

(19)



(10) **LT IP1792 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **IP1792** (51) Int. Cl. (2006): **C12N 15/09**
A61K 39/21
- (22) Paraiškos padavimo data: **1994 01 24** **C07K 1/00**
C07K 14/00
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 08 25** **C07K 14/005**
C07K 14/195
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: — **C07K 19/00**
C12N 15/40
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: — **C12N 15/86**
C12N 15/866
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: — **C12P 21/00**
G01N 33/569
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: — **G01N 33/577**
- (30) Prioritetas: **920197, 1986 10 16, US**
4223583, 1987 10 15, SU
- (71) Pareiškėjas:
MicroGeneSys, Inc., 1000 Research Parkway, Meriden, Connecticut 06450, US
- (72) Išradėjas:
Mark A. COCHRAN, US
Gale E. SMITH, US
Franklin VOLVOVITZ, US
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis“,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
AIDS viruso env baltymai, jų gamybos ir gryninimo būdai; rekombinantinis
vabzdžių bakulovirusas, vakcina prieš AIDS virusą, diagnostinė kompozicija ir
detekcijos būdas
- (57) Referatas:
—

**AIDS VIRUSO env BALTYS, JŲ GAMYBOS IR GRYNINIMO BŪDAI;
10 REKOMBINANTINIS VABZDŽIŲ BAKULOVIRUSAS, VAKCINA PRIEŠ AIDS
VIRUSĄ, DIAGNOSTINĖ KOMPOZICIJA IR DETEKCIJOS BŪDAS**

Įgytas imunodeficito sindromas (AIDS) yra pasaulinės svarbos virusinis susirgimas. Susirgimą sukelia retrovirusas,
15 vadinamas žmogaus imunodeficito virusu (ŽIV), dar vadinamas
limfadenopatijos virusu (LAV) (Barre-Sinoussi et al. 1983),
žmogaus T ląstelių leukemijos III tipo virusu (HTLV-III)
(Popovic et al. 1984) arba AIDS virusu (Levy et al. 1984). Kai
20 kurių AIDS virusų struktūra ir geno sandara buvo nustatyta
remiantis visa nukleotidų seka bei tiesioginiu viruso baltymų
sekvenavimu.

Apvalkalo baltymas yra labiausiai tinkamas kandidatas kuriant
vakciną prieš AIDS bei diagnozavimo testą (Francis et al.
25 1985). Antikūnai prieš apvalkalo baltymus paprastai aptinkami
sergančių AIDS pacientų serume (Robey, et al 1985). Be to,
apvalkalo glikoproteinai yra pagrindinis AIDS viruso antigenas
(Barin et al. 1985).

30 Galimybė sukurti efektyvią vakciną prieš AIDS priklauso nuo
galimybės pagaminti didelius kiekius saugaus antigeno, kuris,
suleistas į žmogaus organizmą, stimuliuotų apsauginio
imuniteto susidarymą. Antigeno gamybai labiausiai tinka
rekombinantinės DNR technologija, kuri, kai gerai žinoma,
35 leidžia gaminti didelius kiekius saugių ir nebrangių
imunogenų. Pasirenkant rekombinantinę (bakterijų, mielių ar

kitų eukariotinių ląstelių) sistemą, reikia atsižvelgti į tokius teiginius:

- 5 - ŽIV apvalkalo glikoproteinas specifiškai procesuojamas glikozilinant ir skaldant. Rekombinantinė sistema turi pajėgti procesuoti geno produktą pageidaujamu būdu.
- 10 - bakterijų ir mielių ląstelės prastai glikozilina jų ekspresuojamus baltymus.
- 15 - nors žinduolių ląstelės atrodo esą tinkami ekspresijos vektoriai, tačiau jų trūkumas tas, kad jose yra daug nepageidaujamų imunoreaktyvių antigenų, be to, gali būti papildomų agentų.

Bakuloviruso ekspresijos sistema yra patraukli ir reali galimybė gaminti aktyvų ŽIV apvalkalo imunogeną.

- 20 Bakulovirusai gali būti naudojami kaip itin efektyvūs eukariotiniai klonavimo ir ekspresijos vektoriai rekombinantinių baltymų gamybai kultivuojamose vabzdžių ląstelėse.
- 25 Bakulovirusai atitinka visus reikalavimus kaip eukariotiniai klonavimo ir ekspresijos vektoriai. Bakulovirusai yra saugūs, nes jų šeimininkais gali būti tik nariuotakojai (Arthropodes) juose galima patalpinti labai didelį kiekį egzogeninės DNR, ji ląstelių kultūros sistema yra nepavojinga, netransformuojama
- 30 ir efektyvi, jie turi labai efektyvų poliedrino promotorių, kuris yra aktyvesnis negu bet koks kitas žinomas promotorius užkrėstose virusu eukariotų ląstelėse.

- 35 Bakuloviruso sistema turi daug pranašumų gaminant polipeptidus, skirtus diagnostikai. Dauguma žmonių ir gyvūnų paprastai turi antikūnus, kurie reaguoja su bakterijų, mielių bei heterologiniais histosuderinamumo antigenais. Tokia

antikūnų buvimas sumažina diagnostinių procedūrų patikimumą, nes sąlygoja klaidingas teigiamas reakcijas su priemaišiniais bakterijų, mielių ir žinduolių baltymais, esančiais preparatuose, pagamintuose atitinkamose ekspresijos sistemose.

5 Nedidelė tikimybė, kad žmonės ir gyvūnai būtų imunologiniu aspektu susitikę su žvynuotasparnių drugių (Lepidopterų) ląstelėmis arba bakuloviruso antigenais. Dirbant su lepidopterų ląstelėmis ir bakulovirusais, naudojamais šioje sistemoje rekombinantinių baltymų gamybai, greičiausiai nekils

10 problemų dėl priemaišinių antigenų, kuriuos paprastai atpažįsta antikūnai, natūraliai esantys žmonių ar gyvūnų organizmuose. Todėl žvynuotasparnių drugių ląstelių arba bakulovirusų kilmės priemaišos neturėtų sukelti klaidingos teigiamos reakcijos diagnostinėse procedūrose, kuriose

15 naudojami rekombinantiniai antigenai, pagaminti šioje sistemoje.

Viename šio išradimo modelyje naudojamas bakuloviruso Autographa californica branduolinės poliedrozės virusas

20 (AcMNPV). Promotoriaus, naudojamo ekspresijai, seka yra iš poliedrino geno (occ), priklausančio šiam virusui. AcMNPV ir rekombinantinio viruso mėginiai buvo kultivuojami Spodoptera frugiperda (žolinio pelėdgalvio) ląstelėse. Rekombinantinis kamienas buvo sukonstruotas su Pn geno delecija, todėl

25 rekombinantinis virusas yra occ⁻. Tai leidžia lengvai identifikuoti rekombinantinius virusus pagal plokštelių morfologiją. Kartą išskirtas, rekombinantinis bakulovirusas gali būti panaudotas permissyvinei arba semipermissyvinei populiacijai užkrėsti, kuri kultivuojama kaip ląstelių linija

30 arba viso vabzdžio dalis.

Įterpimo vektorių konstravimas

Svetimą baltymą koduojančios sekos klonavimui ir ekspresijai bakuloviruso vektoriuje būtina, kad koduojanti seka būtų
5 išlygiuota su poliedrino promotoriumi ir aukštesnėmis sekomis ir iš kitos pusės su sutrumpintomis poliedriną koduojančiomis sekomis taip, kad homologinis rekombinavimas su bakuloviruso genomu leistų perkelti svetimą koduojančią seką, išlygiuotą su poliedrino promotoriumi ir neaktyviu poliedrino genu.

10

AIDS env geno konstrukcijai buvo naudojami įvairūs įterpimo vektoriai. Kiekvienas iš žemiau aprašytų įterpimo vektorių buvo konstruojamas taip, kad pateiktų ATG transliacinę iniciacijos kodoną. Svetimų sekų įterpimas į šiuos vektorius
15 turi būti taip atliekamas, kad transliacijos rėmelis, pradėtas iniciacijos kodono, išliktų nepažeistas einant per visas svetimas sekas.

Šio išradimo praktinės detalės yra pateikiamos žemiau su
20 nuoroda į pridedamus paveikslus.

Pav. 1 pateiktos LAV-1a izoliato geno viso ilgio apvalkalo nukleotidų seka. Nukleotidų seka parodyta kartu su numatoma amino rūgščių seka. Informacija apie sekas buvo gauta iš
25 GENBANK. Nukleotidai numeruojami pradedant pirmuoju nukleotidu, priklausančiu spėjamam ATG iniciacijos kodonui. Amino rūgštys numeruojamos pradedant ATG iniciacijos kodonu. Regionai, atitinkantys signalinį peptidą, ekstraląstelinį glikoproteiną (gp120) bei transmembraninį glikoproteiną (gp41)
30 yra parodyti kartu su pasiūlytomis peptido skaldymo vietomis ir asparagino tipo glikozilinimo vietomis. Tinkami restrikcijos fermentų saitai pažymėti po nukleotidų seka.

Pav. 2, sudarytas iš Pav. 2A ir Pav.2B, iliustruoja
35 rekombinantinių plazmidžių p1614 ir p1774 struktūrą. Plazmidėje p1774 yra visa LAV env geną koduojanti seka. Plazmidė buvo konstruojama dviem stadijom: (a) LAV env geno

KpnI fragmentas, sudarytas iš 2686 bp, išskirtas iš p1614 ir klonuotas į pUC18 KpnI saitą taip, kad pUC18 SmaI saitas būtų aukščiau už env geno seką; (b) 121 bp sintetinis oligomeras buvo liguojamas su SmaI saitu, siekiant gauti bukus galus.

5 Rodyklėmis pažymėtas koduojančių sekų poliariškumas. Parodyti ir svarbių restrikcijos endonukleazių saita. Sintetinių oligomerų nukleotidų seka šiam išradimui buvo susintetinta Pharmacia Gene Assembler aparatu, remiantis numatyta LAV regiono amino rūgščių seka, naudojant dažniau pasitaikančius

10 poliedrino gene kodonus.

Pav. 3, sudarytas iš Pav. 3A, Pav. 3B ir Pav. 3C, iliustruoja įterpimo vektorių struktūrą. Įterpimo vektoriai MGS-3, MGS-3+2, MGS-4 ir MGS-5 yra pateikti pažymint svarbių restrikcijos

15 endonukleazių saitus ir nukleotidų seką. Promotorių sekų poliariškumas orientuotas iš kairės į dešinę.

Pav. 4 parodyta gp160 pirmtako numatyta antrinė struktūra ir hidrofiliškumo profilis, gauti kompiuterinės analizės metodais

20 pagal Chow ir Fastman programą (1974, Biochemistry 13.222).

Pav. 5 pateikti įvairūs rekombinantinių vektorių konstravimo būdai. Parodytos plazmidės yra aprašytos arba pažymėtos raidėmis (e.g., A), kurios atitinka konstrukcijas, aprašytas

25 Lentelėse 1 ir 2.

Įterpimo vektorius MGS-1 sudarytas iš tokių struktūrinių fragmentų: (Žr. Pav. 3): 4000 bp seka virš poliedrino geno ATG iniciacijos kodono; polilinkeris, įvestas sait-mutagenėzės

30 būdu, sudarytas iš ATG iniciacijos kodono, ir SmaI ir KpnI restrikcijos saita; 1700 bp seka, esanti nuo KpnI restrikcijos saito (poliedrino geno viduje) iki galinio EcoRI restrikcijos saito EcoRI-I klone.

35 Insercijos vektorius MGS-3 yra identiškas MGS-1, išskyrus tai, kad polilinkeris sudarytas iš restrikcijos saitu SmaI, KpnI, BglII ir universalus stop kodono segmento.

Insercijos vektorius MGS-3+2 yra identiškasis MGS-3, išskyrus tai, kad jo sudėtyje MGS-3 padėtyje +3 yra dvi papildomos citozino liekanos ir trūksta vienos guanozino liekanos MGS-3 padėtyje +4. Dėl to kodonų rėmelis pasistumia per vieną nukleotidą į MGS-3 pusę.

Insercijos vektoriaus MGS-4 struktūra yra tokia pati, kaip ir jau aprašytojo MGS-3, išskyrus tai, kad jame panaudotas sintetinis polilinkeris, kuriame yra sekos, koduojančios pirmas 10 amino rūgščių iš poliedrino geno N galo, bei SmaI, KpnI, BglIII restrikcijos saitai ir universalus stop-kodono segmentas. Šis vektorius buvo sukonstruotas atsižvelgiant į anksčiau pastebėtą reiškinį (Smith et al. 1983), kad ekspresijos lygis žymiai pakyla, jei pirmų 14 amino rūgščių kodonai, priklausantys poliedrino geno N galui, yra suldydomi su svetimo geno N galu.

Insercijos vektoriaus MGS-5 struktūra yra tokia pati, kaip ir jau aprašytojo MGS-3, išskyrus tai, kad jame panaudotas sintetinis polilinkeris, kuriame yra sekos, koduojančios nuskeliama IL-2 signalinį peptidą, bei EcoRI, KpnI, BglIII restrikcijos saitai ir universalus stop-kodono segmentas. Šis vektorius buvo panaudotas, siekiant pateikti vidines ŽIV env sekas su peptidinio signalo seka, kuri, pasirodo, efektyviai atpažįstama vabzdžių ląstelėse ir iš jų pašalinama (Smith et al. 1985).

Bakulovirusų rekombinantų, turinčių LAV koduojančias sekas,
konstravimas

Panaudota rekombinantinė plazmidė, žymima NA-2, kuri sudaryta
5 iš 21.8 Kb AIDS proviruso segmento, įterpto į pUC18. Yra
žinoma, kad šis klonas yra užkrečiantis, nes gali gaminti
virusą po kai kurių žmogaus ląstelių transfekcijos. Visos
apvalkalo geno sekos, esančios NA-2, buvo gautos iš ŽIV LAV
kamieno (Barre-Sinoussi et al. 1983).

10

LAV apvalkalo geno atviras skaitymo rėmelis koduoja 861 amino
rūgštį, pradedant nuo Met kodono (Wain-Hobson et al. 1985).
HTLV-III BH10 kamiene yra 856 kodonai (Starich et al. 1986).

15 Signalinio peptido seka sudaryta iš 30 amino rūgščių (2 iš jų
skiriasi nuo atitinkamų rūgščių iš BH10), ekstraląstelinė
dalis sudaryta iš 486 amino rūgščių (14 iš jų skiriasi nuo
atitinkamų rūgščių iš BH10), o transmembraninis regionas
sudarytas iš 345 amino rūgščių (5 iš jų skiriasi nuo
20 atitinkamų rūgščių iš BH10). Pav. 1 šiuose tyrimuose pateikta
naudojamų LAV env geno nukleotidų seka ir numatyta amino
rūgščių seka. Amino rūgštys sunumeruotos pradedant nuo
prognozuojamo Met iniciacijos kodono. Tekste nurodomos amino
rūgštys atitinka numerius, pateiktus Pav. 1.

25

Be viso gp160 baltymo, buvo nuspręsta ekspresuoti dar kelis
ŽIV env geno domenų. Tai padaryta dėl kelių priežasčių,
viena jų - baltymo struktūra, kita - pasirodę pranešimai apie
apie AIDS virusų izoliatų heterogeniškumą (Benn et al. 1985,
30 Hahn et al. 1985). Buvo panaudota kompiuterinė programa,
prognozuojanti baltymų antrinę struktūrą bei hidrofiliškumą
(Chow and Fastman 1984). Išanalizavus pasirodė (Pav. 4), kad
kai kurie hidrofiliniai domenai turi β linkius. Parodyta, kad
tokie domenai yra asocijuoti su antigeniniais epitopais ir
35 struktūrų išsidėstymu (Westhoff et al. 1984). Remiantis šiais
rezultatais ir turint patogius restrikcijos saitus, buvo
nuspręsta ekspresuoti kelias apvalkalo baltymo C gale esančias

sutrumpintas formas, pateiktas Pav. 4. Šių konstrukcijų pranašumas yra tai, kad, pradedant nuo C galinio hidrofobinio domeno, gautos progresuojančios delecijos. Be to, buvo nuspręsta ekspresuoti regioną, apsuptą gp41 koduojančiomis sekomis. Mažiausiai du (2) imunodominantiniai epitopai yra regionuose, kurie numatyti ekspresuoti. Šioms konstrukcijoms sukurtas vektorius, turintis nuskeliama IL-2 geno signalą. Neseniai parodyta, kad IL-2 signalinis peptidas sąlygoja taisyklingą IL-2 geno ląstelinio procesingo asociaciją ekspresuojant jį rekombinantinio bakuloviruso genomo užkrėstose ląstelėse (Smith et al. 1985).

ŽIV-env sekų klonavimo strategija pateikta Pav. 5.

15 Iš pradžių apvalkalo genas buvo išskirtas iš NA-2 kaip 3846 bp EcoRI/SacI restrikcijos fragmentas ir klonuotas į pUC19 EcoRI/SacI restrikcijos saitą. Gauta plazmidė žymima p708. Po to apvalkalo genas išskiriamas kaip KpnI restrikcijos fragmentas ir klonuojamas į pUC18 KpnI restrikcijos saitą.
20 Gautas klonas žymimas p1614 (žr. Pav. 2A). Šiame KpnI restrikcijos fragmente yra šiek tiek sutrumpintas apvalkalo geno fragmentas, todėl trūksta atitinkamos 121 bp N galo sekos. Vietoj trūkstamos geno dalies, kurioje yra signalinio peptido sekos, buvo įterptas dvigrandis sintetinis
25 oligomeras, sukonstruotas pagal LAV amino rūgščių seką, naudojant dažniausiai pasitaikančius poliedrino geno kodonus. Siekiant palengvinti tolesnes manipuliacijas, vietoje ATG iniciacijos kodono kartu įterpiama nauja SmaI restrikcijos seka. ATG iniciacijos kodonas pateikiamas kartu su įterpimo
30 vektoriumi. Gauta plazmidė žymima p1774 ir pateikta Pav. 2B.

Restrikcijos fragmentai iš p1774, turintys įvairių domenų kodonų sekas iš AIDS apvalkalo, buvo klonuojami į MGS vektorius taip, kad įterpimo vektoriaus ATG iniciacijos
35 kodonas būtų viename rėmelyje su apvalkalo geno kodonais. Taip pagamintos konstrukcijos parodytos Pav. 5.

124
A. Viso ilgio gp160 klonuojama kaip SmaI/dalinis KpnI skaldymo fragmentas į MGS-3 jo SmaI saite. Šiame klone yra visos gp160 koduojančios sekos ir naudojamas autentiškas transliacijos terminavimo kodonas.

5

A1. Viso ilgio gp160 klonuojama kaip SmaI/dalinis KpnI skaldymo fragmentas į MGS-4 jo SmaI/KpnI saite. Šiame klone yra visos gp160 koduojančios sekos ir naudojamas autentiškas transliacijos terminavimo kodonas.

10

B. Sutrumpintas gp160 klonuojamas kaip SmaI/BamHI restrikcijos fragmentas į MGS-3 jo SmaI/BglII restrikcijos saite. Šiame klone yra gp160 koduojančios sekos nuo 1 iki 757 amino rūgšties ir naudojamas MGS-3 vektoriaus terminavimo kodonas.

15

B1. Sutrumpintas gp160 klonuojamas kaip SmaI/BamHI restrikcijos fragmentas į MGS-4 jo SmaI/BglII restrikcijos saite. Šiame klone yra gp160 koduojančios sekos nuo 1 iki 757 amino rūgšties ir naudojamas MGS-4 vektoriaus terminavimo kodonas.

20

C. Sutrumpintas gp160, klonuotas kaip SmaI/užpildytas HindIII restrikcijos fragmentas į MGS-3 jo SmaI saite. Šiame klone yra gp160 koduojančios sekos nuo 1 iki 645 amino rūgšties ir naudojamas MGS-3 vektoriaus terminavimo kodonas.

25

D. Viso ilgio gp120, klonuota kaip SmaI/dalinis BglII restrikcijos fragmentas, prie kurio prijungtas sintetinis DNR linkeris ties BglII saitu siekiant užpildyti seką nuo BglII saito (ties 472 amino rūgšties kodonu) iki paskutinio C galo kodono baltyme gp120. Šiame klone yra sekos 1 iki 516 amino rūgšties, atstovaujančios visą gp120 koduojančią seką. Transliacijos pabaiga yra ties TAA, kuris yra MGS-3 vektoriuje.

35

F. Sutrumpintas gp120, klonuotas kaip SmaI/BglII restrikcijos fragmentas į MGS-3 SmaI/BglII saitą. Šiame klone yra sekos,

koduojančios nuo 1 iki 645 amino rūgštis, ir naudojamas MGS-3 vektoriaus terminavimo kodonas.

5 G. Sutrumpintas gp120, klonuotas kaip SmaI/DraI restrikcijos fragmentas į MGS-3 SmaI saitą. Šiame klone yra sekos, koduojančios nuo 1 iki 129 amino rūgštis, ir naudojamas MGS-3 vektoriaus terminavimo kodonas.

10 H. Aukščiau pateikta SmaI/DraI konstrukcija, kurioje sekos, koduojančios HBsAg, įterptos kaip BamHII fragmentas į BglII saitą, esanti žemiau už vektorių. Šis klonas turi sekas, koduojančias pirmasias gp120 129 N galo amino rūgštis, bei toliau esančias rėmelyje sekas, koduojančias HBsAg.

15 I. gp41 klonuota kaip BglIII restrikcijos fragmentas į vektoriaus MGS-3 BglIII saitą. Šiame klone yra sekos, koduojančios amino rūgštis nuo 472 iki gp160 C galo paskutinės rūgštis.

20 J. gp41 klonuota kaip SmaI/KpnI fragmentas, išskirtas iš P3156 ir klonuotas į MGS-5 vektorių ties paruoštu EcoRI saitū ir KpnI saitū. Šiame klone yra sekos, koduojančios IL-2 signalinio peptido seka, kuri sulieta su sekomis, koduojančiomis amino rūgštis nuo 473 iki gp160 C galo
25 paskutinės rūgštis.

K. Sutrumpintas gp41, klonuotas kaip BglIII/BamHI fragmentas į MGS-3 BglIII saitą. Šiame klone yra sekos, koduojančios gp160 amino rūgštis nuo 472 iki 757 ir naudojamas vektoriaus MGS-3
30 terminavimo kodonas.

L. Sutrumpintas gp41, klonuotas kaip KpnI/BamHI fragmentas, išskirtas iš p3166 ir klonuotas į pMGS-5 KpnI/BamHI saitą. Šiame klone yra sekos, koduojančios IL-2 signalinio peptido
35 seka, kuri sulieta su sekomis, koduojančiomis gp160 amino rūgštis nuo 472 iki 757.

Rekombinantinio bakuloviruso paruošimas ir selekcija

ŽIV env geno rekombinacijos plazmidės išsodinamos kalcio fosfatu su AcMNPV ir pridedamos į neužkrėstas Spodoptera frugiperda ląsteles. Chimeriniai genai po to buvo įterpti į AcMNPV genomą naudojantis homologine rekombinacija. Rekombinantinis virusas identifiukuotas pagal occ^- lizės dėmių morfologiją. Tokios lizės dėmės pasižymi identifiukuojamu citopatiniu efektu, tačiau be branduolio okliuzijos. Siekiant gauti rekombinantinį virusą, atliekami du papildomi gryninimai panaudojant lizavimą. Rekombinantinė virusinė DNR analizuojama ieškant ŽIV env sekų sait-specifinio intarpo, lyginant jų restrikcijos ir hibridizavimo charakteristikas su laukinio tipo virusine DNR.

15

ŽIV env ekspresija iš rekombinantinių bakulovirusų užkrėstose vabzdžių ląstelėse

ŽIV env ekspresijos metu iš rekombinantinių bakulovirusų užkrėstose vabzdžių ląstelėse vyksta pirminio transliacijos produkto - pre-probaltymo, turinčio visas koduojamas amino rūgštis pradėdant nuo ekspresijos vektoriaus ATG iniciacijos kodono einant žemyn nuo poliedrino promotoriaus. Šis pirminis produktas sudarytas iš amino rūgščių, atitinkančių rekombinacijos vektoriaus kodonus. Pavyzdžiui, konstrukcijos pirminės transliacijos produkto N gale yra tokia seka: Met-Pro-Gly-Arg-Val. Met-Pro-Gly kodonai atsiranda dėl klonavimo strategijos.

30

Dėl dviejų potencialių procesingo saitų, ties kuriais nuskeliamas env pirmtakas glikoproteinas, iš pradžių pašalinama 10 amino rūgščių, priklausančių N galo signaliniam peptidui, po to susidaro didelis transmembraninis baltymas, sudarytas iš 345 amino rūgščių ir ekstraląstelinė dalis, sudaryta iš 486 amino rūgščių. Paprastai manoma, kad signalinio peptido atpašalinimas ir nuskėlimas yra būtina sąlyga efektyviam ląstelių procesingui.

35

Siekiant nustatyti ŽIV env geno sekos ekspresiją iš rekombinantinio bakuloviruso, vabzdžių ląstelių kultūra buvo užkrėsta įvairiais rekombinantiniais virusais, pridedant užkrėtimo pabaigoje ³⁵S-metionino, ³⁵S-cistino arba ³H-manozės. Žymėti ląstelių ekstraktai buvo analizuojami SDS poliakrilamido gelyje elektroforėzės metodu (PAGE) ir autoradiografijos metodu.

10 Buvo naudojami trys serumo tipai siekiant įrodyti rekombinantinio baltymo, gaminamo ŽIV rekombinantiniu bakulovirusu užkrėstose vabzdžių ląstelėse, autentiškumą:

1. ŽIV teigiamas žmogaus serumas, gautas iš Susirgimų kontrolės centro (Center for Disease Control, CDC, Atlanta, Georgia) ir ŽIV teigiamas palyginamasis standartas.

2. ŽIV neigiamas žmogaus serumas, taip pat gautas iš Susirgimų kontrolės centro kaip ŽIV neigiamas palyginamasis standartas.

3. polikloniniai antikūnai, sukelti ožkose prieš gelyje išgrynintą gp120 apvalkalo baltymą, pagamintą iš išgryninto užkrečiančio HTLV-III viruso.

25

Rezultatai pateikti Lentelėse 1 ir 2:

Lentelė 1

30	Izoliato nr.	Aprašymas	Terpė			
			ŽIV-neig.	ŽIV-teig.	gp120-teig.	
	Kontrolė					
		neužkr. Sf ląst.	-	-	-	
		užkr. ląst.	-	-	-	
35		Rekombinantiniai				
	A.	2855 visas gp160	-	+	-	

			1-861			
	A1.	3715		nd	nd	nd
	B.	3046	sutrump.gp160	-	+	+
			1-757			
5	B1.	3540		nd	nd	nd
	C.	3774	sutrump.gp160	nd	nd	nd
			1-645			
	D.	4646	gp120, 1-516	nd	nd	nd
	E.	2040	sutrump.gp120	-	+	+
10			1-472			
	F.	2165	sutrump.gp120	-	+	+/-
			1-279			
	G.	2196	sutrump.gp120	-	-	-
			1-129			
15	H.	3076	a.r.1-129	nd	nd	nd
			sulietos su HBsAg			
	I.	3156	gp41, 472-861	-	+	+
	J.	4585	IL-2 sign. seka/ gp41	nd	nd	nd
20	K.	3166	sutrump. gp41	-	+	+
			472-757			
	L.		IL-2 sign. seka/ sutrump. gp41	-	-	-

19

Lentelė 2

Izoliatų, prognozuojamų ir gautų rezultatų suvestinė

5	Konstrukcija/ izoliato nr.	Apvalkalo amino rūgštys ²	Prognozuojamas d y d i s ²		Išmatuotas ³ dydis
			negliko- zilintas	gliko- zilinta	
	A.	2863 visas gp160	93200	160000	160000
		1-861	56000	120000	120000
			37000	41000	41000
10	A1.	3715	kaip A	kaip A	kaip A
	B.	3046 sutrumpint.gp-160	82000	150000	150000
		1-757	56000	120000	120000
			26000	30000	30000
15	B1.	3540	kaip B	kaip B	kaip B
	C.	3774 sutrumpint.gp-160	69000	130000	
		1-645	56000	120000	
			14000	18000	
	D.	4646 gp120, 1-516	56000	120000	ND
20	E.	2040 sutr. gp120	51000	110000	110000
		1-472			90000
	F.	2165 sutr. gp120	30000	60000	60000
		1-279			
	G.	2196 sutr. gp120	12000	15000	15000
25		1-129			
	H.	3076 a.r.1-129	35000	40000	
		sulietos su HBsAg			
	I.	3156 gp41, 472-861	42000	46000	
	J.	4585 IL-2 sign.pept/ gp41	42000	46000	ND
30	K.	3166 sutrump. gp41	30000	33000	ND
		472-757			
	L.	IL-2 sign.pept/ sutrump. gp41	30000	33000	ND

35

1. Amino rūgščių liekanos, kurių buvimas pre-pro-gene prognozuojamas pagal nukleotidų seką.

LIETUVOS PATENTŲ

2. Nustatyta pagal esamų amino rūgščių liekanas ir prognozuojamas procesuotas formas.

3. Pagrindiniai imuniškai aktyvūs peptidai.

5 Rekombinantiniai gp160 baltymai sėkmingai naudojami standartiniuose diagnostiniuose testuose, pavyzdžiui, ELISA ir radioimunoprecipitacijos teste, papildančiuose Western blot analizę.

10 ŽIV APVALKALO BALTŲŲ GRYNINIMAS

Rekombinantiniai ŽIV apvalkalo baltymai gaminami S. frugiperda ląstelėse praėjus 4-5 dienoms po užkrėtimo ŽIV rekombinantiniu AcNPV virusu. Didžioji dalis ekspresuotų baltymų yra asocijuoti su užkrėtomis ląstelėmis. Visi čia aprašyti ŽIV apvalkalo geno produktai pasižymi panašiomis savybėmis: visi šie baltymai iš pradžių asocijuoti su ląstelėmis ir yra glikozolinti, todėl ŽIV apvalkalo geno produktų, aprašytų šioje paraiškoje bei analogiškose konstrukcijose, gryninimui galima naudoti tą patį gryninimo metodą. Toliau pateikiamas rekombinantinio gp160 baltymo, pagaminto iš ekspresijos vektoriaus Ac3046, gryninimo pavyzdys.

S. frugiperda ląstelės užkrečiamos rekombinantiniu Ac3046. Praėjus 4-5 dienoms po užkrėtimo, ląstelės surenkamos ir perplaunamos, siekiant atskirti jas nuo ląstelių kultūros terpės. Iš pradžių, naudojant standartinės procedūras, ląstelės išskiriamos į branduolio ir citoplazminių membranų frakcijas. Glikoproteinų frakcija, kurioje yra baltymas gp160 soliubilizuojama žinomais būdais ir glikoproteinai gryninami, naudojant lęšių lektinų afininės chromatografijos metodą. Baltymas gp160 yra glikoproteinų frakcijoje, šioje stadijoje jo kiekis sudaro 25-50% visų frakcijos baltymų (NDS poliakrilamido gelio analizės duomenimis). Siekiant gauti grynesnį gp160, glikoproteinų frakcija leidžiama per skysčių chromatografijos kolonėlę, užpildytą molekuliniais sietais.

gp160 išteka iš kolonėlės su didelio molekulinio svorio frakcija, kurioje jo kiekis sudaro 90% visų frakcijos baltymų.

Čia verta paminėti su šiuo išradimu susijusį straipsnį „AIDS
5 Virus Env Protein Expressed from a Recombinant Vaccinia Virus“
by M.P. Kieny et al, Bio/Technology, Vol. 4, September 1986,
pp. 790-795. Šiame straipsnyje aprašytas LAV env baltymo env
koduojančios sekos įterpimas į vakcinijos viruso vektorių.
Gautas gyvas rekombinantinis virusas VVTGeLAV nulemia env
10 baltymo produkciją užkrėstose žinduolių ląstelėse. Šis
rekombinantinis baltymas reaguoja su AIDS pacientų serumu ir
spėjama, kad jis procesuojamas ir glikozilinamas tokiu pačiu
būdu kaip ir autentiškas env, priklausantis LAV retrovirusui.
Be to, pelių užkrėtimas VVTGeLAV virusu sąlygoja aukštą
15 antiserumo titrą, kuris atpažįsta vakcinijos viruso
determinantes, tačiau antikūnų, atpažįstančių LAV env
baltymus, titras yra žemas. Rekombinantiniu virusu užkrėstos
ląstelės sparčiai atpalaiduoja procesuotą env baltymą į
kultūrinę terpę. Tačiau tokia taktika, kai norint gaminti ir
20 naudoti env baltymą, pavyzdžiui, vakcinose, siekiama sukelti
imuninį atsaką prieš LAV arba ŽIV virusą, nėra visai tinkama,
ypač dėl vakcinijos viruso kaip vektoriaus naudojimo.

Taip pat su šiuo išradimu susijęs straipsnis „Production of
25 Huamn Beta Interferon in Insect Cells Infected with
Baculovirus Expression Vector“, G.E. Smith et al, Molecular
and Cellular Biology, Vol. 3, No 12, pp. 183-192, December
1983 bei straipsnis „Strong and Regulated Expression of
Escherichia coli β -Galactosidase in Insect Cells with a
30 Baculovirus Vector“, G.D. Pennock et al, Molecular and
Cellular Biology, Vol. 4, No 3, pp. 399-406, March 1984. Taip
pat idomios yra pateiktos ir dabar nagrinėjamos paraiškos
patentui Nr. 810938, pateiktos 1985 m. gruodžio 18 d. bei
Europos patento publikacija Nr. 0 127 839 (paskelbta 1984 m.
35 gruodžio 12 dieną) ir Europos patento publikacija Nr. 0 155
474 (paskelbta 1985 m. rugsėjo 25 dieną). Šių straipsnių ir

patentinių publikacijų turinys įtraukti į šį aprašymą ir yra šio aprašymo dalis.

Kadangi AIDS (Įgytas žmogaus imunodeficito sindromas) JAV, 5 Centrinėje Afrikoje, Europoje ir kitose pasaulio dalyse yra epideminis susirgimas, šis išradimas turi didelę reikšmę. Kaip jau minėta anksčiau, susirgimą (AIDS) sukelia retrovirusas, vadinamas Žmogaus imunodeficito virusu (ŽIV), kuris dar vadinamas limfadenopatijos virusu (LAV), Žmogaus T-ląstelių 10 leukemijos III tipo virusu (HTLV-III) arba AIDS giminingu virusu (ARV). Kai kurių AIDS virusų struktūra ir geno sandara buvo nustatyta pagal molekulinį klonų nukleotidų pilną seką ir tiesiogiai sekvenuojant viruso baltymus. ŽIV apvalkalo 15 genas (env) koduoja 160 000 molekulinio svorio glikoproteiną ir vadinamas gp160. Virusų užkrėstose ląstelėse gp160 pirmtakas skyla ties konservatyvia bazinių amino rūgščių seka ir gaunamas N galo glikoproteinas gp120 ir mažesnis C galo baltymas gp41. ŽIV glikoproteinai gp160, gp120 ir gp41 turi, atitinkamai, maždaug 833, 488 ir 345 amino rūgštis.

20 Brandus gp120 yra asocijuotas su viruso apvalkalu ir spėjama, kad tai yra išorinis baltymas, o gp41 turi du ilgus hidrofobinių amino rūgščių atsišakojimus, iš kurių vienas arba abu gali kirsti viruso apvalkalą. gp160 pirmtakas ir brandus 25 gp120 bei gp41 aptinkami naudojant daugumos sergančių individų antiserumą. Taip pat parodyta, kad gp120 baltymas susijungęs su T4 molekule T-helperio/limfocitų induktoriaus ląstelės paviršiuje ir kad ŽIV gp160 baltymas gali indukuoti sincitiumo susidarymą su ląstelėmis, kurios ekspresuoja T4 receptoriaus 30 baltymą. Yra žinoma, kad 104 baltymo gp160 C galo amino rūgštys nebūtinai susilieja su T4+ T-limfocitams.

ŽIV gp160 glikoproteinas iš AIDS viruso apvalkalo pagal šį išradimą ekspresuojamas iš AIDS viruso env geno, kuris 35 klonuotas iš užkrėsto ŽIV izoliato. Ekspresijai naudotas ŽIV env genas koduoja tik tas sekas, kurios yra natyviame ŽIV env gene. ŽIV env genas įterpiamas į rekombinantinį bakulovirusą

taip, kad būtų ekspresuojamas brandus baltymas, neturintis pakeistų arba papildomų amino rūgščių. Pagaminti keli rekombinantai; vienas jų turi visą ŽIV env geną, o kitame yra maža, maždaug 100 amino rūgščių sekos delecija gp160 C gale. 5 Ši delecija buvo padaryta siekiant stabilizuoti ekspresuotą rekombinantinį gp160 baltymą, tačiau šios operacijos metu du hidrofobiniai domenai, esantys gp41, nebuvo pašalinti.

Kaip jau anksčiau minėta, ŽIV gp160 pagamintas vabzdžių 10 ląstelių ekspresijos sistemoje ir, kaip nurodyta aukščiau, šiame baltyme nėra žinduolių ląstelių baltymų priemaišų. gp160 baltymo ekspresija ir gryninimas atliekami taip, kad būtų išlaikyta natyvi baltymo struktūra ir jo biologinis aktyvumas. Imunoprecipitacijos, Western blot ir ELISA metodais parodyta, 15 kad ekspresuotas ŽIV env baltymas aktyviai reaguoja su AIDS pacientų serumu.

Šio išradimo ŽIV gp160 baltymas buvo gaminamas įvairiais kiekiais, įvairaus grynumo bei įvairiu pavidalu, pavyzdžiui, 20 steriliame vandeniniame buferyje, koncentracija maždaug 100 µg apvalkalo baltymo /ml, grynumas NDS-poliakrilamido FPLC analizės duomenimis - daugiau nei 50% . Nustatyta, kad ŽIV gp160 baltymas stabilus mažiausiai 6 savaites, saugant 4°C temperatūroje. Toks baltymas tiekiamas tokiais kiekiais ir 25 tūriais, kurių reikia vienkartiniam naudojimui, ir neblogai išsilaiko -70°C. Pageidautina vengti pakartotinių užšaldymo ir atitirpinimo ciklų, o skiedimus - siekiant išvengti baltymo nuostolių ir jo biologinio aktyvumo praradimo - daryti su tokiais tirpalais, kuriuose yra tinkami baltymai arba 30 detergentai. Tinkami skiedikliai yra 0.1% jaučio serumo albuminas (BSA), arba jo ekvivalentas, 0.1% serumas steriliam vandenyje arba kultūrinėje terpėje ir 0.1% natrio dodecilsulfatas arba kitas tinkamas detergentas vandenyje ar buferyje. Baltymas ŽIV gp160, pagamintas pagal šį išradimą, 35 buvo sėkmingai panaudotas, kaip nurodyta aukščiau, priklausomai nuo tolesnio naudojimo ir poreikių išfasuojamas, pavyzdžiui, po 25, 50 ar 100 µg baltymo. Baltymas naudingas

in vitro ir kitiems tyrimams, kurie susiję su įvairiais AIDS tyrinėjimų aspektais, tarp jų vakcinų kūrimu, Western blottingu, ELISA, susijungimu su receptoriais, imunoprecipitacija, antiserumų gamyba, sincitiumo susidarymu
5 bei kitais taikymais, pavyzdžiui, fizikiniams tyrinėjimams bei baltymo panaudojimas kaip referens-standarto.

Western blot analizė yra vienas iš specifiškiausių ir jautriausių egzistuojančių metodų, skirtų AIDS antikūnų
10 detekcijai ir dažnai naudojamas įvairiose AIDS tyrimų srityse, be to, kaip jau anksčiau minėta, gp160 pirmtakas ir brandūs gp120 ir gp41 baltymai aptinkami naudojant AIDS seroteigiamų individų antiserumą. Atitinkamai vienas iš šio išradimo
15 įgyvendinimo būdų yra tai, kad AIDS viruso apvalkalas arba env baltymas sorbuojamas ant tinkamo substrato, keraminės, polistirolo lėkštelės, į šulinėlį arba ant plėvelės, pavyzdžiui, ant nitroceliuliozinės membranos juostelės, siekiant nustatyti AIDS antikūnus.

20 Kalbant detaliau, pagal šį išradimo įgyvendinimo modelį, elektroforezės būdu atskirtas AIDS rekombinantinis apvalkalo baltymas ŽIV gp160 impregnuojamas nitroceliuliozės membranos juostelėse, kurios naudojamos Western blote arba kaip blotingo juostelės. Kadangi ŽIV env gp pagal šį išradimą gaminamas
25 vabzdžių ląstelių ekspresijos sistemoje, jame nėra žinduolių ląstelių baltymų priemaišų. Nustatyta, kad medžiaga, adsorbuota ant nitroceliuliozės juostelių, aktyviai reaguoja su AIDS pacientų serumu ir kad ŽIV gp160, adsorbuotas ant nitroceliuliozės juostelių, sėkmingai išbandytas su žmogaus
30 AIDS teigiamu serumu kai šis atskiestas nuo 1/100 iki 1/10000. Specifiškai surišti antikūnai gali būti aptikti naudojant reagentus, konjuguotus su fermentais, pavyzdžiui, šarmine fosfataze arba peroksidaze, kurie sujungti su antrais antikūnais, arba naudojant specifinius anti-antikūnus arba
35 radioaktyviu žymėtą baltymą A. Western bloto analizėje naudojamos procedūros, kuriose taikomi šio išradimo modeliai,

pavyzdžiui, nešėjai arba juostelės, impregnuotos ŽIV env baltymu, gerai žinomos specialistams.

ŽIV gp160 juostelės arba nešėjai gaminami pagal šį išradimą
5 vienkartinuose padėkluose, turinčiuose tinkamą skaičių
juostelių, pavyzdžiui, 8 juosteles 8 atskiruose šulinėliuose.
Visi inkubavimai gali būti daromi padėkle, komplekte taip pat
yra dangtelis, kad padėklus galima būtų naudoti kaip patogius
saugojimo konteinerius išryškintų Western blotų arba
10 detekcijos duomenų saugojimui. Kiekviena tokia juostelė pagal
šį išradimą impregnuojama rekombinantiniu HIV gp160 apvalkalo
baltymu, atskirtu elektroforezės metodu 10% NDS-
poliakrilamido gelyje ir perkeltu po to elektroforetiškai ant
nitroceliuliozės membranos arba juostelės arba nešėjo. Gautas
15 produktas tinka AIDS apvalkalo antikūnų nustatymui in vitro,
gyvūnų ir ląstelių ar audinių kultūrų tyrimams, susijusiems
su įvairiais AIDS tyrinėjimų aspektais, tarp jų su Western
blotu AIDS antikūnams aptikti, kokybės kontrolei, kraujo bankų
tikrinimui bei AIDS diagnozavimui. Nustatyta, kad
20 nitroceliuliozės membranų nešėjai, kai jie tinkamai saugomi,
pavyzdžiui, padėkluose, vėsioje sausoje vietoje, išbūna
stabilūs mažiausiai 6 savaites kambario temperatūroje.

ŽIV gp160 ELISA lėkštelės buvo pagamintos pagal šį išradimą
25 vienkartinuose padėkluose su atitinkamu skaičiumi šulinėlių,
pavyzdžiui, 96 šulinėliais. Visos inkubacijos daromos
padėkluose. Į kiekvieną šulinėlį dedamas atitinkamas kiekis
ŽIV gp160, pavyzdžiui, 100 μ l išgryninto ŽIV gp160, kurio
koncentracija yra 1 μ g ŽIV gp160/ml. ŽIV gp160 baltymas
30 paliekamas šulinėlyje adsorbuotis atitinkamą laiko tarpą,
pavyzdžiui, per naktį esant 4°C. Likęs tirpalas pašalinamas iš
kiekvieno ELISA lėkštelės šulinėlio ir ELISA lėkštelės
paliekamos išdžiūti kambario temperatūroje. Nustatyta, kad
taip paruoštos lėkštelės su šulinėliuose esančiu ŽIV gp160
35 stabilios mažiausiai 6 savaites kambario temperatūroje, jei
jos tinkamai saugomos, pavyzdžiui, padėkluose, vėsioje sausoje
vietoje. Gautas produktas tinka AIDS apvalkalo antikūnų arba

antigeno nustatymui, gyvūnų ir ląstelių ar audinių kultūrų tyrimams, susijusiems su įvairiais AIDS tyrinėjimų aspektais, tarp jų ELISA testai, žmogaus serumo tikrinimas ir diagnostika, ieškant AIDS antikūnų arba antigeno.

5

Toliau pateiktos publikacijų nuorodos, palaikančios šią išradimą. Šių nuorodų aprašymas įtrauktas į šią išradimą ir yra jo dalis.

23

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. AIDS viruso env baltymas, ekspresuotas iš rekombinantinio vabzdžių viruso.
5
2. AIDS viruso env baltymas pagal p. 1, ekspresuotas iš rekombinantinio vabzdžių bakuloviruso.
3. AIDS viruso env gp160 baltymas pagal p. 1.
10
4. AIDS viruso env gp120 baltymas pagal p. 1.
5. AIDS viruso env gp41 baltymas pagal p. 1.
- 15 6. AIDS viruso env gp41 baltymo pagal p. 1. imunogeninis fragmentas.
7. Rekombinantinis vabzdžių bakulovirusas, kuriame įterptas AIDS viruso env baltymo genas, siekiant ekspresuoti AIDS
20 viruso env baltymą vabzdžių ląstelėse.
8. Rekombinantinis vabzdžių bakulovirusas pagal p. 7,
pasižymintis tuo, kad minėtas virusas turi įterptą geną,
koduojantį AIDS viruso env baltymo imunogeninį fragmentą.
25
9. Rekombinantinis vabzdžių bakulovirusas pagal p. 7,
pasižymintis tuo, kad jame įterptas genas, koduojantį AIDS
viruso env gp160 baltymą.
- 30 10. Rekombinantinis vabzdžių bakulovirusas pagal p. 7,
pasižymintis tuo, kad jame įterptas genas, koduojantį AIDS
viruso env gp120 baltymą.
11. Rekombinantinis vabzdžių bakulovirusas pagal p. 7,
35 pasižymintis tuo, kad jame įterptas genas, koduojantis AIDS
viruso env gp41 baltymą.

12. AIDS viruso env baltymas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad jis yra įterptas arba fiksuotas ant nešėjo substrato.
13. AIDS viruso env baltymas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad jis yra fiksuotas ant plėvelės.
14. AIDS viruso env baltymas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad jis yra įterptas arba fiksuotas ant skaidraus substrato arba nešėjo.
15. AIDS viruso env baltymas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad jis yra įterptas arba fiksuotas ant nitroceliuliozės plėvelės arba membranos.
16. AIDS viruso env baltymo imunogeninis fragmentas pagal p. 6, pasižymintis tuo, kad jis yra įterptas arba fiksuotas ant kieto substrato arba nešėjo.
17. Vakcina prieš AIDS virusą, pasižymintis tuo, kad jos sudėtyje yra AIDS viruso env baltymo imunogeninis fragmentas pagal p. 6.
18. Vakcina, kurios sudėtyje yra AIDS viruso env gp160 baltymas pagal p. 3.
19. Vakcina, kurios sudėtyje yra AIDS viruso env gp120 baltymas pagal p. 4.
20. Vakcina, kurios sudėtyje yra AIDS viruso env gp41 baltymas pagal p. 5.
21. Diagnostinė kompozicija, tinkama antikūnų prieš AIDS detekcijai, turinti tinkamą nešėją, pasižymintis tuo, kad jos sudėtyje yra AIDS viruso env baltymo imunogeninis fragmentas pagal p. 6.

22. Antikūnų prieš AIDS virusą detekcijos būdas, į kurio sudėtį įeina minėtų antikūnų prieš AIDS virusą kontaktavimas su AIDS env baltymu, ekspresuotu rekombinantiniame vabzdžių viruse pagal p. 1, ir bet kokio fiksavimo arba reakcijos tarp 5 minėtų antikūnų prieš AIDS virusą ir minėto baltymo stebėjimas.

23. Būdas pagal p. 22, pasižymintis tuo, kad minėtas AIDS viruso env baltymas yra taip pažymėtas, kad galima būtų 10 stebėti fiksavimą arba reakciją tarp minėto baltymo ir minėtų antikūnų prieš AIDS virusą.

24. AIDS viruso env baltymas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad jis yra ekspresuotas rekombinantinėse užkrėstose 15 ląstelėse.

25. AIDS viruso env baltymas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad jis yra ekspresuotas rekombinantinėse užkrėstose vabzdžių ląstelėse. 20

26. AIDS viruso baltymai, apvalkalas ir šerdis, ekspresuoti vabzdžių ląstelėse.

27. AIDS viruso env baltymo gamybos būdas, apimantis geno 25 įterpimą į virusą, ląstelių užkrėtimą ir auginimą, pasižymintis tuo, kad į jo sudėtį įeina AIDS viruso env baltymo geno arba AIDS viruso apvalkalo geno (env) įterpimas į vabzdžių virusą, vabzdžių ląstelių užkrėtimas arba vabzdžių užkrėtimas gautu rekombinantiniu virusu ir gautų užkrėstų 30 vabzdžių ląstelių arba vabzdžių auginimas siekiant ekspresuoti arba pagaminti AIDS viruso env baltymą.

28. Būdas pagal p. 27, pasižymintis tuo, kad minėtas vabzdžių virusas yra bakulovirusas. 35

29. AIDS viruso gag baltymas, ekspresuotas iš rekombinantinio vabzdžių viruso.

30. AIDS viruso pol baltymas, ekspresuotas iš rekombinantinio vabzdžių viruso.

5 31. Rekombinantinio bakuloviruso ekspresijos vektoriaus, galinčio ekspresuoti pasirinktą AIDS viruso geną arba jo dalį šeimininko vabzdžio ląstelėje, konstravimo būdas, pasižymintis tuo, kad į jo sudėtį įeina:

10 a) rekombinantinio įterpimo vektoriaus konstravimas, įterpiant bakuloviruso genomo dalį į klonavimo sąrangą, po to įterpiant pasirinktą AIDS viruso geną arba jo dalį į modifikuotą įterpimo vektorių taip, kad pasirinktas AIDS viruso genas arba jo dalis ekspresuojama kontroliuojant bakuloviruso
15 promotoriui.

b) aukščiau minėto modifikuoto AIDS viruso geno arba jo dalies perkėlimas į bakuloviruso ekspresijos vektorių, sumaišant aukščiau minėtą modifikuotą įterpimo vektorių su bakuloviruso
20 DNR, transfektuojant tinkamas vabzdžių ląsteles ir išskiriant rekombinantinius virusus, kurių sudėtyje yra pasirinktas AIDS genas arba jo dalis.

32. Būdas pagal p. 31, pasižymintis tuo, kad pasirinktas AIDS
25 viruso genas arba jo dalis yra env genas arba jo dalis.

33. Būdas pagal p. 31, pasižymintis tuo, kad pasirinktas AIDS viruso genas arba jo dalis yra gag genas arba jo dalis.

30 34. Būdas pagal p. 31, pasižymintis tuo, kad pasirinktas AIDS viruso genas arba jo dalis yra pol genas arba jo dalis.

35 35. Būdas pagal p. 31, pasižymintis tuo, kad bakuloviruso promotorius yra poliedrino geno promotorius.

36. Būdas pagal p. 31, pasižymintis tuo, kad bakulovirusas yra Autographa californica branduolinės poliedrozės virusas.

2
34

37. Būdas pagal p. 32, pasižymintis tuo, kad pasirinktas AIDS viruso genas arba jo dalis yra iš AIDS env geno yra įterpimo vektoriuose, A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, A-1, arba B-1, kaip aprašyta ir iliustruota atitinkamuose piešiniuose.

38. Pasirinkto AIDS viruso polipeptido sintezės būdas, apimantis vektoriaus konstravimą ir įterpimą į ląsteles, pasižymintis tuo, kad į jo sudėtį įeina jautrių šeiminingo vabzdžių ląstelių užkrėtimas rekombinantiniu bakuloviruso vektoriumi, kai bakuloviruso vektoriaus sudėtyje yra vienas arba keli AIDS viruso baltymo genai arba jų dalys, ir užkrėstu ląstelių auginimas siekiant ekspresuoti AIDS viruso polipeptidą.

15

39. Būdas pagal p. 38, pasižymintis tuo, kad jautrios vabzdžių ląstelės gaunamos iš vabzdžių rūšies Spodoptera frugiperda.

40. Būdas pagal p. 38, pasižymintis tuo, kad pasirinktas AIDS genas arba jo dalis yra env genas arba jo dalis.

41. Būdas pagal p. 38, pasižymintis tuo, kad pasirinktas AIDS viruso genas arba jo dalis yra gag genas arba jo dalis.

43. Būdas pagal p. 38, pasižymintis tuo, kad pasirinktas AIDS genas arba jo dalis yra pol genas arba jo dalis.

44. Būdas pagal p. 43, pasižymintis tuo, kad bakuloviruso promotorius yra poliedrino geno promotorius.

30

45. Būdas pagal p. 38, pasižymintis tuo, kad bakulovirusas yra Autographa californica branduolinės poliedrozės virusas.

46. Būdas pagal p. 38, pasižymintis tuo, kad pasirinktas AIDS viruso baltymo genas arba jo dalis yra iš AIDS env geno ir yra įterpimo vektoriuose A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, A-1,

38

arba B-1, kaip aprašyta ir iliustruota atitinkamuose
piešiniuose.

47. AIDS env geno polipeptidų chromatografinis gryninimo
5 būdas, pasižymintis tuo, kad į jo sudėtį įeina minėtų
polipeptidų gryninimas lęšių lektinų chromatografijos metodu,
siekiant išskirti glikoproteinus, bei glikoproteinų
frakcionavimas pagal dydį, naudojant molekulinį sietų
chromatografiją.
- 10
48. Būdas pagal p. 47, pasižymintis tuo, kad AIDS env geno
polipeptidai gaminami pagal p. 46.
49. AIDS polipeptidai arba jų dalys, pagaminti vabzdžių
15 ląstelėse pagal p. 38 ir įterpti arba fiksuoti ant kieto
substrato.
50. AIDS polipeptidai arba jų dalys, pagaminti pagal p. 40,
41, 42 ir 46 ir įterpti arba fiksuoti ant kieto substrato.
- 20
51. AIDS polipeptidai arba jų dalys, pagaminti pagal p. 47
ir įterpti arba fiksuoti ant kieto substrato.
52. AIDS polipeptidai pagal p. 49, pasižymintis tuo, kad jie
25 yra fiksuoti ant kieto substrato iš polistirolo, iš kurio
išpresuotas padėklas su šulinėliais.
53. AIDS polipeptidai pagal p. 49, pasižymintis tuo, kad jie
yra fiksuoti ant filtro arba ant plėvelės.
- 30
54. Antikūnų prieš žmogaus AIDS virusą aptikimo ir matavimo
būdas, į kurio sudėtį įeina minėtų antikūnų kontaktavimas su
rekombinantinio AIDS viruso baltymu pagal p. 1.
- 35
55. Būdas pagal p. 54, pasižymintis tuo, kad rekombinantiniai
AIDS viruso polipeptidai arba baltymai arba jų dalys gaminami
pagal p. 38.

56. Būdas pagal p. 54, pasižymintis tuo, kad rekombinantiniai AIDS viruso polipeptidai arba baltymai arba jų dalys gaminami pagal p. 47.

5

57. Būdas pagal p. 54, pasižymintis tuo, kad rekombinantinis AIDS baltymas fiksuojamas ant kieto substrato.

58. Būdas pagal p. 54, pasižymintis tuo, kad minėto kontaktavimo sudėtyje yra ELISA testas (Enzyme linked solid phase immunoabsorbent assay).

10

59. Būdas pagal p. 54, pasižymintis tuo, kad minėtas kontaktavimas apima Western blot analizę.

15

60. Vakcina prieš AIDS, turinti fiziologinį nešėją, pasižyminti tuo, kad į jos sudėtį įeina AIDS viruso env baltymas pagal p. 1.