

(19)



(10) **LT IP1793 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **IP1793** (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**
A61K 39/00
- (30) Prioritetas: **920197, 1986 10 16, US**
4614101, 1989 04 20, 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:
Antikūnų prieš AIDS virusą detekcijos būdas
- (57) Referatas:
—

5

10

DIAGNOSTINĖS KOMPOZICIJOS GAVIMO BŪDAS IR JOS PANAUDOJIMAS

Išradime aprašomas diagnostinės kompozicijos gavimo būdas ir jos panaudojimas.

15

Išgytas imunodeficito sindromas (AIDS) yra pasaulinės svarbos virusinis susirgimas. Susirgimą sukelia retrovirusas, 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 kurių AIDS virusų struktūra ir geno sandara buvo nustatyta remiantis visa nukleotidų seka bei tiesioginiu viruso baltymų sekvenavimu.

25

Apvalkalo baltymas yra labiausiai tinkamas kandidatas kuriant vakciną prieš AIDS bei diagnozavimo testą (Francis et al. 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

VALSTYBINIS PATENTAS

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 esant tinkami ekspresijos vektoriai, tačiau jų trūkumas tas, kad jose yra daug nepageidaujimų imunoreaktyvių antigenų, be to, gali būti papildomų agentų.

20

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

25

Bakulovirusai gali būti naudojami kaip itin efektyvūs eukariotiniai klonavimo ir ekspresijos vektoriai rekombinantinių baltymų gamybai kultivuojamose vabzdžių ląstelėse.

30

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, jų ląstelių kultūros sistema yra nepavojinga, netransformuojama 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. Tokių antikūnų buvimas sumažina diagnostinių procedūrų patikimumą, nes sąlygoja klaidingas teigiamas reakcijas su priemaišiniais bakterijų, mielių ir žinduolių baltymais, esančiais preparatuose, pagamintuose atitinkamose ekspresijos sistemose. Nedidelė tikimybė, kad žmonės ir gyvūnai būtų imunologiniu aspektu susitikę su žvynuotasparnių drugių (Lepidoptera) ląstelėmis arba bakuloviruso antigenais. Dirbant su žvynuotasparnių drugių ląstelėmis ir bakulovirusais, naudojamais šioje sistemoje rekombinantinių baltymų gamybai, greičiausiai nekils 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 naudojami rekombinantiniai antigenai, pagaminti šioje sistemoje.

Viename šio išradimo modelyje naudojamas bakuloviruso Autographa californica branduolinės poliedrozės virusas (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 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 arba viso vabzdžio dalis.

Įterpimo vektorių konstravimas

Svetimą baltymą koduojančios sekos klonavimui ir ekspresijai bakuloviruso vektoriuje būtina, kad koduojanti seka būtų



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.

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 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 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 GENBANK. Nukleotidai numeruojami pradedant pirmuoju nukleotidu, priklausančiu spėjamam ATG iniciacijos kodonui. Amino rūgštys numeruojamos pradedant ATG iniciacijos kodonu. Regionai, atitinkantys signalinį peptidą, ekstralastelinį glikoproteiną (gp120) bei transmembraninį glikoproteiną (gp41) 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 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 bukų galus.

Rodyklėmis pažymėtas koduojančių sekų poliariškumas. Parodyti ir svarbių restrikcijos endonukleazių saitai. Sintetinių oligomerų nukleotidų seka šiam išradimui buvo susintetinta Pharmacia Gene Assembler aparatu, remiantis numatyta LAV regiono amino rūgščių seka, naudojant dažniau pasitaikančius 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 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 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 Lentelėse 1 ir 2.

Įterpimo vektorius MGS-1 sudarytas iš tokių struktūrinių fragmentų: (Žr. Pav. 3): 4000 bp seka virš poliedrino geno AT iniciacijos kodono; polilinkeris, įvestas sait-mutagenezės būdu, sudarytas iš ATG iniciacijos kodono, ir SmaI ir KpnI restrikcijos saitai; 1700 bp seka, esanti nuo KpnI restrikcijos saito (poliedrino geno viduje) iki galinio EcoF restrikcijos saito EcoRI-I klone.

30

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

35 Insercijos vektorius MGS-3+2 yra identiškas MGS-3, išskyrus tai, kad jo sudėtyje MGS-3 padėtyje +3 yra dvi papildomos citozino liekanos ir trūksta vienos guanozino liekanos MGS-3

95

padėtyje +4. Dėl to kodonų rėmelis pasistumia per vieną nukleotidą į MGS-3 pusę.

5 Inscijijos 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, BglII restrikcijos saitai ir universalus stop-kodono
10 segmentas. Šis vektorius buvo sukonstruotas atsižvelgiant į
anksčiau pastebėtą reiškinių (Smith et al. 1983), kad
ekspresijos lygis žymiai pakyla, jei pirmų 14 amino rūgščių
kodonai, priklausantys poliedrino geno N galui, yra sulydomi
su svetimo geno N galu.

15 Inscijijos 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, BglII
restrikcijos saitai ir universalus stop-kodono segmentas. Šis
20 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).

25 Bakulovirusų rekombinantų, turinčių LAV koduojančias sekas,
konstravimas

Panaudota rekombinantinė plazmidė, žymima NA-2, kuri sudaryta
iš 21.8 Kb AIDS proviruso segmento, įterpto į pUC18. Yra
30 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).

35 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).

VALSTYBINIS TYRIMŲ CENTRAS

Signalinio peptido seka sudaryta iš 30 amino rūgščių (2 iš jų skiriasi nuo atitinkamų rūgščių iš BHIO), ekstraląstelinė dalis sudaryta iš 486 amino rūgščių (14 iš jų skiriasi nuo atitinkamų rūgščių iš BHIO), o transmembraninis regionas sudarytas iš 345 amino rūgščių (5 iš jų skiriasi nuo atitinkamų rūgščių iš BHIO). 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.

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 AIDS virusų izoliatų heterogeniškumą (Benn et al. 1985, 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 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 nuskeliamą 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.



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
5 to apvalkalo genas išskiriamas kaip KpnI restrikcijos fragmentas ir klonuojamas į pUC18 KpnI restrikcijos saitą. 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
10 sekos. Vietoj trūkstamos geno dalies, kurioje yra signalinio peptido sekos, buvo įterptas dvigrandis sintetinis oligomeras, sukonstruotas pagal LAV amino rūgščių seką, naudojant dažniausiai pasitaikančius poliėdrino geno kodonus. Siekiant palengvinti tolesnes manipuliacijas, vietoje ATG
15 iniciacijos kodono kartu įterpiama nauja SmaI restrikcijos seka. ATG iniciacijos kodonas pateikiamas kartu su įterpimo vektoriumi. Gauta plazmidė žymima p1774 ir pateikta Pav. 2B.

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

25 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.

30 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.

35 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 rūgštis ir naudojamas MGS-3 vektoriaus terminavimo kodonas.

- B1. Sutrumpintas gp160 klonuojamas kaip SmaI/BamHI
5 restrikcijos fragmentas į MGS-4 jo SmaI/BglII restrikcijos saite. Šiame klone yra gp160 koduojančios sekos nuo 1 iki 757 amino rūgštis ir naudojamas MGS-4 vektoriaus terminavimo kodonas.
- 10 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 rūgštis ir naudojamas MGS-3 vektoriaus terminavimo kodonas.
- 15 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 rūgštis kodonu) iki paskutinio C galo kodono baltyme gp120. Šiame klone yra sekos 1 iki 516 amino
20 rūgštis, atstovaujančios visą gp120 koduojančią seką. Transliacijos pabaiga yra ties TAA, kuris yra MGS-3 vektoriuje.
- F. Sutrumpintas gp120, klonuotas kaip SmaI/BglII restrikcijos
25 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.
- G. Sutrumpintas gp120, klonuotas kaip SmaI/DraI restrikcijos
30 fragmentas į MGS-3 SmaI saitą. Šiame klone yra sekos, koduojančios nuo 1 iki 129 amino rūgštis, ir naudojamas MGS-3 vektoriaus terminavimo kodonas.
- H. Aukščiau pateikta SmaI/DraI konstrukcija, kurioje sekos,
35 koduojančios HBsAg, įterptos kaip BamHI fragmentas į BglII saitą, esantį žemiau už vektorių. Šis klonas turi sekas,



koduojančias pirmasias gp120 129 N galo amino rūgštis, bei toliau esančias rėmelyje sekas, koduojančias HBsAg.

5 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 rūgšties.

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

15

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 terminavimo kodonas.

20

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 seką, kuri sulieta su sekomis, koduojančiomis gp160 amino rūgštis nuo 472 iki 757.

25

Rekombinantinio bakuloviruso paruošimas ir selekcija

30 ŽIV env geno rekombinacijos plazmidės išsodinamos kalcio fosfatu su AcMNPV ir pridėdamos į neužkrėstas Spodoptera frugiperda ląsteles. Chimeriniai genai po to buvo įterpti į AcMNPV genomą naudojantis homologine rekombinacija. Rekombinantinis virusas identifiкуotas pagal occ^{-} lizės dėmės morfologiją. Tokios lizės dėmės pasižymi identifiкуojamu
35 citopatinium efektu, tačiau be branduolio okliuzijos. Siekiant gauti rekombinantinį virusą, atliekami du papildomi gryninimo panaudojant lizavimą. Rekombinantinė virusinė DNR analizuojama

ieškant ŽIV env sekų sait-specifinio intarpo, lyginant jų restrikcijos ir hibridizavimo charakteristikas su laukinio tipo virusine DNR.

5 ŽIV env ekspresija iš rekombinantinių bakulovirusų užkréstose vabzdžių ląstelėse

ŽIV env ekspresijos metu iš rekombinantinių bakulovirusų užkréstose vabzdžių ląstelėse vyksta pirminio transliacijos produkto - pre-probaltymo, turinčio visas koduojamas amino rūgštis pradedant nuo ekspresijos vektoriaus ATG iniciacijos kodono einant žemyn nuo poliedrino promotoriaus. Šis pirminis produktas sudarytas iš amino rūgščių, atitinkančių rekombinacijos vektoriaus kodonus. Pavyzdžiui, konstrukcijos A
10 pirminės transliacijos produkto N gale yra tokia seka: Met-Pro-Gly-Arg-Val. Met-Pro-Gly kodonai atsiranda dėl klonavimo strategijos.
15

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
20 signalinio peptido atpažinimas ir nuskėlimas yra būtina sąlyga efektyviam ląstelių procesingui.
25

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 elektroforezės metodu (PAGE) ir autoradiografijos metodu.
30

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

- 5 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
10 Susirgimų kontrolės centro kaip ŽIV neigiamas palyginamasis standartas.
3. polikloniniai antikūnai, sukelti ožkosė prieš gelyje išgrynintą gp120 apvalkalo baltymą, pagamintą iš išgryninto
15 užkrečiančio HTLV-III viruso.

Rezultatai pateikti Lentelėse 1 ir 2:

Lentelė 1

20	Izoliato nr.	Aprašymas	Terpė		
			ŽIV-neig.	ŽIV-teig.	gp120-teig.
Kontrolė					
		neužkr. Sf ląst.	-	-	-
25		užkr. ląst.	-	-	-
Rekombinantai					
	A.	2863 visas gp160 1-861	-	+	+
30	A1.	3715	nd	nd	nd
	B.	3046 sutrump.gp160 1-757	-	+	+
	B1.	3540	nd	nd	nd
	C.	3774 sutrump.gp160 1-645	nd	nd	nd
35	D.	4646 gp120, 1-516	nd	nd	nd
	E.	2040 sutrump.gp120	-	+	+

		1-472			
	F.	2165	sutrum. gp120	-	+ +/-
			1-279		
	G.	2196	sutrum. gp120	-	-
5			1-129		
	H.	3076	a.r.1-129	nd	nd
			sulietos su HBsAg		
	I.	3156	gp41, 472-861	-	+ +
	J.	4585	IL-2 sign. seka/	nd	nd
10			gp41		
	K.	3166	sutrum. gp41	-	+ +
			472-757		
	L.		IL-2 sign. seka/	-	-
			sutrum. gp41		

VALSTYBINIS PATENTŲ BIURAS

Lentelė 2

Izoliatų, prognozuojamų ir gautų rezultatų suvestinė

5	Konstrukcija/ izoliato nr.	Apvalkalo amino rūgštys ²	Prognozuojamas dydis 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
		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.

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 BALTYMŲ GRYNINIMAS

Rekombinantiniai ŽIV apvalkalo baltymai gaminami S. frugiperda ląstelėse praėjus 4-5 dienoms po užkrėtimo ŽIV rekombinantiniu AcNPV virusu. Didžioji dalis ekspresuotų baltymų yra
15 asocijuoti su užkrėstomis 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
20 galima naudoti tą patį gryninimo metodą. Toliau pateikiamas rekombinantinio gp160 baltymo, pagaminto iš ekspresijos vektoriaus Ac3046, gryninimo pavyzdys.

S. frugiperda ląstelės užkrečiamos rekombinantiniu Ac3046.
25 Praėjus 4-5 dienoms po užkrėtimo, ląstelės surenkamos ir perplaunamos, siekiant atskirti jas nuo ląstelių kultūros terpės. Iš pradžių, naudojant standartines procedūras, ląstelės išskiriamos į branduolio ir citoplazminių membranų frakcijas. Glikoproteinų frakcija, kurioje yra baltymas gp160
30 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
35 grynesnį gp160, glikoproteinų frakcija leidžiama per skysčių chromatografijos kolonėlę, užpildytą molekuliniais sietais.

VALSTYBINIS PATENTŲ BIŪRAS

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 įdomios 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 genas (env) koduoja 160 000 molekulinio svorio glikoproteiną

15 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 specifinio susidarymą su ląstelėmis, kurios ekspresuoja T4 receptoriaus

30 baltymą. Yra žinoma, kad 104 baltymo gp160 C galo amino rūgštys nebūtinos susiliejant 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 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 steriliame 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

VALSTYBINIS TYRIMŲ BIURAS

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 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 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 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.

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 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 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 radioaktyviu jodu 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 banko
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

Išradimo apibrėžtis

1. Diagnostinės kompozicijos gaminimo būdas, apimantis vektoriaus konstravimą, ląstelių transformaciją, auginimą bei ardymą ir baltymo išskyrimą, pasižymintis tuo, kad yra sudarytas iš tokių stadijų:
- 5
- a) rekombinantinio įterpimo vektoriaus konstravimas įterpiant bakuloviruso fragmentą į klonavimo sąrangą ir po to įterpiant AIDS viruso env, gag arba pol geną arba jo fragmentus į modifikuotą įterpimo vektorių taip, kad AIDS viruso env, gag arba pol genai arba jų fragmentai ekspresuojami veikiant bakuloviruso promotoriui;
- 10
- b) taip modifikuoto AIDS viruso env, gag arba pol geno arba jų fragmentų pernešimas į bakuloviruso ekspresijos vektorių sumaišant modifikuotą ekspresijos vektorių su bakuloviruso DNR;
- 15
- c) atitinkamų vabzdžių ląstelių transfekcija;
- 20
- d) rekombinantinių virusų, kurių sudėtyje yra AIDS viruso env, gag arba pol genas arba jų fragmentas;
- e) vabzdžių ląstelių arba vabzdžių užkrėtimas gautu rekombinantiniu virusu;
- 25
- f) gautų užkrėstų vabzdžių ląstelių arba vabzdžių auginimas siekiant ekspresuoti ir gauti AIDS viruso baltymą;
- 30
- g) AIDS viruso baltymo išskyrimas;
- h) AIDS viruso baltymo, gauto stadijoje g), komponavimas su žinomais diagnostiniais reagentais, pavyzdžiui, su skystu diagnostinės kompozicijos nešėju.
- 35

2. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad bakulovirusas yra branduolinės poliedrozės virusas Autographa californica.
3. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad bakuloviruso
5 promotoriumi yra poliedrino geno promotorius.
4. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad vabzdžių ląstelės yra Spodoptera frugiperda rūšies vabzdžių ląstelės.
- 10 5. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad bakuloviruso ekspresijos vektoriaus sudėtyje yra daugiau nei vienas AIDS viruso baltymus koduojantis genas arba jo dalis.
6. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad AIDS viruso env
15 genomas yra gp160 env genas.
7. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad AIDS viruso env genomas yra gp120 env genas.
- 20 8. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad AIDS viruso env genomas yra gp41 env genas.
9. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad pasirinktas AIDS viruso genas arba jo dalis yra iš AIDS env geno yra įterpimo
25 vektoriuose A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, A-1, arba B-1.
10. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad AIDS viruso genas arba jo dalis koduoja imunogeninį AIDS viruso env baltymo
30 fragmentą.
11. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad ekspresuojami AIDS viruso baltymai gryninimi lešiu lektinų chromatografijos metodu, siekiant išskirti glikoproteinus, bei glikoproteinus
35 frakcionuojant pagal dydį molekulinų sietų chromatografijos metodu.

IRAS

12. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad AIDS viruso baltymus fiksuoja ant kieto substrato, kuris nebūtinai skaidrus, pavyzdžiui, polistirolinių lėkštelių šulinėliai, filtrai arba plėvelė, arba ant tokio substrato, prie kurio
5 juos galima fiksuoti.

13. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad AIDS viruso baltymas yra žymėtas.

10 14. Diagnostinės kompozicijos, gautos pagal bet kurią iš p. 1-13 gavimas, panaudojimas antikūnų prieš AIDS virusą detekcijai, pavyzdžiui, žmogaus antikūnų, kai mėginys susijungia su AIDS viruso baltymu, esančiu diagnostinėje kompozicijoje, o antikūnai prieš AIDS virusą aptinkami
15 nustatant AIDS viruso baltymo ir antikūnų susirišimą arba sąveiką.

15 15. Diagnostinės kompozicijos pagal p. 14 panaudojimas, pasižymintis tuo, kad jis vykdomas taikant ELISA testą arba
20 Western blot analizę.

I-a dalis iš 4 dalių

Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His
AGGTTAATTGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCA ATG AGA GTG AAG GAG AAA TAT CAG CAC 6250

10 Signalinis peptidas ← - - - -
Leu Trp Arg Trp Gly Trp Lys Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Ile Leu Met Ile Cys Ser
TTG TGG AGA TGG GGG TGG AAA TGG GGC ACC ATG CTC CTT GGG ATA TTG ATG ATC TGT AGT 6310

- \ / - - - - → Ekstralastelinis regionas 42
Ala Thr Glu Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr
GCT ACA GAA AAA TTG TGG GTC ACA GTC TAT TAT GGG GTA CCT GTG TGG AAG GAA GCA ACC 6370
Kan I

50
Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val Trp
ACC ACT CTA TTT TGT GCA TCA GAT GCT AAA GCA TGG GCC ACA CAT GCC TGT GTA CCC ACA 6430

70
Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Val Val Leu Val Asn Val
TAT GAT ACA GAG GTA CAT AAT GTT GAC CCC AAC CCA CAA GAA GTA GTA TTG GTA AAT GTG 6490

90
Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asp Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile
ACA GAA AAT TTT AAC ATG TGG AAA AAT GAC ATG GTA GAA CAG ATG CAT GAG GAT ATA ATC 6550

110
Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Ser Leu
AGT TTA TGG GAT CAA AGC CTA AAG CCA TGT GTA AAA TTA ACC CCA CTC TGT GTT AGT TTA 6610
Dra I

130
Lys Cys Thr Asp Leu Gly Asn Ala Thr Asn Thr Asn Ser Ser Asn Thr Asn Ser Ser Ser
AAG TGC ACT GAT TTG GGG AAT GCT ACT AAT ACC AAT AGT AGT AAT ACC AAT AGT AGT AGC 6670

150
Gly Glu Met Met Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Ser Thr Ser
GGG GAA ATG ATG ATG GAG AAA GGA GAG ATA AAA AAC TGC TCT TTC AAT ATC AGC ACA AGC 6730

170
Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Phe Phe Tyr Lys Leu Asp Ile Ile Pro Ile
ATA AGA GGT AAG GTG CAG AAA GAA TAT GCA TTT TTT TAT AAA CTT GAT ATA ATA CCA ATA 6790

190
Asp Asn Asp Thr Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala
GAT AAT GAT ACT ACC AGC TAT ACG TTG ACA AGT TGT AAC ACC TCA GTC ATT ACA CAG GCC 6850

210
Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala
TGT CCA AAG GTA TCC TTT GAG CCA ATT CCC ATA CAT TAT TGT GCC CCG GCT GGT TTT GCG 6910

230
Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr
ATT CTA AAA TGT AAT AAT AAG ACG TTC AAT GGA ACA GGA CCA TGT ACA AAT GTC AGC ACA 6970

250
Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser

GTA CAA TGT ACA CAT GGA ATT AGG CCA GTA GTA TCA ACT CAA CTG CTG TTG AAT GGC AGT 7030

270
Leu Ala Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Ala Asn Phe Thr Asp Asn Ala Lys Thr Ile
CTA GCA GAA GAA GAG GTA GTA ATT AGA TCT GCC AAT TTC ACA GAC AAT GCT AAA ACC ATA 7090

Bgl II

290
Ile Val Gln Leu Asn Gln Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg
ATA GTA CAG CTG AAC CAA TCT GTA GAA ATT AAT AAA AGT ATC CGT ATC CAG AGG GGA CCA 7150

310
Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile Gly
TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA GGG AGA GGA AAT ATG AGA CAA GCA CAT TGT AAC 7210

330
Asn Met Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Ala Thr Leu Lys Gln
GCA TTT GTT ACA ATA GGA AAA ATA ATT AGT AGA GCA AAA TGG AAT GCC ACT TTA AAA CAG 7270

350
Ile Ala Ser Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Lys Gln Ser
ATA GCT AGC AAA TTA AGA GAA CAA TTT GGA AAT AAT AAA ACA ATA ATC TTT AAG CAA TCC 7330

370
Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr
TCA GGA GGG GAC CCA GAA ATT GTA ACG CAC AGT TTT AAT TGT GGA GGG GAA TTT TTC TAC 7390

390
Cys Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Phe Asn Ser Thr Trp Ser Thr Glu Gly
TGT AAT TCA ACA CAA CTG TTT AAT AGT ACT TGG TTT AAT AGT ACT TGG AGT ACT GAA GGG 7450

410
Ser Asn Asn Thr Glu Gly Ser Asp Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Phe Ile
TCA AAT AAC ACT GAA GGA AGT GAC ACA ATC ACA CTC CCA TGC AGA ATA AAA CAA TTT ATA 7510

430
Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg
AAC ATG TGG CAG GAA GTA GGA AAA GCA ATG TAT GCC CCT CCC ATC AGC GGA CAA ATT AGA 7570

450
Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn Asn Asn Gly
TGT TCA TCA AAT ATT ACA GGG CTG CTA TTA ACA AGA GAT GGT GGT AAT AAC AAC AAT GGG 7630

470
Ser Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr
TCC GAG ATC TTC AGA CCT GGA GGA GGA GAT ATG AGG GAC AAT TGG AGA AGT GAA TTA TAT 7690

Bgl II

490
Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg
AAA TAT AAA GTA GTA AAA ATT GAA CCA TTA GGA GTA GCA CCC ACC AAG GCA AAG AGA AGA 7750

510 Ekstralastelinis regionas Transmembraninis regionas
Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly
GTG GTG CAG AGA GAA AAA AGA GCA GTG GGA ATA GGA GCT TTG TTC CTT GGG TTC TTG GGA 7810

530
Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Arg Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu
GCA GCA GGA AGC ACT ATG GGC GCA CGG TCA ATG ACG CTG ACG GTA CAG GCC AGA CAA TTA 7870

550
Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His
TTG TCT GGT ATA GTG CAG CAG CAG AAC AAT TTG CTG AGG GCT ATT GAG GCG CAA CAG CAT 7950

III-a dalis iš 4 daliu

570

Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu
CTG TTG CAA CTC ACA GTC TGG GGC ATC AAG CAG CTC CAG GCA AGA ATC CTG GCT GTG GAA 7990

590

Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
AGA TAC CTA AAG GAT CAA CAG CTC CTG GGG ATT TGG GGT TGC TCT GGA AAA CTC ATT TGC 8050

610

Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn
ACC ACT GCT GTG CCT TGG AAT GCT AGT TGG AGT AAT AAA TCT CTG GAA CAG ATT TGG AAT 8110

630

Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser
AAC ATG ACC TGG ATG GAG TGG GAC AGA GAA ATT AAC AAT TAC ACA AGC TTA ATA CAT TCC 8170

Hind III

650

Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp
TTA ATT GAA GAA TCG CAA AAC CAG CAA GAA AAG AAT GAA CAA GAA TTA TTG GAA TTA GAT 8230

670

Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile
AAA TGG GCA AGT TTG TGG AAT TGG TTT AAC ATA ACA AAT TGG CTG TGG TAT ATA AAA ATA 8290

690

Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Ile
TTC ATA ATG ATA GTA GGA GGC TTG GTA GGT TTA AGA ATA GTT TTT GCT GTA CTT TCT ATA 8350

710

Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr His Leu Pro Thr Pro
GTG AAT AGA GTT AGG CAG GGA TAT TCA CCA TTA TCG TTT CAG ACC CAC CTC CCA ACC CCG 8410

730

Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Arg
AGG GGA CCC GAC AGG CCC GAA GGA ATA GAA GAA GAA GGT GGA GAG AGA GAC AGA GAC AGA 8470

750

Ser Ile Arg Leu Val Asn Gly Ser Leu Ala Leu Ile Trp Asp Asp Leu Arg Ser Leu Cys
TCC ATT CGA TTA GTG AAC GGA TCC TTA GCA CTT ATC TGG GAC GAT CTG CGG AGC CTG TGC 8530

BamHI

770

Leu Phe Ser Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg Ile Val Glu Leu
CTC TTC AGC TAC CAC CGC TTG AGA GAC TTA CTC TTG ATT GTA ACG AGG ATT GTG GAA CTT 8590

790

Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser
CTG GGA CGC AGG GGG TGG GAA GCC CTT AAA TAT TGG TGG AAT CTC CTA CAG TAT TGG AGT 8650

810

Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val Ser Leu Leu Asn Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala Glu
CAG GAA CTA AAG AAT AGT GCT GTT AGC TTG CTC AAT GCC ACA GCC ATA GCA GTA GCT GAG 8710

IV-a dalis iš 4 dalių

870
 Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile Pro
 GGG ACA GAT AGG GTT ATA GAA GTA GTA CAA GGA GCT TGT AGA GCT ATT CGC CAC ATA CCT 8770

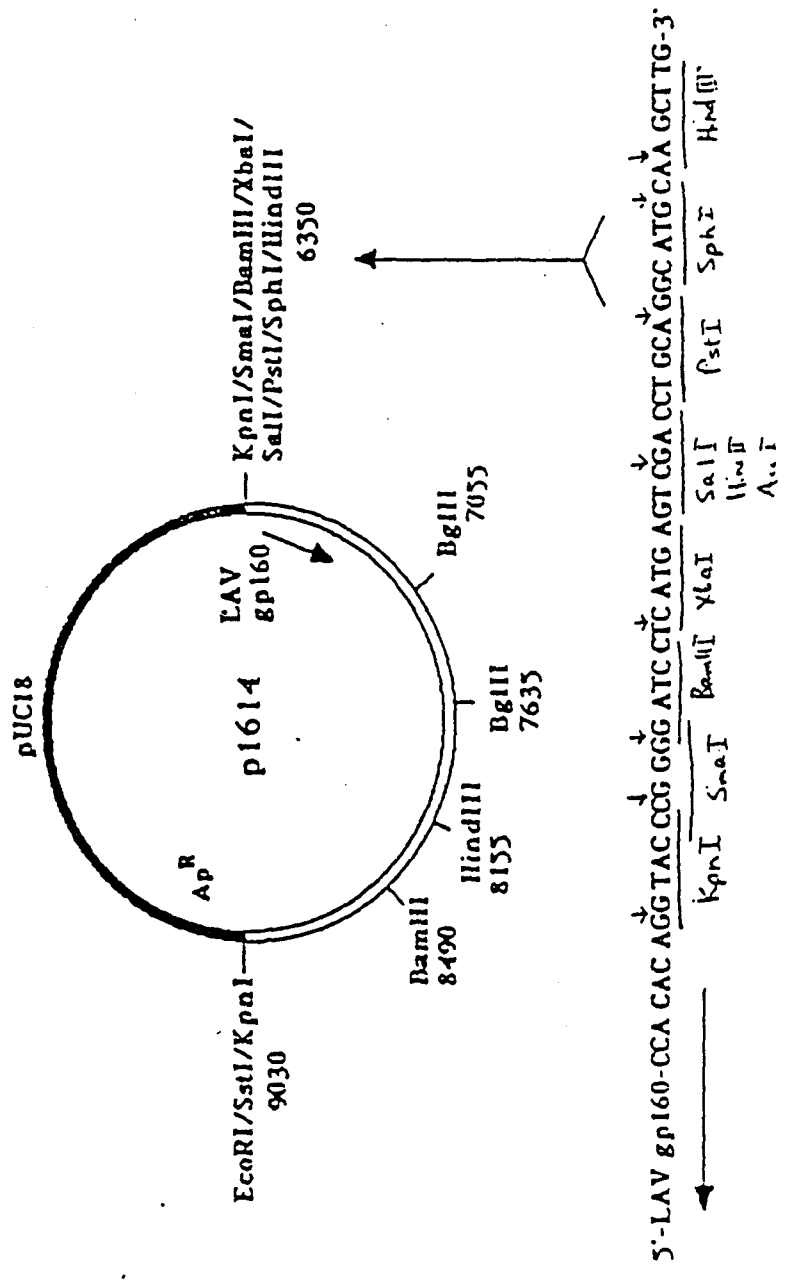
880 881
 Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Ile Leu Leu End
 AGA AGA ATA AGA CAG GGC TTG GAA AGG ATT TTG CTA TAA GATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGT 8877

AG-
 *
 GTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGACCGAGCTGACCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCT 8917

GGAAAACATGGAGCAATCACAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAAGAGGAGG 8997

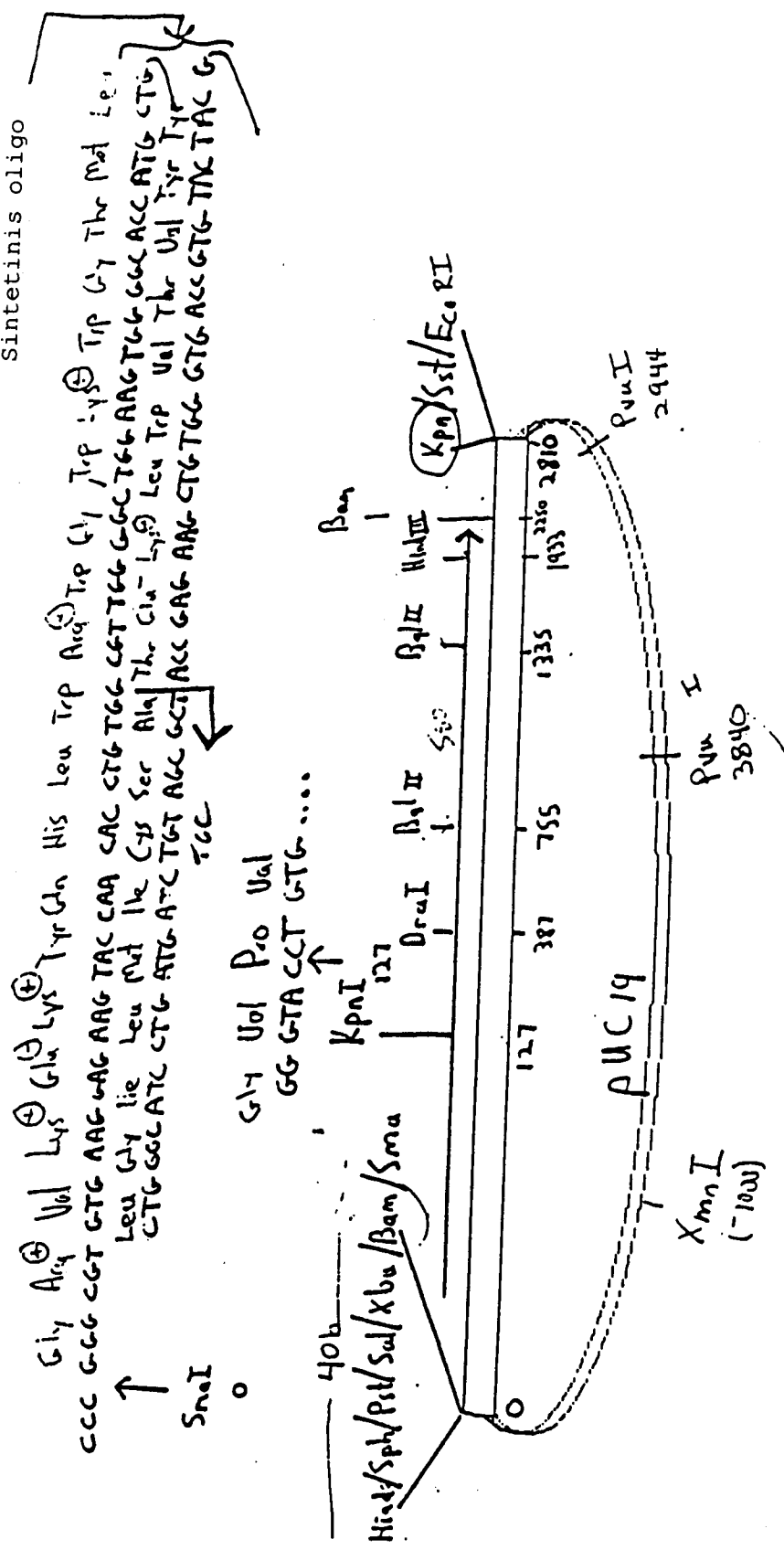
AGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTT 9077
 KpnI BglII

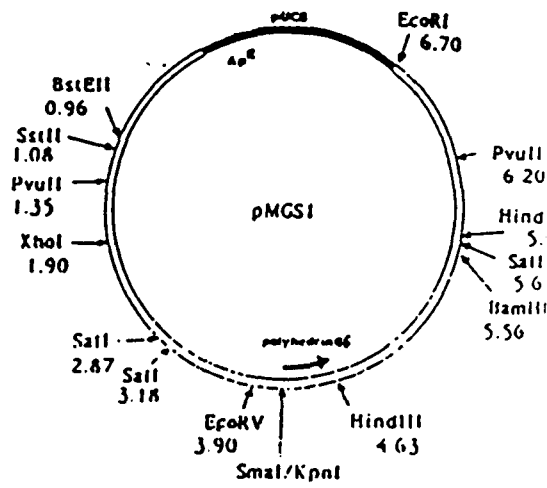
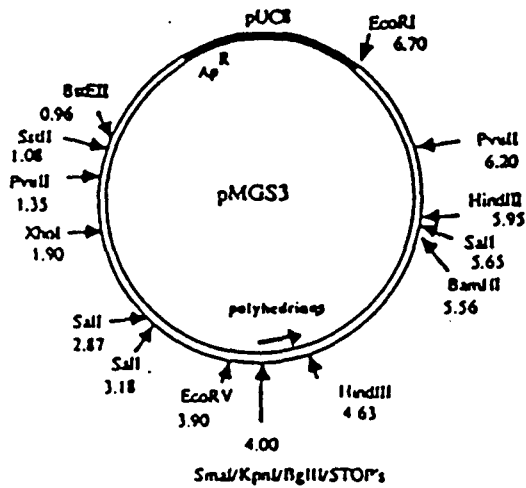
TTAAAAGAAAAGGGGGGACTG
 9100



Pav. 2A

Sintetinis oligo



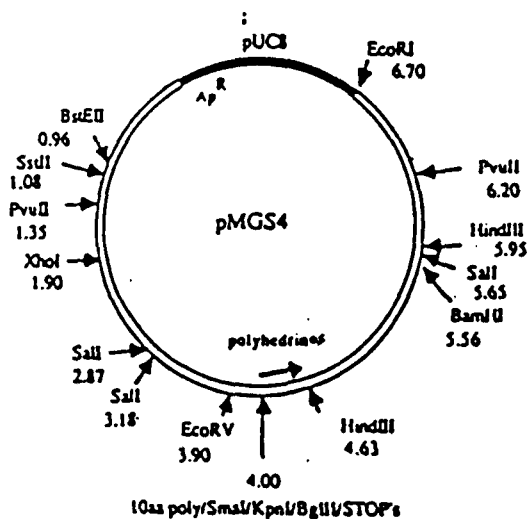


polyhedrin promoter A₁ CCTATAAATAATG CCC GGG GGT ACC AGA TCT TAA TTA ATT AAG T - 3'

↑ SmaI ↑ KpnI BglII STOP's

5' polyhedrin promoter ATG GCG GAT GAT AAG GAC TCT 3'

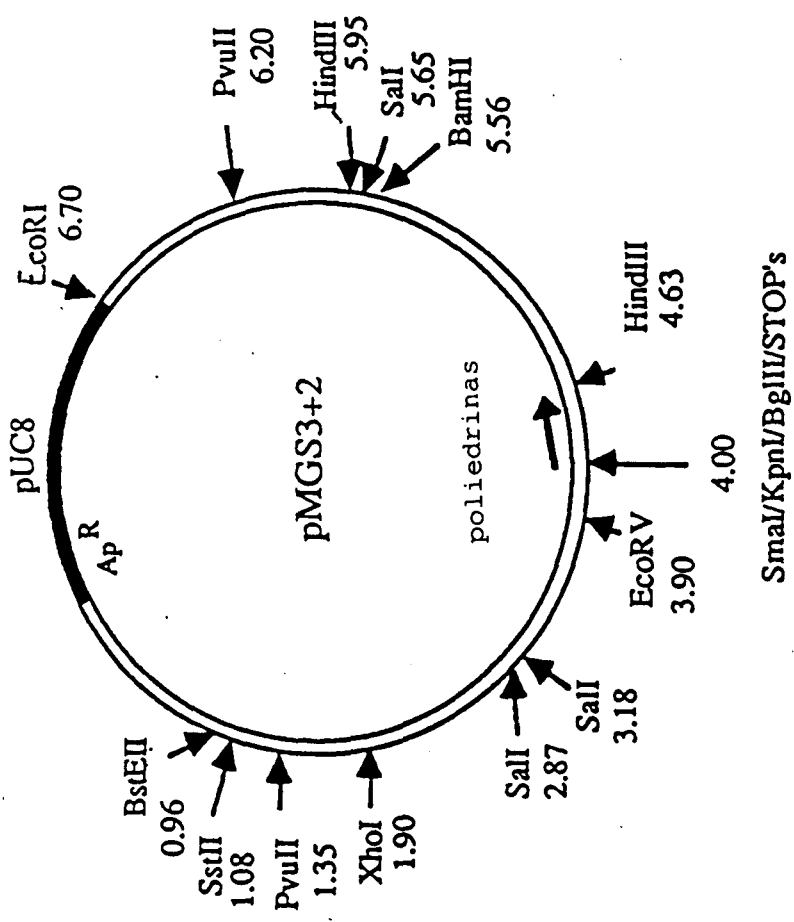
↑ SmaI KpnI ↑ SmaI



met pro asp tyr ser tyr arg pro thr ile gly pro

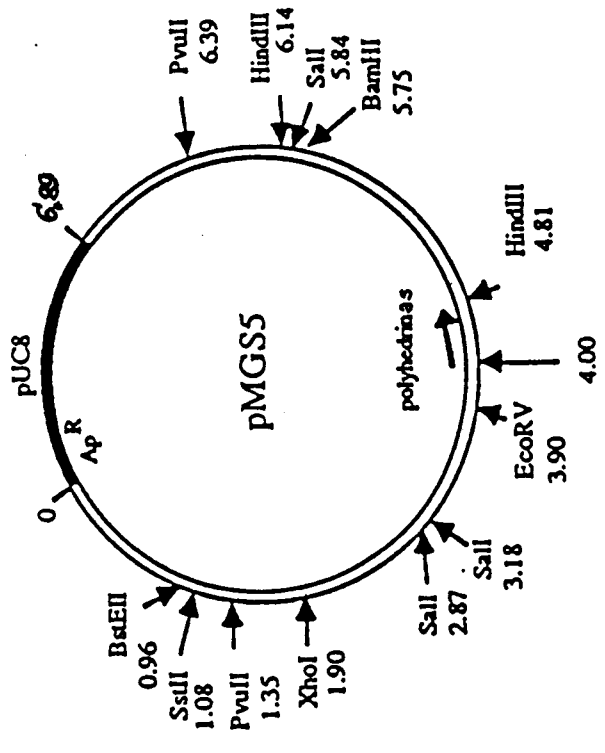
TAATG CCC GAT TAT TCA TAC CGT CCC ACC ATC GGG CCC GGG GGT ACC AGA TCT TAA TTA ATT AAG T - 3'

↑ SmaI ↑ KpnI BglII STOP's

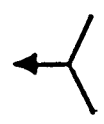


5'poliedrino A CCTATAAATAATG CCC CCG GGG TAC CAG ATC TTA ATT AAT TAA G T - 3'
 promotorius
 SmaI KpnI BglII STOP's

115



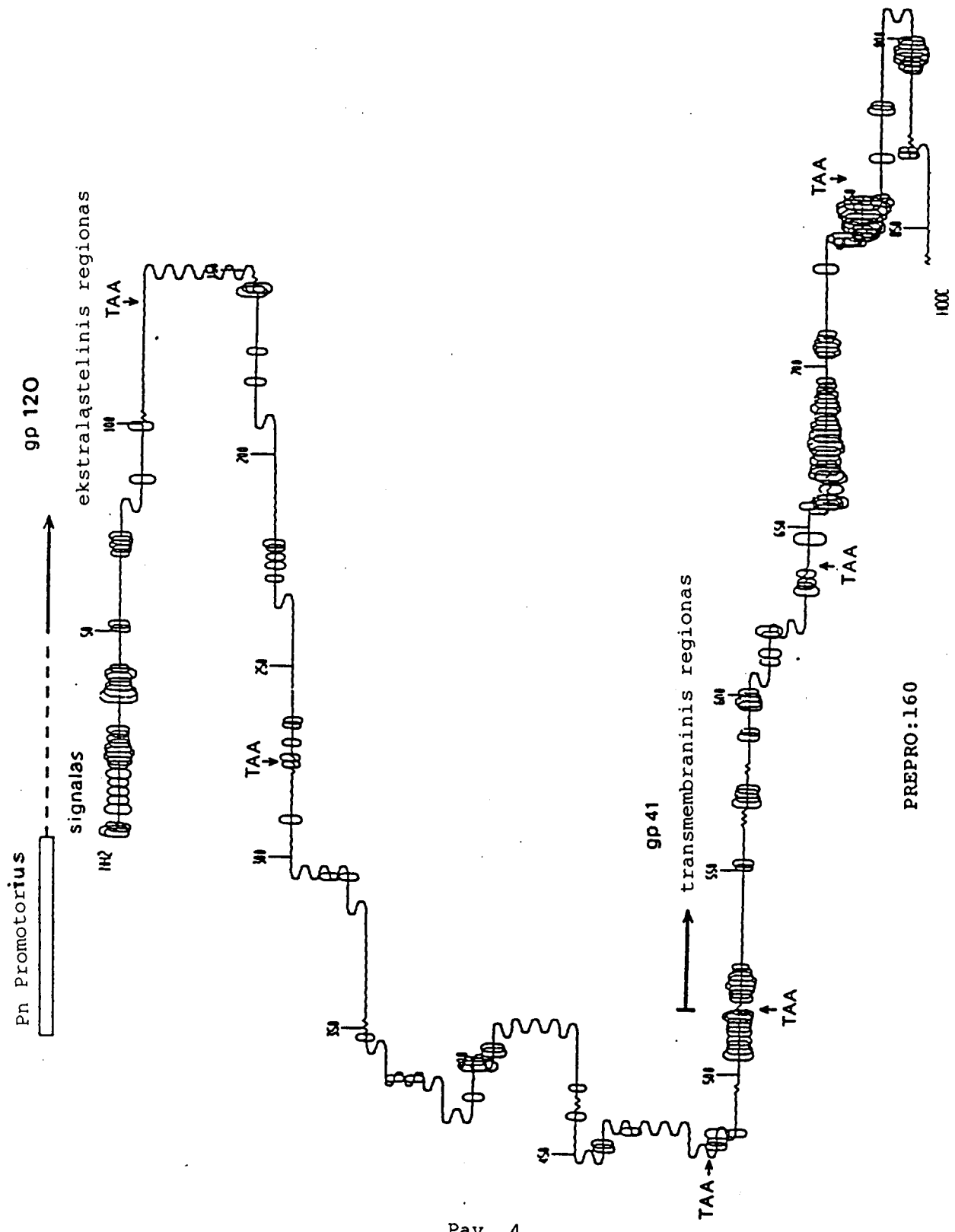
SmaI/IL2signal/EcoRI/KpnI/BglII/STOPS



5'- polyhedrin-A₇ CCTATAATATG CCC GGG TAC CGT ATG CAA CTG AGC TGC AGC TGC ATC GCT
 promoterius
 met pro gly tyr arg met gln leu leu ser cys ile ala
 SmaI
 leu ser leu ala leu val thr asn ser ala asn ser val pro asp leu asn STOP
 CTG AGC CTG GCT CTG GTT ACC AAC AGC GCG AAT TCG GTA CCA GAT CCA GAT CTT AAT TAA TTA - 3'
 EcoRI
 KpnI
 BglII

Skaldymo vieta

PstI, NcoI, XbaI ar SstI saity nera



Pav. 4.

