble injisert for hver formulering. Musoserum ble analysert ved ELISA ved 2 og 4 ukers post-immuniseringer for reaktivitet til FEA som beskrevet i eksempel 9. Som immuniseringen med umodifisert gp70R- Δ vist i eksempel 9, utløste immunisering med alkylert gp70R- Δ en anti-FeLV viral respons etter fire ukers-immunisering. HPLC-rensede adjuvanter QA-7, QA-17, QA-18 øker immunresponsen sammenlignet med immunisering uten saponinadjuvanter. QA-17 og blandinger av QA-17 og QA-18 induserte høyest respons, med endepunkt-titert som var nesten to ganger større enn immunisering uten saponinadjuvans. Resultatene av disse eksperimentene er summert i figur 11.

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning som kan beskytte en katt overfor felin leukemi virus (FeLV), k a r a k t e r i s e r t v e d å blande sammen en immunologisk effektiv mengde FeLV subgruppe A gp70R- Δ eller en biologisk aktiv analog derav og en vesentlig ren saponin adjuvant valgt fra gruppen bestående av QA-7, QA-17,
10 QA-18 og QA-21.

2.

15 Fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning som kan beskytte en katt overfor felin leukemi virus (FeLV), k a r a k t e r i s e r t v e d å blande en immunologisk effektiv mengde FeLV subgruppe A gp70R eller en biologisk aktiv analog derav og en vesentlig ren saponin adjuvant valgt fra gruppen bedstående av QA-7, QA-17, QA-18
20 og QA-21.

3.

25 Fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning som kan beskytte en katt overfor felin leukemi virus (FeLV), k a r a k t e r i s e r t v e d å blande en immunogen effektiv mengde FeLV subgruppe A gp90R eller en biologisk aktiv analog derav og en vesentlig ren saponin adjuvant valgt fra gruppen bestående av QA-7, QA-17, QA-18 og
QA-21.

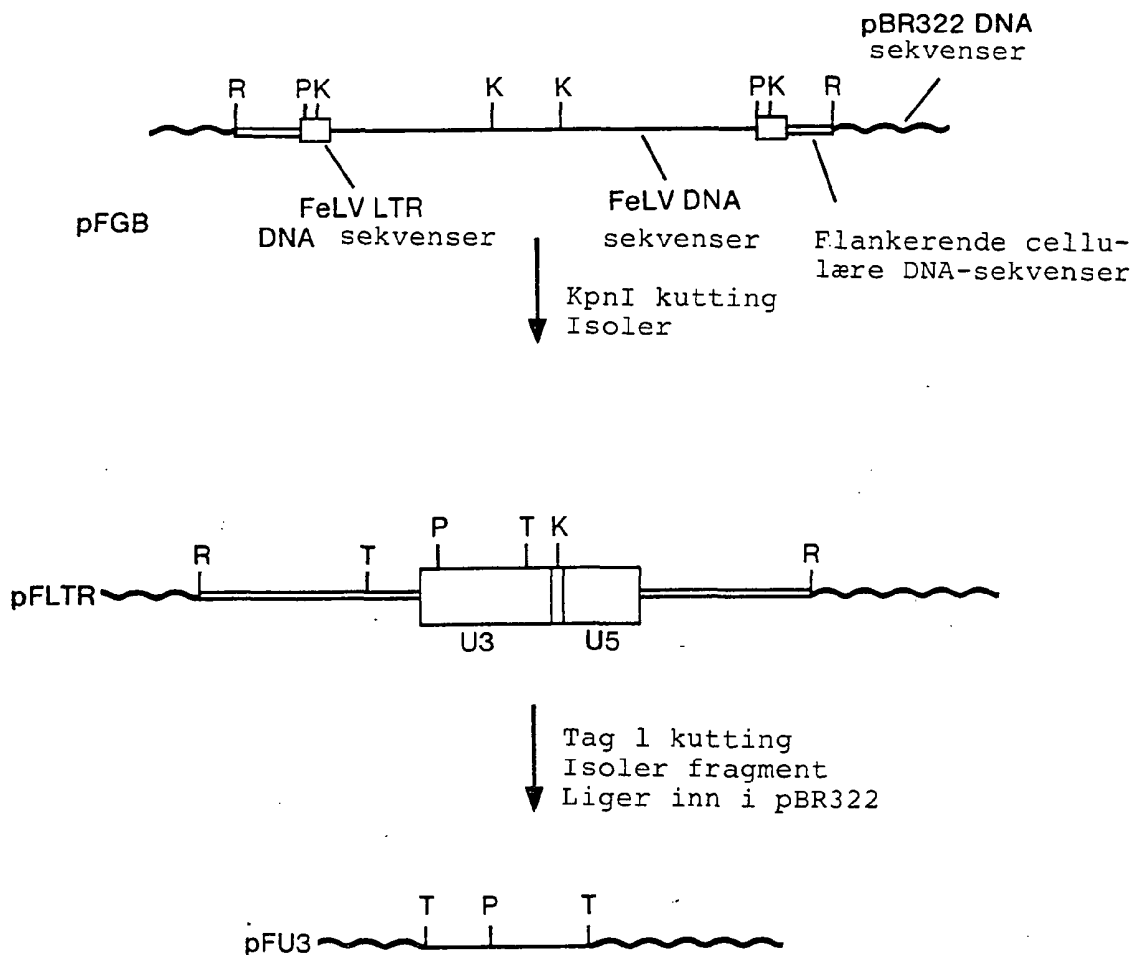
4.

30 Fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning som kan beskytte katt overfor felin leukemi virus (FeLV), k a r a k t e r i s e r t v e d å blande en immunogen effektiv mengde FeLV ved subgruppe A gp70R- Δ sammen
35 med saponin adjuvant QA-21 og aluminiumhydroksid.

Fig 1

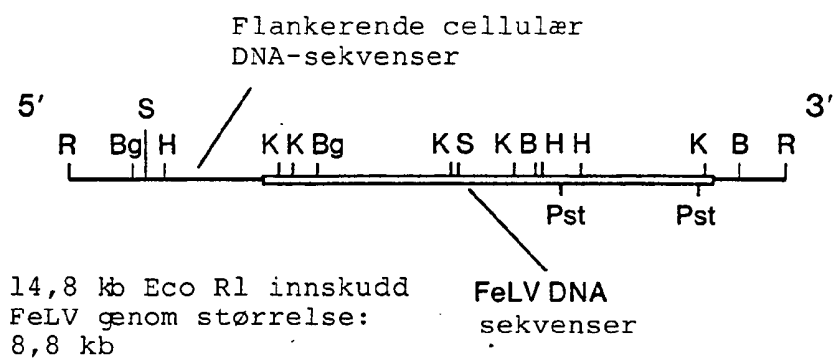
1/28

Eksogen FeLV Probe



2/28

Fig 2



176996

3/28

Fig 3



Fig 4 (side 1 av 6)

TRANSLATERT SEKVENNS AV FEA-3281

C TGC AGG ACC AAC CAC CAA TCA AGA CCT CTC GGA CAG CCC CAG CTC AGA CGA TCC ATC AAC	61
ATG GAA AGT CCA ACG CAC CCA AAA CCC TCT AAA GAT AAG ACT CTC TCG TGG AAC TTA GTG	121
Met Glu Ser Pro Thr His Pro Lys Pro Ser Lys Asp Lys Thr Leu Ser Trp Asn Leu Val	
TTT CTG GTG GGG ATC TTA TTC ACA ATA GAC ATA GSA ATG GCC AAT CCT AGT CCA CAC CAA	181
Phe Leu Val Gly Ile Leu Phe Thr Ile Asp Ile Gly Met Ala Asn Pro Ser Pro His Gln	4/28
ATA TAT AAT GTA ACT TGG GTA ATA ACC AAT GTA CAA ACT AAC ACC CAA GCT AAT GCC ACC	241
Ile Tyr Asn Val Thr Trp Val Ile Thr Asn Val Gln Thr Asn Thr Gln Ala Asn Ala Thr	
TCT ATG TTA GGA ACC TTA ACC GAT GCC TAC CCT ACC CTA CAT GTT GAC CTA TGT GAC CTA	301
Ser Met Leu Gly Thr Leu Thr Asp Ala Tyr Pro Thr Leu His Val Asp Leu Cys Asp Leu	
GTG GGA AAC ACC TGG GAA CCT ATA GTC CTA GAT CCA ACC AAT GTA AAA CAC GGG GCA CGT	361
Val Gly Asn Thr Trp Glu Pro Ile Val Leu Asp Pro Thr Asn Val Lys His Gly Ala Arg	

176996

Fig 4 (side 2 av 6)

TAC TCC ICC TCA AAG TAT GGA TGT AAA ACT ACA GAT AGA AAA CAG CAA CAA ACA TAC 421
Tyr Ser Ser Lys Tyr Gly Cys Lys Thr Asp Arg Lys Lys Gln Gln Thr Tyr

CCC TTT TAC GTC TGC CCC GGA CAT GCC CCC TCG CTG GGG CCA AAG GGA ACA CAC TGT GGA 481
Pro Phe Tyr Val Cys Pro Gly His Ala Pro Ser Leu Gly Pro Lys Gly Thr His Cys Gly

GGG GCA CAA GAT GGG TTT TGT GCC GCA TGG GGA TGT GAG ACC ACC GGA GAA GCT TGG TGG 541
Gly Ala Gln Asp Gly Phe Cys Ala Ala Trp Gly Cys Glu Thr Thr Gly Glu Ala Trp Trp 5/28

AAG CCC TCC TCA TGG GAC TAT ATC ACA GTA AAA AGA GGG AGT AGT CAG GAC AAT AGC 601
Lys Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Ile Thr Val Lys Arg Gly Ser Ser Gln Asp Asn Ser

TGT GAG GGA AAA TGC AAC CCC CTG ATT TTG CAG TTC ACC CAG AAG GGA AGA CAA GCC TCT 661
Cys Glu Gly Lys Cys Asn Pro Leu Ile Leu Gln Phe Thr Gln Lys Gly Arg Gln Ala Ser

TGG GAC GGA CCT AAG ATG TGG GGA TTG CGA CTA TAC CGT ACA GGA TAT GAC CCT ATC GCC 721
Trp Asp Gly Pro Lys Met Trp Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Tyr Asp Pro Ile Ala

Fig 4 (side 3 av 6)

TTA TTC ACG GTG TCC CGG CAG GTG TCA ACC ATT ACG CCG CCT CAG GCA ATG GGA CCC AAC 781
Leu Phe Thr Val Ser Arg Gln Val Ser Thr Ile Thr Pro Pro Gln Ala Met Gly Pro Asn

CTA GTC TTA CCT GAT CAA AAA CCC CCA TCC CGA CAA TCC CAA ACA GGG TCC AAA GTG GCG 841
Leu Val Leu Pro Asp Gln Lys Pro Pro Ser Arg Gln Ser Gln Thr Gly Ser Lys Val Ala

ACC CAG ACG CTC CAA ACG AAT GAA ACG GCC TCA AGG TCT GTT GCC CCC ACC ACC GTG GTT 901
Thr Gln Arg Leu Gln Thr Asn Glu Ser Ala Ser Arg Ser Val Ala Pro Thr Thr Val Val

6/28

CCC AAA CCG ATT GGG ACC GGA GAT ACG TTA ATA AAT TTA GTA CAA GGG ACA TAC CTA GCC 961
Pro Lys Arg Ile Gly Thr Gly Asp Arg Leu Ile Asn Leu Val Gln Gly Thr Tyr Leu Ala

TTA AAT GCC ACC GAC CCC AAC AAA ACT AAA GAC TGT TGG CTC TGC CIG GTT TCT CGA CCA 1021
Leu Asn Ala Thr Asp Pro Asn Lys Thr Lys Asp Cys Trp Leu Cys Leu Val Ser Arg Pro

CCC TAT TAC GAA GGG ATT GCA ATC TTA GGT AAC TAC AGC AAC CAA ACA AAC CCC CCC CCA 1081
Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Ala Ile Leu Gly Asn Tyr Ser Asn Gln Thr Asn Pro Pro Pro

176996

Fig 4 (side 4 av 6)

TCC TGC CTA TCT ACT CCG CAA CAC AAA CTG ACC ATA TCT GAA GTA TCA GGG CAA GGA CTG 1141
Ser Cys Leu Ser Thr Pro Gln His Lys Leu Thr Ile Ser Glu Val Ser Gly Gln Gly Leu

TGC ATA GGG ACT GTT CCT AAG ACC CAC CAG GCT TTG TGC AAT GAG ACA CAA CAG GGA CAT 1201
Cys Ile Gly Thr Val Pro Lys Thr His Gln Ala Leu Cys Asn Glu Thr Gln Gln Gly His

ACA GGG GCG CAC TAT CTA GCC GCC CCC AAT GGC ACC TAT TGG GCC TGT AAC ACT GGA CTG 1261
Thr Gly Ala His Tyr Leu Ala Ala Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Ala Cys Asn Thr Gly Leu

7/28

ACC CCA TGC ATT TCC ATG GCG GTG CTC AAT TGG ACC TCT GAT TTT TGT GTC TTA ATC GAA 1321
Thr Pro Cys Ile Ser Met Ala Val Leu Asn Trp Thr Ser Asp Phe Cys Val Leu Ile Glu

TTA TGG CCC AGA GTG ACT TAC CAT CAA CCC GAA TAT GTG TAC ACA CAT TTT GCC AAA GCT 1381
Leu Trp Pro Arg Val Thr Tyr His Gln Pro Glu Tyr Val Tyr Thr His Phe Ala Lys Ala

GTC AGG TTC CGA AGA GAA CCA ATA TCA CTA ACT GTT GCC CTC ATG TTG GGA GGA CTC ACT 1441
Val Arg Phe Arg Arg Glu Pro Ile Ser Leu Thr Val Ala Leu Met Leu Gly Gly Leu Thr

176996

Fig 4 (side 5 av 6)

GTA GGG GGC ATA GCC GCG GGG GTC GGA ACA GGG ACT AAA GCC CTC CTT GAA ACA GCC CAG 1501
Val Gly Gly Ile Ala Ala Gly Val Gly Thr Gly Thr Lys Ala Leu Leu Glu Thr Ala Gln

TTC AGA CAA CTA CAA ATG GCC ATG CAC ACA GAC ATC CAG GCC CTA GAA GAG TCA ATT AGT 1561
Phe Arg Gln Leu Gln Met Ala Met His Thr Asp Ile Gln Ala Leu Glu Ser Ile Ser

GCC TTA GAA AAG TCC CTG ACC TCC CTT TCT GAA GTA GTC TTA CAA AAC AGA CCG GGC CTA 1621
Ala Leu Glu Lys Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu 8/28

GAT ATT CTA TTC TTA CAA GAG GGA GGG CTC TGT GCC GCA TTA AAA GAA GAA TGT TGC TTC 1681
Asp Ile Leu Phe Leu Gln Glu Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe

TAT GCG GAT CAC ACC GGA CTC GTC CGA GAC AAT ATG GCT AAA TTA AGA GAA AGA CTA AAA 1741
Tyr Ala Asp His Thr Gly Leu Val Arg Asp Asn Met Ala Lys Leu Arg Glu Arg Leu Lys

CAG CCG CAA CAA CTA TTT GAC TCC CAA CAG GGA TGG TTT GAA GGA TGG TTC AAC AAG TCC 1801
Gln Arg Gln Gln Leu Phe Asp Ser Gln Gln Gly Trp Phe Glu Gly Trp Phe Asn Lys Ser

176996

Fig 4 (side 6 av 6)

CCC TGG TTC ACA ACC CTA ATT TCC TCC ATT ATG GGC CCC TTA CTA ATC CTA CTC CTA ATT 1861
Pro Trp Phe Thr Thr Leu Ile Ser Ser Ile Met Gly Pro Leu Leu Ile Leu Leu Leu Ile

CTC CTC TTC GGC CCA TGC ATC CTT AAC AGA TTA GTA CAA TTC GTA AAA GAC AGA ATA TCT 1921
Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser

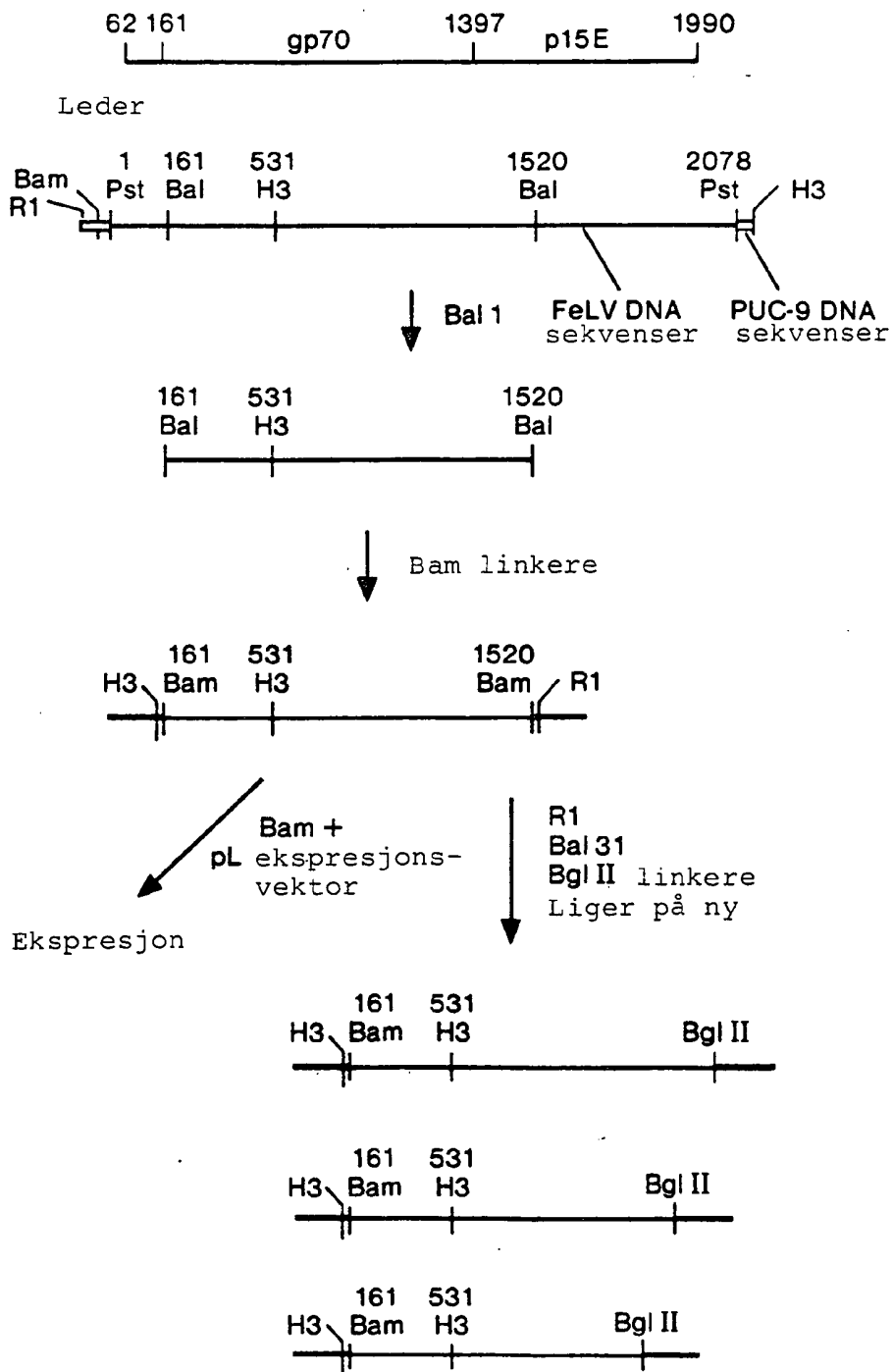
GTG GTA CAA GCC TTA ATT TTA ACC CAA CAG TAC CAA CAG ATA AAG CAA TAC GAT CCG GAC 1981
Val Val Gln Ala Leu Ile Leu Thr Gln Gln Tyr Gln Ile Lys Gln Tyr Asp Pro Asp 9/28

CGA CCA TGA TTT CCA ATT AAA TGT ATG ATT CCA TTT AGT CCC CAG AAA AAG GGG GGA ATG 2041
Arg Pro ---

CTA CCC CAA AAT TTA GCC AGC TAC TGC AG 2084

Fig 5

10/28



FELV KAPPESEKVENSER UTTRYKT I E. COLI
Rgp70-DELTA

Fig 6 (side 1 av 5)

	Vektor-sekvenser	Linker- FEA-3281	
		Sekvenser Nukleotid #162	
ATG GTT CGT GCA AAC AAA CGC AAC GAG GCT CIA CGA ATC GCG GAT CCC G CC AAT CCT AGT			786
Met Val Arg Ala Asn Lys Arg Asn Glu Ala Leu Arg Ile Ala Asp Pro Ala Asn Pro Ser			11 / 28
CCA CAC CAA ATA TAT AAT GTA ACT TGG GTA ATA ACC AAT GTA CAA ACT AAC ACC CAA GCT			846
Pro His Gln Ile Tyr Asn Val Thr Trp Val Ile Thr Asn Val Gln Thr Asn Thr Gln Ala			
AAT GCC ACC TCT ATG TTA GGA ACC TTA ACC GAT GCC TAC CCT ACC CTA CAT GTT GAC CIA			906
Asn Ala Thr Ser Met Leu Gly Thr Leu Thr Asp Ala Tyr Pro Thr Leu His Val Asp Leu			
TGT GAC CTA GTG GGA AAC ACC TGG GAA CCT ATA GTC CTA GAT CCA ACC AAT GTA AAA CAC			966
Cys Asp Leu Val Gly Asn Thr Trp Glu Pro Ile Val Leu Asp Pro Thr Asn Val Lys His			

176996

Fig 6 (side 2 av 5)

GGG GCA CGT TAC TCC TCC TCA AAG TAT GGA TGT AAA ACT ACA GAT AGA AAA AAA CAG CAA 1026
Gly Ala Arg Tyr Ser Ser Lys Tyr Gly Cys Lys Thr Asp Arg Lys Lys Gln Gln

CAA ACA TAC CCC TTT TAC GTC TGC CCC GGA CAT GCC CCC TCG CTG GGG CCA AAG GGA ACA 1086
Gln Thr Tyr Pro Phe Tyr Val Cys Pro Gly His Ala Pro Ser Leu Gly Pro Lys Gly Thr

CAC TGT GGA GGG GCA CAA GAT GGG TTT TGT GCC GCA TGG TGT GAG ACC ACC GGA GAA 1146
His Cys Gly Gly Ala Gln Asp Gly Phe Cys Ala Ala Trp Gly Cys Glu Thr Thr Gly Glu 12/28

GCT TGG TGG AAG CCC TCC TCA TGG GAC TAT ATC ACA GTA AAA AGA GGG AGT AGT CAG 1206
Ala Trp Trp Lys Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Ile Thr Val Lys Arg Gly Ser Ser Gln

GAC AAT AGC TGT GAG GGA AAA TGC AAC CCC CTG ATT TTG CAG TTC ACC CAG AAG GGA AGA 1266
Asp Asn Ser Cys Glu Gly Lys Cys Asn Pro Leu Ile Leu Gln Phe Thr Gln Lys Gly Arg

CAA GCC TCT TGG GAC GGA CCT AAG ATG TGG GGA TTG CGA CTA TAC CGT ACA GGA TAT GAC 1325
Gln Ala Ser Trp Asp Gly Pro Lys Met Trp Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Tyr Asp

Fig 6 (side 3 av 5)

CCT ATC GCC TTA TTC ACG GTG TCC CGG CAG GTG TCA ACC ATT ACG CCG CCT CAG GCA ATG 1386
Pro Ile Ala Leu Phe Thr Val Ser Arg Gln Val Ser Thr Ile Thr Pro Pro Gln Ala Met

GGA CCC AAC CTA GTC TTA CCT GAT CAA AAA CCC CCA TCC CGA CAA TCC CAA ACA GGG TCC 1446
Gly Pro Asn Leu Val Leu Pro Asp Gln Lys Pro Pro Ser Arg Gln Ser Gln Thr Gly Ser

AAA GTG GCG ACC CAG AGG CTC CAA ACG AAT GAA AGC GCC TCA AGG TCT GTT GCC CCC ACC 1506
Lys Val Ala Thr Gln Arg Leu Gln Thr Asn Glu Ser Ala Ser Arg Ser Val Ala Pro Thr 13/28

ACC GTG GTT CCC AAA CCG ATT GGG ACC GGA GAT AGG TTA ATA AAT TTA GTA CAA GGG ACA 1566
Thr Val Val Pro Lys Arg Ile Gly Thr Gly Asp Arg Leu Ile Asn Leu Val Gln Gly Thr

TAC CTA GCC TTA AAT GCC ACC GAC CCC AAC AAA ACT AAA GAC TGT TGG CTC TGC CTG GTT 1626
Tyr Leu Ala Leu Asn Ala Thr Asp Pro Asn Lys Thr Lys Asp Cys Trp Leu Cys Leu Val

TCT CGA CCA CCC TAT TAC GAA GGG ATT GCA ATC TTA GGT AAC TAC AGC AAC CAA ACA AAC 1686
Ser Arg Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Ala Ile Leu Gly Asn Tyr Ser Asn Gln Thr Asn

Fig 6 (side 4 av 5)

CCC CCC CCA TCC TGC CTA TCT ACT CCG CAA CAC AAA CTG ACC ATA TCT GAA GTA TCA GGG 1746
Pro Pro Pro Ser Cys Leu Ser Thr Pro Gln His Lys Leu Thr Ile Ser Glu Val Ser Gly

CAA GGA CTG TGC ATA GGG ACT GTT CCT AAG ACC CAC CAG GCT TTG TGC AAT GAG ACA CAA 1806
Gln Gly Leu Cys Ile Gly Thr Val Pro Lys Thr His Gln Ala Leu Cys Asn Glu Thr Gln

CAG GGA CAT ACA GGG GCG CAC TAT CTA GCC GCC CCC AAT GGC ACC TAT TGG GCC TGT AAC 1866
Gln Gly His Thr Gly Ala His Tyr Leu Ala Ala Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Ala Cys Asn 14/28

ACT GGA CTG ACC CCA TGC ATT TCC ATG GCG GTG CTC AAT TGG ACC TCT GAT TTT TGT GTC 1926
Thr Gly Leu Thr Pro Cys Ile Ser Met Ala Val Leu Asn Trp Thr Ser Asp Phe Cys Val

TTA ATC GAA TTA TGG CCC AGA GTG ACT TAC CAT CAA CCC GAA TAT GTG TAC ACA CAT TTT 1986
Leu Ile Glu Leu Trp Pro Arg Val Thr Tyr His Gln Pro Glu Tyr Val Tyr Thr His Phe

gp70 I p15E

GCC AAA GCT GTC AGG TTC CGA AGA I GAA CCA ATA TCA CTA ACT GTT GCC CTC ATG TTG GGA 2046
Ala Lys Ala Val Arg Phe Arg Arg I Glu Pro Ile Ser Leu Thr Val Ala Leu Met Leu Gly

176996

Fig 6 (side 5 av 5)

GGA CTC ACT GTA GGG GGC ATA GCC GCG GGG GTC GGA ACA GGG ACT AAA GCC CTC CTT GAA 2106
 Gly Leu Thr Val Gly Gly Ile Ala Ala Gly Val Gly Thr Gly Thr Lys Ala Leu Leu Glu

FEA-3281 Nukleotid#1520 | Linker og vektor-
 | | sekvenser

ACA GCC CAG TTC AGA CAA CTA CAA ATG G ICG GGA TCC TAG 2145
 Thr Ala Gln Phe Arg Gln Leu Gln Met Ala | Gly Ser ---- 15/28

FELV KAPPESEKVENSER UTTRYKT I E.COLI
Rgp70

	Linker- FEA-3281	
	sekvenser Nukleotid #162	
	Vektorsekvenser	
ATG GTT CGT GCA AAC AAA CGC AAC GAG GCT CTA CGA ATC GCG GAT CCC G CC AAT CCT AGT		786
Met Val Arg Ala Asn Lys Arg Asn Glu Ala Leu Arg Ile Ala Asp Pro Ala Asn Pro Ser		16/28
'CCA CAC CAA ATA TAT AAT GTA ACT TGG GTA ATA ACC AAT GTA CAA ACT AAC ACC CAA GCT		846
Pro His Gln Ile Tyr Asn Val Thr Trp Val Ile Thr Asn Val Gln Thr Asn Thr Gln Ala		
AAT GCC ACC TCT ATG TTA GGA ACC TTA ACC GAT GCC TAC CCT ACC CTA CAT GTT GAC CTA		906
Asn Ala Thr Ser Met Leu Gly Thr Leu Thr Asp Ala Tyr Pro Thr Leu His Val Asp Leu		
TGT GAC CTA GTG GGA AAC ACC TGG GAA CCT ATA GTC CTA GAT CCA ACC AAT GTA AAA CAC		966
Cys Asp Leu Val Gly Asn Thr Trp Glu Pro Ile Val Leu Asp Pro Thr Asn Val Lys His		

Fig 7 (side 2 av 4)

GGG GCA CGT TAC TCC TCC TCA AAG TAT GGA TGT AAA ACT ACA GAT AGA AAA AAA CAG CAA
Gly Ala Arg Tyr Ser Ser Lys Tyr Gly Cys Lys Thr Thr Asp Arg Lys Lys Gln Gln 1026

CAA ACA TAC CCC TTT TAC GTC TGC CCC GGA CAT GCC CCC TCG CTG GGG CCA AAG GGA ACA
Gln Thr Tyr Pro Phe Tyr Val Cys Pro Gly His Ala Pro Ser Leu Gly Pro Lys Gly Thr 1086

CAC TGT GGA GGG GCA CAA GAT GGG TTT TGT GCC GCA TGG GGA TGT GAG ACC ACC GGA GAA
His Cys Gly Ala Gln Asp Gly Phe Cys Ala Ala Trp Gly Cys Glu Thr Thr Gly Glu 1146

GCT TGG TGG AAG CCC TCC TCC TCA TGG GAC TAT ATC ACA GTA AAA AGA GGG AGT AGT CAG
Ala Trp Trp Lys Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Ile Thr Val Lys Arg Gly Ser Ser Gln 1206

GAC AAT AGC TGT GAG GGA AAA TGC AAC CCC CTG ATT TTG CAG TTC ACC CAG AAG GGA AGA
Asp Asn Ser Cys Glu Gly Lys Cys Asn Pro Leu Ile Leu Gln Phe Thr Gln Lys Gly Arg 1266

CAA GCC TCT TGG GAC GGA CCT AAG ATG TGG GGA TTG CGA CTA TAC CGT ACA GGA TAT GAC
Gln Ala Ser Trp Asp Gly Pro Lys Met Trp Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Tyr Asp 1326

Fig 7 (side 3 av 4)

CCT ATC GCC TTA TTC ACG GIG TCC CGG CAG GIG TCA ACC ATT ACG CCG CCT CAG GCA ATG 1386
Pro Ile Ala Leu Thr Val Ser Arg Gln Val Ser Thr Ile Thr Pro Pro Gln Ala Met

GGG CCC AAC CTA GTC TTA CCT GAT CAA AAA CCC CCA TCC CGA CAA TCC CAA ACA GGG TCC 1446
Gly Pro Asn Leu Val Leu Pro Asp Gln Lys Pro Pro Ser Arg Gln Ser Gln Thr Gly Ser

AAA GTG GCG ACC CAG AGG CTC CAA ACG AAT GAA AGC GCC TCA AGG TCT GTT GCC CCC ACC 1506
Lys Val Ala Thr Gln Arg Leu Gln Thr Asn Glu Ser Ala Ser Arg Ser Val Ala Pro Thr

ACC GIG GTT CCC AAA CGG ATT GGG ACC GGA GAT AGG TTA ATA AAT TTA GTA CAA GGG ACA 1566
Thr Val Val Pro Lys Arg Ile Gly Thr Gly Asp Arg Leu Ile Asn Leu Val Gln Gly Thr

TAC CTA GCC TTA AAT GCC ACC GAC CCC AAC AAA ACT AAA GAC TGT TGG CTC TGC CTG GTT 1626
Tyr Leu Ala Leu Asn Ala Thr Asp Pro Asn Lys Thr Lys Asp Cys Trp Leu Cys Leu Val

TCT CGA CCA CCC TAT TAC GAA GGG ATT GCA ATC TTA GGT AAC TAC AGC AAC CAA ACA AAC 1686
Ser Arg Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Ala Ile Leu Gly Asn Tyr Ser Asn Gln Thr Asn

18/28

176996

Fig 7 (side 4 av 4)

CCC CCC CCA TCC TGC CTA TCT ACT CCG CAA CAC AAA CTG ACC ATA TCT GAA GTA TCA GGG 1746
 Pro Pro Pro Ser Cys Leu Ser Thr Pro Gln His Lys Leu Thr Ile Ser Glu Val Ser Gly

CAA GGA CTG TGC ATA GGG ACT GTT CCT AAG ACC CAC CAG GCT TTG TGC AAT GAG ACA CAA 1806
 Gln Gly Leu Cys Ile Gly Thr Val Pro Lys Thr His Gln Ala Leu Cys Asn Glu Thr Gln

CAG GGA CAT ACA GGG GCG CAC TAT CTA GCC GCC CCC AAT GGC ACC TAT TGG GCC TGT AAC 1866
 Gln Gly His Thr Gly Ala His Tyr Leu Ala Ala Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Ala Cys Asn 19/28

ACT GGA CTG ACC CCA TGC ATT TCC ATG GCG GTG CTC AAT TGG ACC TCT GAT TTT TGT GTC 1926
 Thr Gly Leu Thr Pro Cys Ile Ser Met Ala Val Leu Asn Trp Thr Ser Asp Phe Cys Val

TTA ATC GAA TTA TGG CCC AGA GTG ACT TAC CAT CAA CCC GAA TAT GTG TAC ACA CAT TTT 1986
 Leu Ile Glu Leu Trp Pro Arg Val Thr Tyr His Gln Pro Glu Tyr Val Tyr Thr His Phe

FEA-3281 Nukleotid #1391 | Linker og vektorsekvenser

 | |
 GCC AAA GCT GTC AGG TTC C | CA GAT CCT AGG TAA
 Ala Lys Ala Val Arg Phe | Pro Asp Pro Arg ---

2019

176996

	Linker-	FEA-3281	
Vektorsekvenser	sekvenser	Nukleotid #162	
ATG GTT CGT GCA AAC AAA CGC AAC GAG GCT CTA CGA ATC GCG I GAT CCC G I CC AAT CCT AGT			786
Met Val Arg Ala Asn Lys Arg Asn Glu Ala Leu Arg Ile Ala I Asp Pro I Ala Asn Pro Ser			20 / 28
CCA CAC CAA ATA TAT AAT GTA ACT TGG GTA ATA ACC AAT GTA CAA ACT AAC ACC CAA GCT			846
Pro His Gln Ile Tyr Asn Val Thr Trp Val Ile Thr Asn Val Gln Thr Asn Thr Gln Ala			
AAT GCC ACC TCT ATG TTA GGA ACC TTA ACC GAT GCC TAC CCT ACC CTA CAT GTT GAC CTA			906
Asn Ala Thr Ser Met Leu Gly Thr Leu Thr Asp Ala Tyr Pro Thr Leu His Val Asp Leu			
TGT GAC CTA GTG GGA AAC ACC TGG GAA CCT ATA GTC CTA GAT CCA ACC AAT GTA AAA CAC			966
Cys Asp Leu Val Gly Asn Thr Trp Glu Pro Ile Val Leu Asp Pro Thr Asn Val Lys His			

Fig 8 (side 2 av 6)

GGG GCA CGT TAC TCC TCC TCA AAG TAT GGA TGT AAA ACT ACA GAT AGA AAA AAA CAG CAA 1026
Gly Ala Arg Tyr Ser Ser Tyr Gly Cys Lys Thr Asp Arg Lys Lys Gln Gln

CAA ACA TAC CCC TTT TAC GTC TGC CCC GGA CAT GCC CCC TCG CTG GGG CCA AAG GGA ACA 1086
Gln Thr Tyr Pro Phe Tyr Val Cys Pro Gly His Ala Pro Ser Leu Gly Pro Lys Gly Thr

CAC TGT GGA GGG GCA CAA GAT GGG TTT TGT GCC GCA TGG GGA TGT GAG ACC ACC GGA GAA 1146
His Cys Gly Gly Ala Gln Asp Gly Phe Cys Ala Ala Trp Gly Cys Glu Thr Thr Gly Glu 21 / 28

GCT TGG TGG AAG CCC TCC TCA TGG GAC TAT ATC ACA GTA AAA AGA GGG AGT AGT CAG 1206
Ala Trp Trp Lys Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Ile Thr Val Lys Arg Gly Ser Ser Gln

GAC AAT AGC TGT GAG GGA AAA TGC AAC CCC CTG ATT TTG CAG TTC ACC CAG AAG GGA AGA 1266
Asp Asn Ser Cys Glu Gly Lys Cys Asn Pro Leu Ile Leu Gln Phe Thr Gln Lys Gly Arg

CAA GCC TCT TGG GAC GGA CCT AAG ATG TGG GGA TTG CGA CTA TAC CGT ACA GGA TAT GAC 1326
Gln Ala Ser Trp Asp Gly Pro Lys Met Trp Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Tyr Asp

176996

Fig 8 (side 3 av 6)

CCT ATC GCC TTA TTC ACG GTG TCC CGG CAG GTG TCA ACC ATT ACG CCG CCT CAG GCA ATG 1386
Pro Ile Ala Leu Phe Thr Val Ser Arg Gln Val Ser Thr Ile Thr Pro Pro Gln Ala Met

GGA CCC AAC CTA GTC TTA CCT GAT CAA AAA CCC CCA TCC CGA CAA TCC CAA ACA GGG TCC 1446
Gly Pro Asn Leu Val Leu Pro Asp Gln Lys Pro Pro Ser Arg Gln Ser Gln Thr Gly Ser

AAA GTG GCG ACC CAG AGG CTC CAA ACG AAT GAA AGC GCC TCA AGG TCT GTT GCC CCC ACC 1506
Lys Val Ala Thr Gln Arg Leu Gln Thr Asn Glu Ser Ala Ser Arg Ser Val Ala Pro Thr 22/28

ACC GTG GTT CCC AAA CGG ATT GGG ACC GGA GAT AGG TTA ATA AAT TTA GTA CAA GGG ACA 1566
Thr Val Val Pro Lys Arg Ile Gly Thr Gly Asp Arg Leu Ile Asn Leu Val Gln Gly Thr

TAC CTA GCC TTA AAT GCC ACC GAC CCC AAC AAA ACT AAA GAC TGT TGG CTC TGC CTG GTT 1626
Tyr Leu Ala Leu Asn Ala Thr Asp Pro Asn Lys Thr Lys Asp Cys Trp Leu Cys Leu Val

TCT CGA CCA CCC TAT TAC GAA GGG ATT GCA ATC TTA GGT AAC TAC AGC AAC CAA ACA AAC 1686
Ser Arg Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Ala Ile Leu Gly Asn Tyr Ser Asn Gln Thr Asn

Fig 8 (side 4 av 6)

CCC CCC CCA TCC TGC CTA TCT ACT CCG CAA CAC AAA CTG ACC ATA TCT GAA GTA TCA GGG 1746
Pro Pro Pro Ser Cys Leu Ser Thr Pro Gln His Lys Leu Thr Ile Ser Glu Val Ser Gly

CAA GGA CTG TGC ATA GGG ACT GTT CCT AAG ACC CAC CAG GCT TTG TGC AAT GAG ACA CAA 1806
Gln Gly Leu Cys Ile Gly Thr Val Pro Lys Thr His Gln Ala Leu Cys Asn Glu Thr Gln

CAG GGA CAT ACA GGG GCG CAC TAT CTA GCC GCC CCC AAT GGC ACC TAT TGG GCC TGT AAC 1866
Gln Gly His Thr Gly Ala His Tyr Leu Ala Ala Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Ala Cys Asn 23/28

ACT GGA CTG ACC CCA TGC ATT TCC ATG GCG GTG CTC AAT TGG ACC TCT GAT TTT TGT GTC 1926
Thr Gly Leu Thr Pro Cys Ile Ser Met Ala Val Leu Asn Trp Thr Ser Asp Phe Cys Val

TTA ATC GAA TTA TGG CCC AGA GTG ACT TAC CAT CAA CCC GAA TAT GTG TAC ACA CAT TTT 1986
Leu Ile Glu Leu Trp Pro Arg Val Thr Tyr His Gln Pro Glu Tyr Val Tyr Thr His Phe

gp70 | p15E

GCC AAA GCT GTC AGG TTC CGA AGA I GAA CCA ATA TCA CTA ACT GTT GCC CTC ATG TTG GGA 2046
Ala Lys Ala Val Arg Phe Arg Arg I Glu Pro Ile Ser Leu Thr Val Ala Leu Met Leu Gly

176996

Fig 8 (side 5 av 6)

GGA CTC ACT GTA GGG GGC ATA GCC GCG GGG GTC GGA ACA GGG ACT AAA GCC CTC CTT GAA Gly Leu Thr Val Gly Gly Ile Ala Ala Gly Val Gly Thr Gly Thr Lys Ala Leu Leu Glu	2106
ACA GCC CAG TTC AGA CAA CTA CAA ATG GCC ATG CAC ACA GAC ATC CAG GCC CTA GAA GAG Thr Ala Gln Phe Arg Gln Leu Gln Met Ala Met His Thr Asp Ile Gln Ala Leu Glu Glu	2166
TCA ATT AGT GCC TTA GAA AAG TCC CTG ACC TCC CTT TCT GAA GTA GTC TTA CAA AAC AGA Ser Ile Ser Ala Leu Glu Lys Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg	2226
CGG GGC CTA GAT ATT CTA TTC TTA CAA GAG GGA GGG CTC TGT GCC GCA TTA AAA GAA GAA Arg Gly Leu Asp Ile Leu Phe Leu Gln Gln Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Lys Glu Glu	2286
TGT TGC TTC TAT GCG GAT CAC ACC GGA CTC GTC CGA GAC AAT ATG GCT AAA TTA AGA GAA Cys Cys Phe Tyr Ala Asp His Thr Gly Leu Val Arg Asp Asn Met Ala Lys Leu Arg Glu	2346
AGA CTA AAA CAG CGG CAA CAA CTA TTT GAC TCC CAA CAG GGA TGG TTT GAA GGA TGG TTC Arg Leu Lys Gln Arg Gln Gln Leu Phe Asp Ser Gln Gln Gly Trp Phe Glu Gly Trp Phe	2406

24 / 28

176996

Fig 8 (side 6 av 6)

2466

AAC AAG TCC CCC TGG TTC ACA ACC CTA ATT TCC TCC ATT ATG GGC CCC TTA CTA ATC CTA
Asn Lys Ser Pro Trp Phe Thr Leu Ile Ser Ser Ile Met Gly Pro Leu Leu Ile Leu

2526

CTC CTA ATT CTC CTC TTC GGC CCA TGC ATC CTT AAC AGA TTA GTA CAA TTC GTA AAA GAC
Leu Leu Ile Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys Asp

2586

AGA ATA TCT GTG GTA CAA GCC TTA ATT TTA ACC CAA CAG TAC CAA CAG ATA AAG CAA TAC
Arg Ile Ser Val Val Gln Ala Leu Ile Leu Thr Gln Gln Tyr Gln Gln Ile Lys Gln Tyr

25 / 28

FEA-3281

Nukleotid #1990

2604

GAT CCG GAC CGA CCA TGA
Asp Pro Asp Arg Pro ---

26 / 28

Fig 9

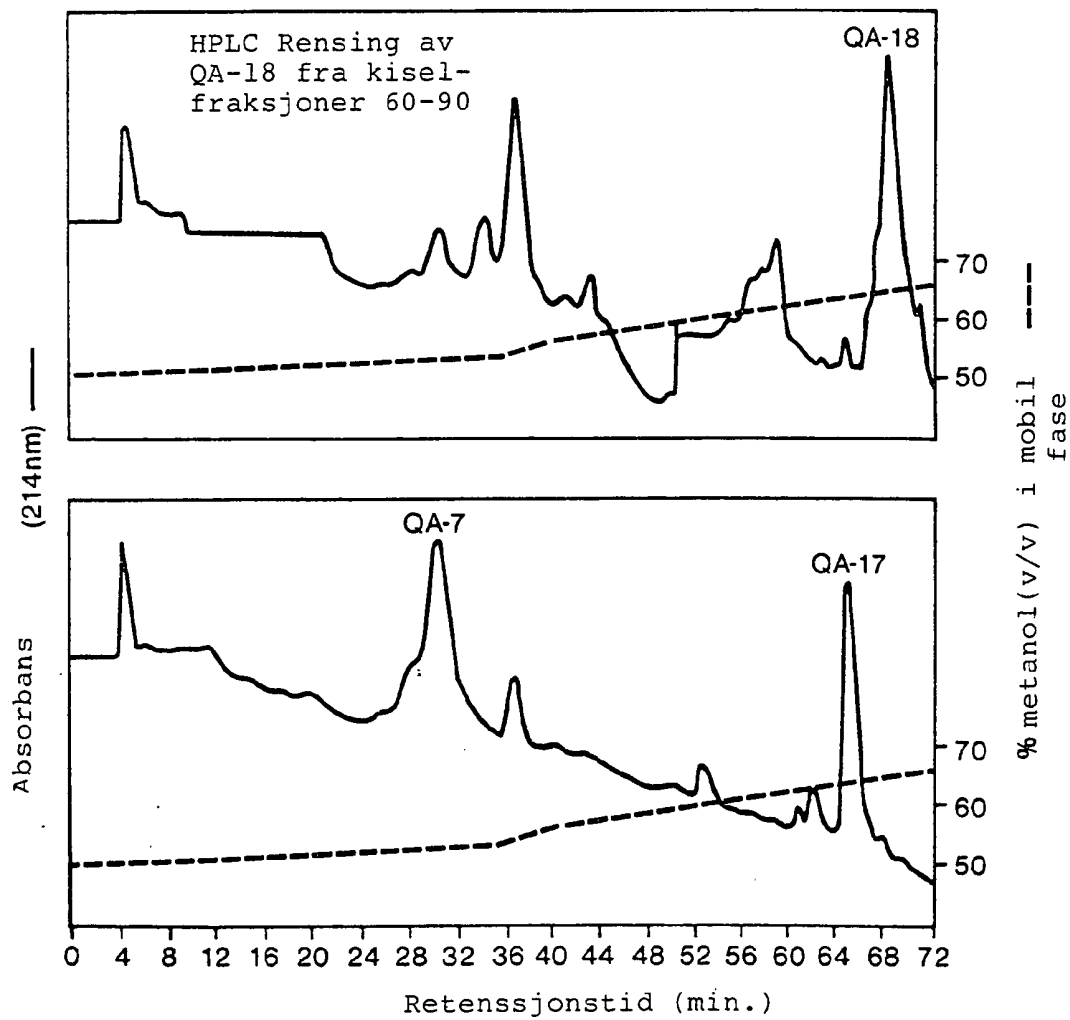


Fig 10

- 27 / 28

Anti-FeLV IgG ELISA

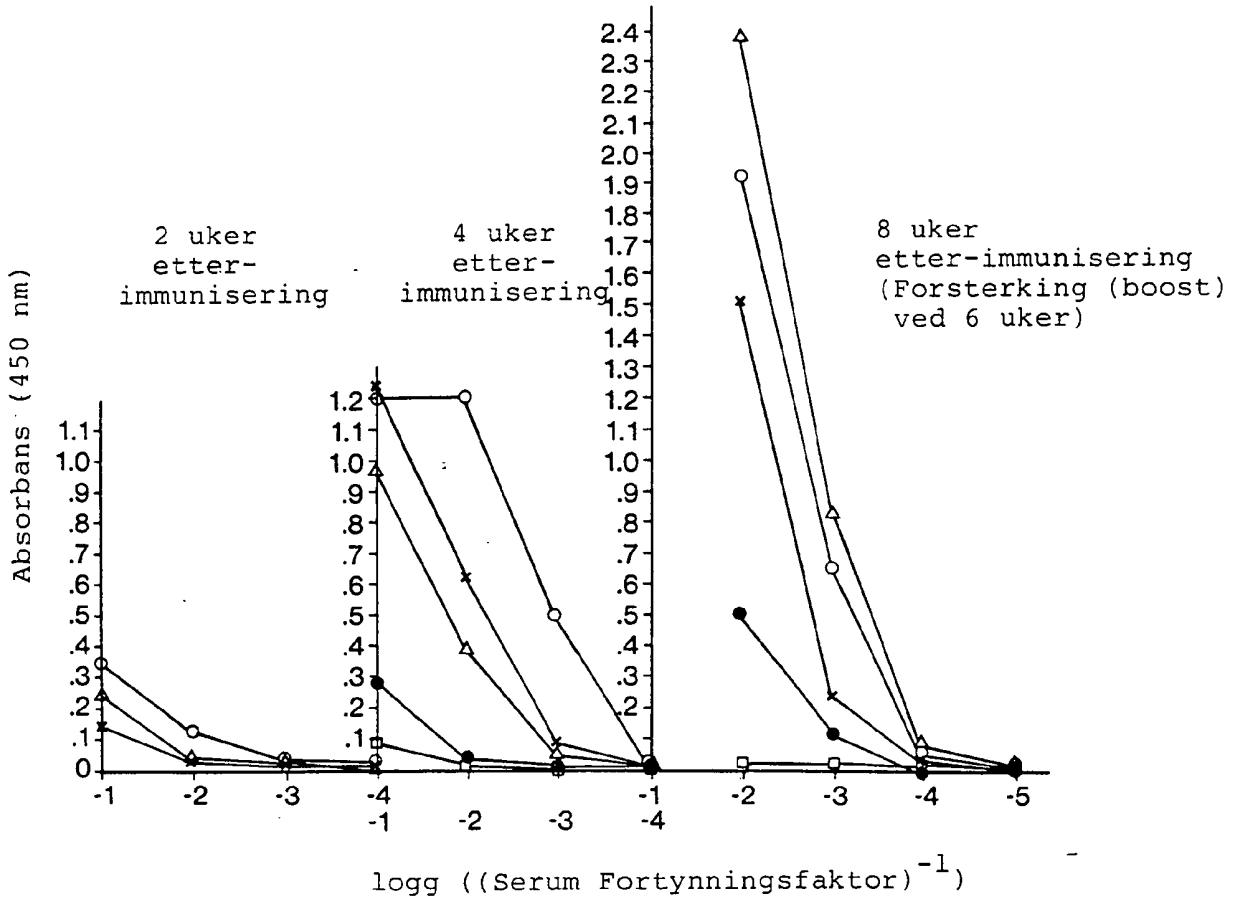
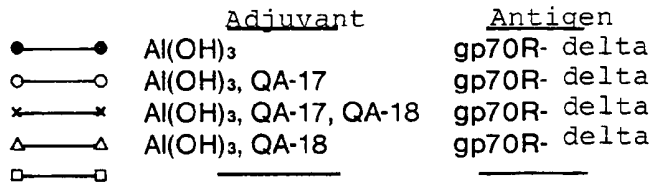


Fig 11

Anti-FeLV IgG ELISA

- | | | |
|-----|------------------------------------|--------------|
| ●—● | Al(OH) ₃ | gp70R- delta |
| ○—○ | Al(OH) ₃ , QA-17 | gp70R- delta |
| ×—× | Al(OH) ₃ , QA-18 | gp70R- delta |
| △—△ | Al(OH) ₃ , QA-7 | gp70R- delta |
| □—□ | Al(OH) ₃ , QA-17, QA-18 | gp70R- delta |
| ▽—▽ | Al(OH) ₃ , QA-7, QA-17 | gp70R- delta |
| ■—■ | Al(OH) ₃ , QA-7, QA-18 | gp70R- delta |
| ▲—▲ | | |

