

(19)



(10) **LT IP1794 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **IP1794** (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**  
**4613937, 1989 04 21, 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 GERASIMOVIČ, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis“,**  
**Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT**

- (54) Pavadinimas:  
**Vakcinos prieš AIDS virusą gamybos būdas**
- (57) Referatas:  
—

27

5

10

### VAKCINOS PRIEŠ AIDS VIRUSĄ GAMYBOS BŪDAS

Išradime aprašomas vakcinos prieš AIDS virusą gamybos būdas.

15 Igytas 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)  
20 (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  
30 (Barin et al. 1985).

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

VALSTYBINIS PATENTŲ BIŪRAS

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, jų ląstelių kultūros sistema yra nepavojinga, netransformuojama ir efektyvi, jie turi labai efektyvų poliedrino promotorių, 30 kuris yra aktyvesnis negu bet koks kitas žinomas promotorius užkrėstose virusu eukariotų ląstelėse.

Bakuloviruso sistema turi daug pranašumų gaminant 35 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 priemaišiniiais 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<sup>-</sup>. 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

35 bakuloviruso vektoriuje būtina, kad koduojanti seka būtų išlygiuota su poliedrino promotoriumi ir aukštesnėmis sekomis ir iš kitos pusės su sutrumpintomis poliedriną koduojančiomis

VAIS... VIRAS

sekomis taip, kad homologinis rekombinavimas su bakuloviruso genomu leistų perkelti svetimą koduojančią seką, išlygiuota su poliedrino promotoriumi ir neaktyviu poliedrino genu.

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

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

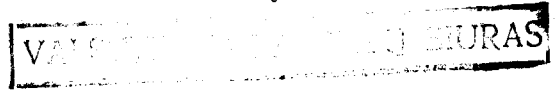
15

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  
20 nukleotidu, priklausančiu spėjamam ATG iniciacijos kodonui. Amino rūgštys numeruojamos pradedant ATG iniciacijos kodonu. Regionai, atitinkantys signalinį peptidą, ekstraląstelinį glikoproteiną (gp120) bei transmembraninį glikoproteiną (gp41) yra parodyti kartu su pasiūlytomis peptido skaldymo vietomis  
25 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.

30

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  
35 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.

5

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.

10

Pav. 4 parodyta gp160 pirmtako numatyta antrinė struktūra ir hidrofiliškumo profilis, gauti kompiuterinės analizės metodais pagal Chow ir Fastman programą (1974, Biochemistry 13.222).

15

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.

20

Įterpimo vektorius MGS-1 sudarytas iš tokių struktūrinių fragmentų: (Žr. Pav. 3): 4000 bp seka virš poliedrino geno ATG 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 EcoRI restrikcijos saito EcoRI-I klone.

25

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

30

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

35

IVIRAS

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, BglII 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 sulydomi su svetimimo 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 nuskeliamą IL-2 signalinį peptidą, bei EcoRI, KpnI, BglII 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 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).

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

IVIRAS

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  $\beta$  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).

35

ŽIV-env sekų klonavimo strategija pateikta Pav. 5.

WIRTSCHAFTS UNIVERSITÄT  
WIEN VIENAS

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  
5 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 sekos. Vietoj trūkstamos geno dalies, kurioje yra signalinio  
10 peptido sekos, buvo įterptas dvigrandis sintetinis 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  
15 seka. ATG iniciacijos kodonas pateikiamas kartu su įterpimo 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  
20 vektorius taip, kad įterpimo vektoriaus ATG iniciacijos kodonas būtų viename rėmelyje su apvalkalo geno kodonais. Taip pagamintos konstrukcijos parodytos Pav. 5.

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

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

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

IRAS!

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

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

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

F. Sutrumpintas gp120, klonuotas kaip SmaI/BglIII restrikcijos  
fragmentas į MGS-3 SmaI/BglIII saitą. Šiame klone yra sekos,  
koduojančios nuo 1 iki 645 amino rūgštis, ir naudojamas MGS-3  
25 vektoriaus terminavimo kodonas.

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  
30 vektoriaus terminavimo kodonas.

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

VALSTYBINIS TYRIMŲ CENTRAS

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.

5

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 seką, kuri sulieta su sekomis, koduojančiomis amino rūgštis nuo 473 iki gp160 C galo paskutinės rūgšties.

10

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.

15

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.

20

#### Rekombinantinio bakuloviruso paruošimas ir selekcija

25

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.

30

Rekombinantinis virusas identifikotas pagal occ<sup>-</sup> lizės dėmių morfologiją. Tokios lizės dėmės pasižymi identifikuojamu 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.

35

VALSTYBINIS VOKALIZAVIMAS

u7

ŽIV env ekspresija iš rekombinantinių bakulovirusų užkréstose vabzdžių ląstelėse

- 5 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
- 10 produktas sudarytas iš amino rūgščių, atitinkančių rekombinacijos vektoriaus kodonus. Pavyzdžiui, konstrukcijos A 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,
- 20 sudarytas iš 345 amino rūgščių ir ekstraląstelinė dalis, sudaryta iš 486 amino rūgščių. Paprastai manoma, kad 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, pridodant užkrėtimo pabaigoje  $^{35}\text{S}$ -metionino,  $^{35}\text{S}$ -cistino arba  $^3\text{H}$ -manozės. Žymėti ląstelių ekstraktai buvo analizuojami SDS
- 30 poliakrilamido gelyje elektroforezės metodu (PAGE) ir autoradiografijos metodu.
- Buvo naudojami trys serumo tipai siekiant įrodyti rekombinantinio baltymo, gaminamo ŽIV rekombinantiniu
- 35 bakulovirusu užkréstose vabzdžių ląstelėse, autentiškumą:

VALS...URAS

48

1. ŽIV teigiamas žmogaus serumas, gautas iš Susirgimų kontrolės centro (Center for Disease Control, CDC, Atlanta, Georgia) ir ŽIV teigiamas palyginamasis standartas.
- 5 2. ŽIV neigiamas žmogaus serumas, taip pat gautas iš Susirgimų kontrolės centro kaip ŽIV neigiamas palyginamasis standartas.
3. polikloniniai antikūnai, sukelti ožkose prieš gelyje
- 10 išgrynintą gp120 apvalkalo baltymą, pagamintą iš išgryninto užkrečiančio HTLV-III viruso.

Rezultatai pateikti Lentelėse 1 ir 2:

15 Lentelė 1

	Izoliato nr.	Aprašymas	Terpė		
			ŽIV-neig.	ŽIV-teig.	gp120-teig.
Kontrolė					
20	neužkr. Sf lašt.		-	-	-
	užkr. lašt.		-	-	-
Rekombinantai					
	A. 2863	visas gp160	-	+	+
25		1-861			
	A1. 3715		nd	nd	nd
	B. 3046	sutrump.gp160	-	+	+
		1-757			
	B1. 3540		nd	nd	nd
30	C. 3774	sutrump.gp160	nd	nd	nd
		1-645			
	D. 4646	gp120, 1-516	nd	nd	nd
	E. 2040	sutrump.gp120	-	+	+
		1-472			
35	F. 2165	sutrump.gp120	-	+	+/-
		1-279			
	G. 2196	sutrump.gp120	-	-	-

VALSŲ SERUMAS

43

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

VALI... LURA

10

Lentelė 2

Izoliatų, prognozuojamų ir gautų rezultatų suvestinė

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

VIA

CRAS

1. Amino rūgščių liekanos, kurių buvimas pre-pro-gene prognozuojamas pagal nukleotidų seką.
2. Nustatyta pagal esamų amino rūgščių liekanas ir prognozuojamas procesuotas formas.
- 5 3. Pagrindiniai imuniškai aktyvūs peptidai.

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

#### ŽIV APVALKALO BALTYMŲ GRYNINIMAS

Rekombinantiniai ŽIV apvalkalo baltymai gaminami S. frugiperda  
15 ląstelėse praėjus 4-5 dienoms po užkrėtimo ŽIV rekombinantiniu AcNPV virusu. Didžioji dalis ekspresuotų baltymų yra asocijuoti su užkrėstomis ląstelėmis. Visi čia aprašyti ŽIV apvalkalo geno produktai pasižymi panašiomis savybėmis: visi šie baltymai iš pradžių asocijuoti su ląstelėmis ir yra  
20 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.

25 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 standartines procedūras,  
30 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  
35 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.

- 5 Čia verta paminėti su šiuo išradimu susijusį straipsnį „AIDS 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.
- 10 Gautas gyvas rekombinantinis virusas VVTGeLAV nulemia env 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.
- 15 Be to, pelių užkrėtimas VVTGeLAV virusu sąlygoja aukštą 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
- 20 kultūrinę terpę. Tačiau tokia taktika, kai norint gaminti ir naudoti env baltymą, pavyzdžiui, vakcinose, siekiama sukelti imuninį atsaką prieš LAV arba ŽIV virusą, nėra visai tinkama, ypač dėl vakcinijos viruso kaip vektoriaus naudojimo.
- 25 Taip pat su šiuo išradimu susijęs straipsnis „Production of Human 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
- 30 Escherichia coli  $\beta$ -Galactosidase in Insect Cells with a 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
- 35 Europos patento publikacija Nr. 0 127 839 (paskelbta 1984 m. 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, 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 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 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.

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 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 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 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

VAL

AS

54

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

VAIKAS



06

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

5 ŽIV gp160 juostelės arba nešėjai gaminami pagal šį išradimą  
vienkartiniuose 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 banku  
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.

25 ŽIV gp160 ELISA lėkštelės buvo pagamintos pagal šį išradimą  
vienkartiniuose padėkluose su atitinkamu skaičiumi šulinėlių,  
pavyzdžiui, 96 šulinėliais. Visos inkubacijos daromos  
padėkluose. Į kiekvieną šulinėlį dedamas atitinkamas kiekis  
ŽIV gp160, pavyzdžiui, 100  $\mu$ l išgryninto ŽIV gp160, kurio  
koncentracija yra 1 $\mu$ g ŽIV gp160/ml. ŽIV gp160 baltymas  
30 paliekamas šulinėlyje adsorbuotis atitinkamą laiko tarpą,  
pavyzdžiui, per naktį esant 4°C. Likęs tirpalas pašalinamas  
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 šį išradimą. Šių nuorodų aprašymas įtrauktas į šį išradimą ir yra jo dalis.

Išradimo apibrėžtis

1. Vakcinos prieš AIDS virusą gamybos 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;
  - d) rekombinantinių virusų, kurių sudėtyje yra AIDS viruso env, gag arba pol genas arba jų fragmentas;
  - 20 e) vabzdžių ląstelių arba vabzdžių užkrėtimas gautu rekombinantiniu virusu;
  - f) gautų užkrėstų vabzdžių ląstelių arba vabzdžių auginimas siekiant ekspresuoti ir gauti AIDS viruso baltymą;
  - 25 g) AIDS viruso baltymo išskyrimas;
  - 30 h) vakcinos gaminimas iš AIDS viruso baltymo, gauto stadijoje g), standartinėje dozavimo sistemoje, labiau tinka standartiniai nešėjai ir/arba adjuvantai.
  - 35

V. J. ...

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, kuris yra  
25 įterpimo 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 lęšių lektinų chromatografijos metodu, siekiant išskirti glikoproteinus, bei glikoproteinus  
35 frakcionuojant pagal dydį molekulinų sietų chromatografijos metodu.

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 6310  
 TTG TGG AGA TGG GGG TGG AAA TGG GGC ACC ATG CTC CTT GGG ATA TTG ATG ATC TGT AGT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BD

II-a dalis iš 4 dalių

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

490

Bgl II

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 AAC AAT TTG CTG AGG GCT ATT GAG GCG CAA CAG CAT 7930

BJ

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  
 Bam HI

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

BC

IV-a dalis iš 4 dalių

830  
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

850 861  
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

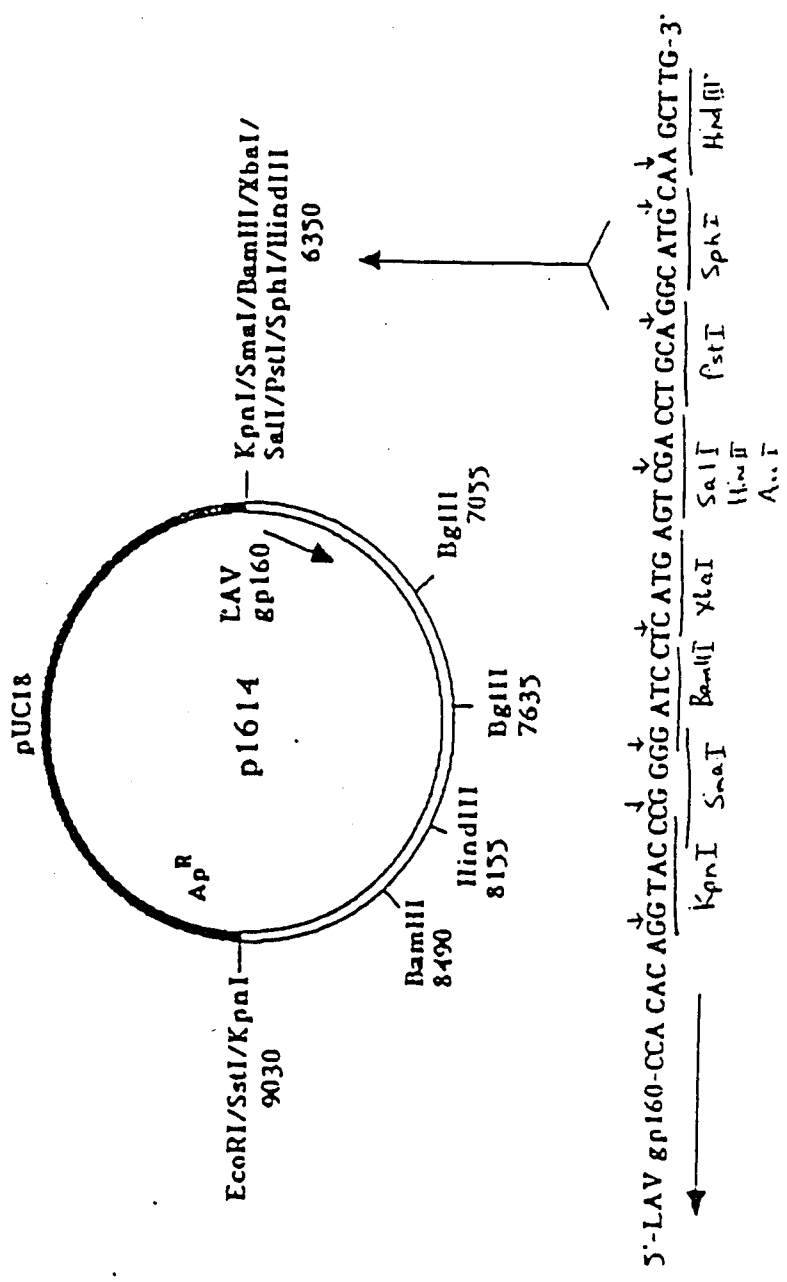
AG

GGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAAGATGACGAGCTGACCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCT 8917

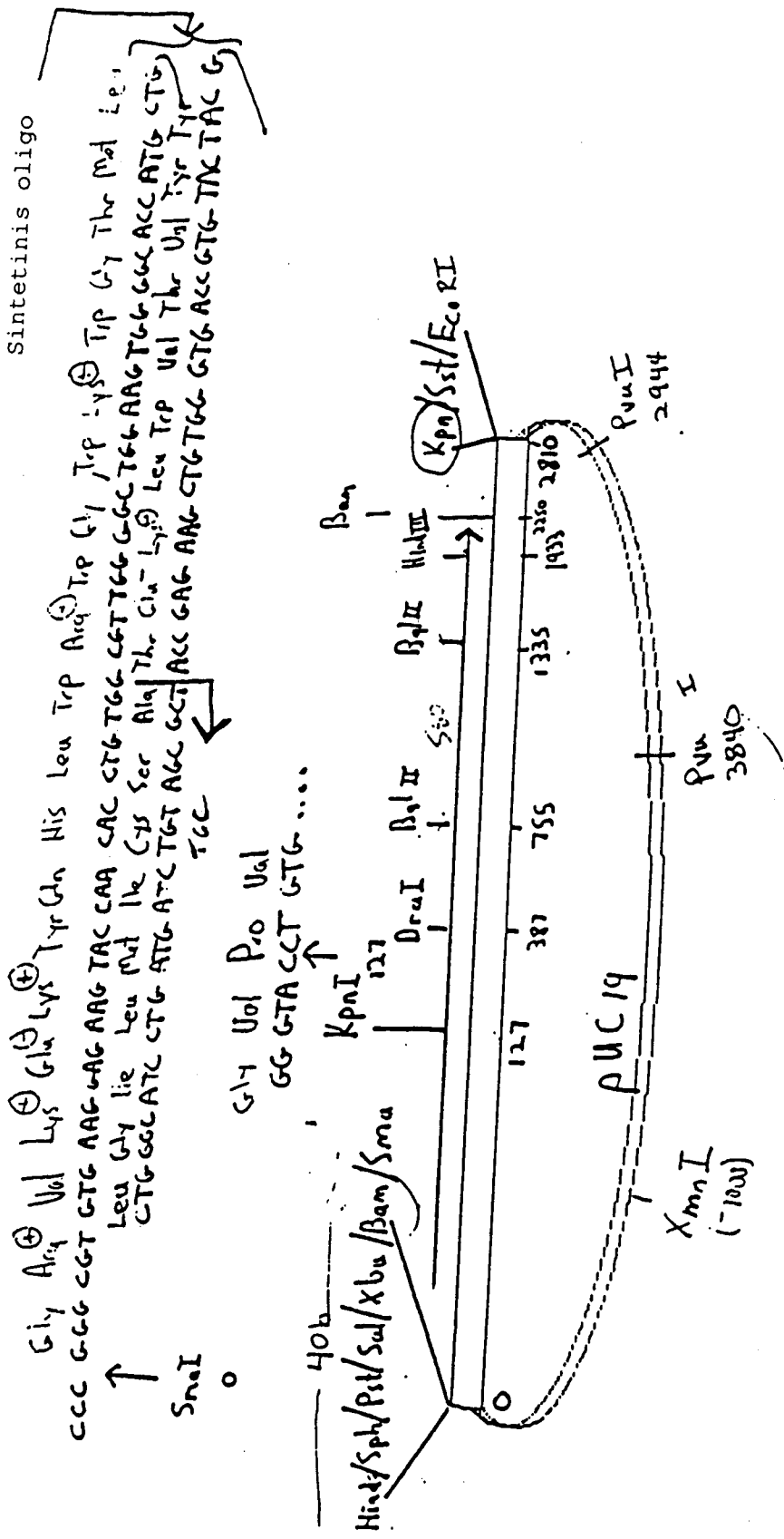
GGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGG 8997

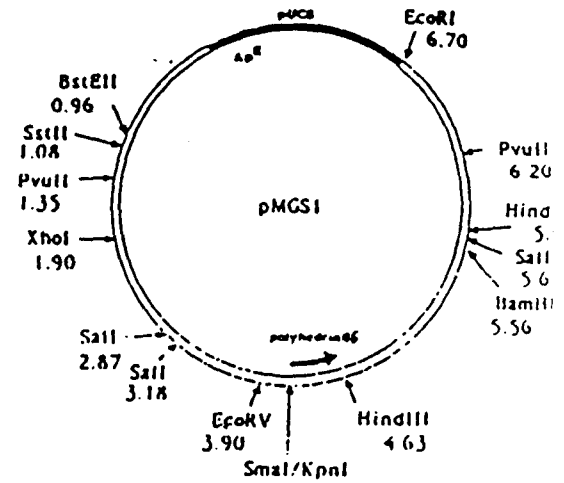
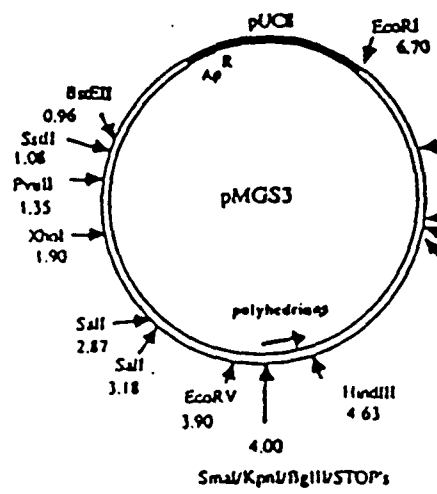
AGGAGGTGGGTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTT 9077  
KpnI BqII

TTAAAAGAAAAGGGGGGACTG  
9100



Pav. 2A



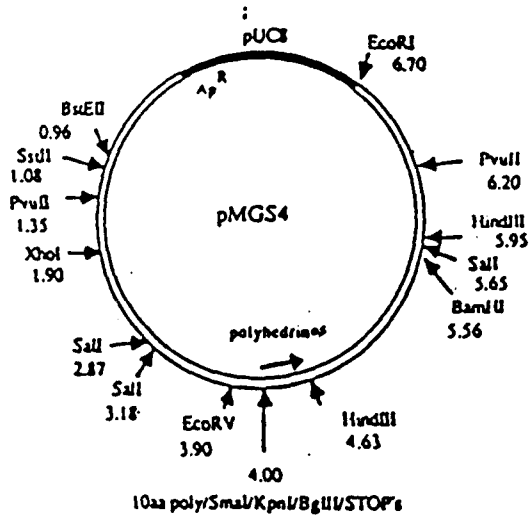


polyhedrin A CCTATAAATAATG CCC GGG GGT ACC AGA TCT TAA TTA ATT AAG T - 3'  
 promoter

↑ SmaI    ↑ KpnI    ↑ BglII    STOP's

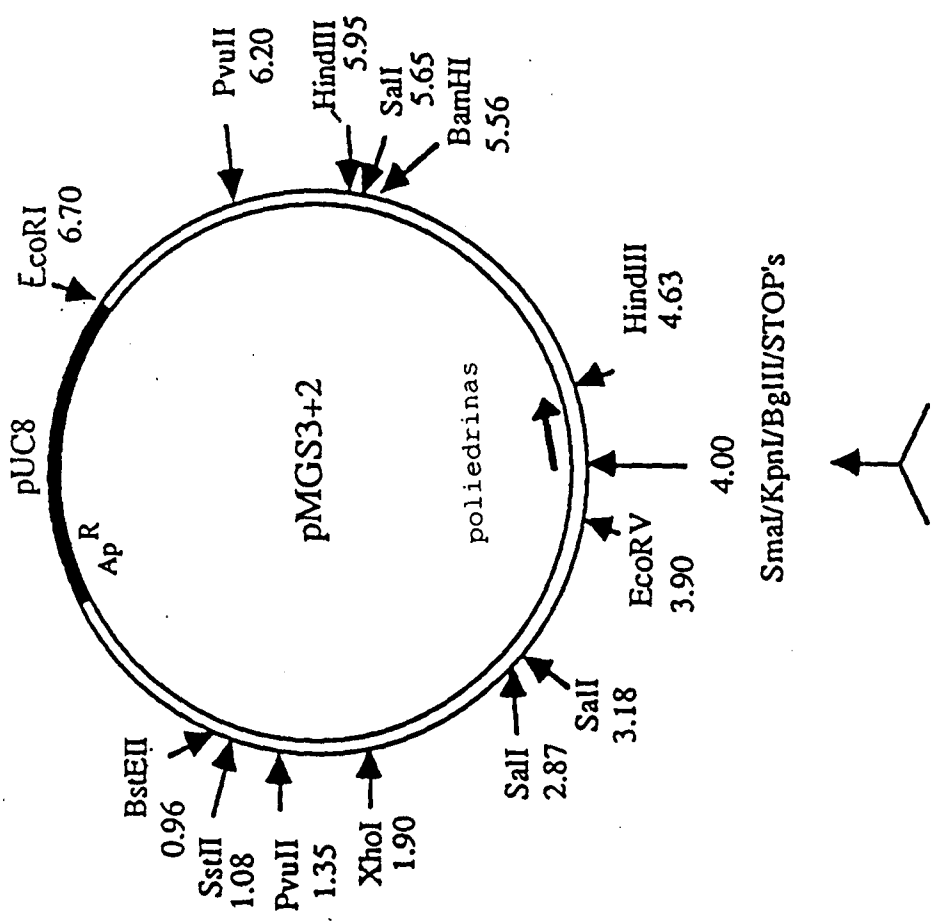
5' polyhedrin A TGC GGC GGC GGT ACC GAC TCT - 3'  
 promoter

↑ SmaI    ↑ KpnI    ↑ BglII



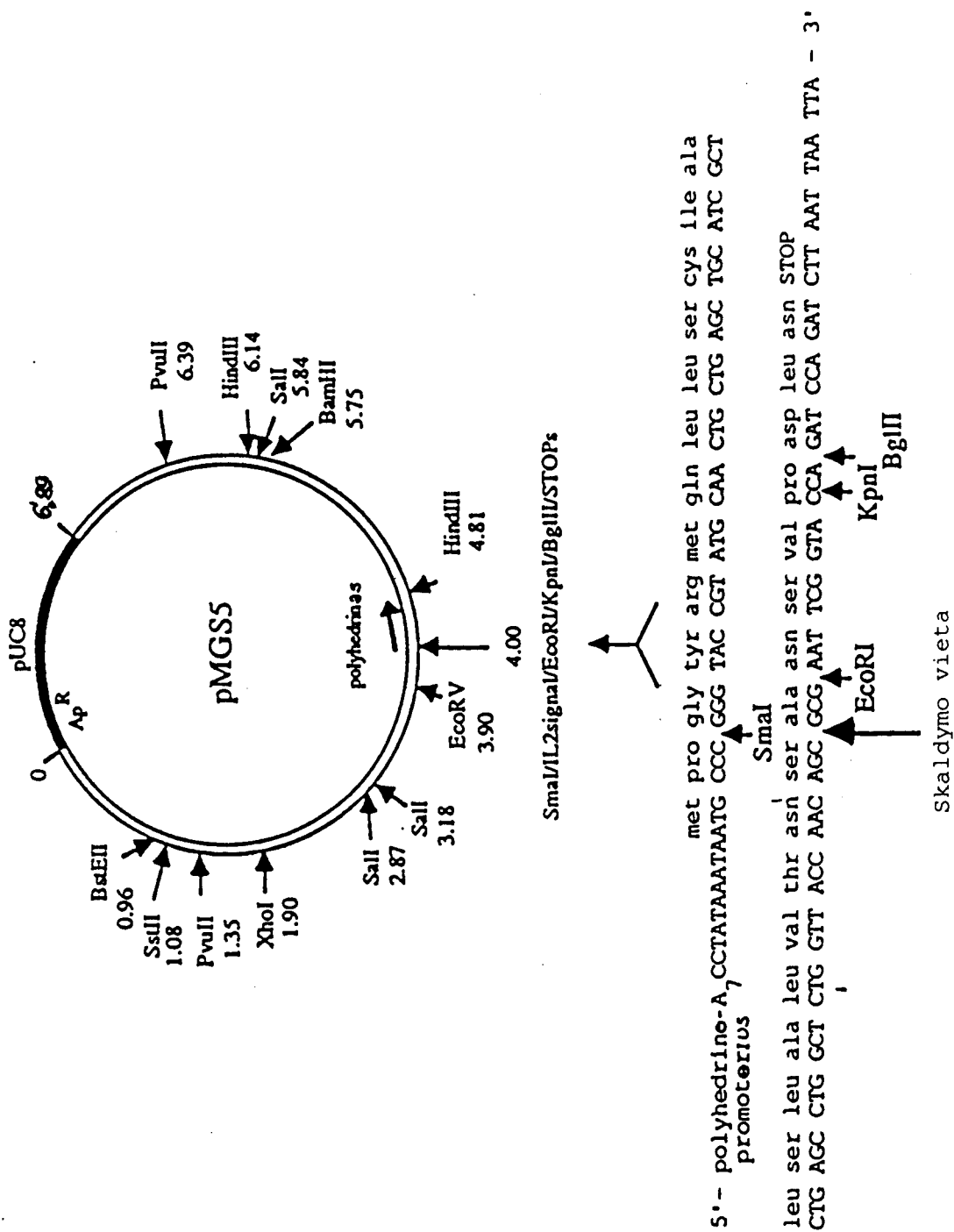
met pro asp tyr ser tyr arg pro thr ile gly pro ...  
 TAATG CCC GAT TAT TCA TAC CGT CCC ACC ATC GGG CCC GGG GGT ACC AGA TCT TAA TTA ATT AAG T - 3'

↑ SmaI    ↑ KpnI    ↑ BglII    STOP's



5'-poliedrino A CCTATAAATAATG CCC CCG GGG TAC CAG ATC TTA ATT AAT TAA GT - 3'  
 promotorius

↑ SmaI    ↑ KpnI BglIII    STOP's



Pav. 3C

PstI, NcoI, XbaI ar SstI saity nēra



