

(19)



(10) **LT IP1795 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **IP1795** (51) Int. Cl. (2006): **C12N 15/09**
A61K 39/21
- (22) Paraiškos padavimo data: **1994 01 24** **A61P 31/00**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 08 25** **C07K 1/00**
C07K 14/00
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: — **C07K 14/005**
C07K 14/195
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: — **C07K 14/435**
C12N 15/866
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: — **C12P 21/02**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: **151976, 1988 02 03, US**
4613511, 1989 02 02, SU
- (71) Pareiškėjas:
MicroGeneSys, Inc., 1000 Research Parkway, Meriden, Connecticut 06450, US
- (72) Išradėjas:
Gale E. SMITH, US
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis“,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Baltymo iš žmogaus imunodeficito I tipo viruso apvalkalo geno gavimo būdas
ir tokį baltymą turinti vakcina
- (57) Referatas:
—

LT IP1795 A

5

10 **BALTYMO IŠ ŽMOGAUS IMUNODEFICITO I TIPO VIRUSO APVALKALO
GENO GAMYBOS BŪDAS IR TOKIŲ BALTYMŲ TURINTI VAKCINA**

15

I-mojo tipo žmogaus imunodeficito virusas (ŽIV-1) yra retrovirusas, sukeliantis sisteminę infekciją, kurią lydi pagrindinė patologija imuninėje sistemoje. Žmogaus imunodeficito virusas yra įgyto žmogaus imunodeficito sindromo (AIDS) sukėlėjas. Barre-Sinoussi, et al.1983; Popovic et al.1984). Klinikiniai ŽIV-1 izolatai dar buvo priskiriami asocijuotam limfadenopatijos virusui (Feorino, et al.1984), žmogaus T-ląstelių leukemijos virusui III ir AIDS giminingam virusui (Levy et al. 1984).

25

AIDS įgavo pandemini pobūdį, todėl vakcinosis prieš AIDS sukūrimas tapo vienu pagrindinių sveikatos apsaugos uždavinių. Didelis procentas žmonių, užsikrėtusių ŽIV-1, sparčiai praranda imuninę funkciją dėl T4 limfocitų sumažėjimo. Šios T4 ląstelės, kaip ir tam tikros nervų ląstelės, savo paviršiuje turi molekulę, vadinamą CD4. ŽIV-1 atpažįsta CD4 molekulę receptoriaus, esančio ant virusinių dalelių apvalkalo dėka, po to patenka į ląstelę, replikuojasi ir galiausiai ją nužudo. Manoma, kad efektyvi vakcina prieš AIDS turėtų sukelti antikūnų prisirišimą prie ŽIV-1 viruso apvalkalo, taip apsaugodama T4 limfocitus bei kitas gautrias ląsteles nuo ŽIV-1.

Paprastai vakcinomis, kaip imunoprofilaktikai skirtomis priemonėmis, skiepijami sveiki asmenys, dar nesirgę nurodyta liga. Tačiau visiškai priimtina, jei efektyvi vakcina prieš AIDS bus vartojama po užsikrėtimo kaip imunoterapinė priemonė (Salk. 1987).

Šiuo metu plačiai paplitusi nuomonė, kad tinkamiausias kandidatas vakcinos prieš AIDS sukūrimui yra ŽIV-1 apvalkalas (Francis and Petricciani. 1985; Vogt and Hirsh.1986; Fauci. 1986). Iš pradžių ŽIV-1 apvalkalo baltymas yra susintetinamas kaip 160000 molekulinio svorio glikoproteinas (gp160). Tada gp160 pirmtakas suskaidomas į 120000 molekulinio svorio išorinį glikoproteiną (gp120) ir 41000 molekulinio svorio transmembraninį glikoproteiną (gp41). Šie apvalkalo baltymai yra svarbiausi antikūnų taikiniai-antigenai ligonių, sergančių AIDS, organizme (Barin, et al. 1985). Buvo parodyta, kad natyvus ŽIV-1 gp120 yra imunogeniškas ir sugeba indukuoti neutralizuojančius antikūnus graužikų, ožkų, rézus beždžionių ir šimpanzių organizmuose (Robey, et al. 1986).

Dėl labai žemo natyvaus ŽIV-1 apvalkalo baltymo lygio užkrėstose ląstelėse ir pavojaus, susijusio su AIDS vakcinos paruošimu iš ŽIV-1 užkrėstų ląstelių, ŽIV-1 apvalkalo antigenų, skirtų vakcinos prieš AIDS gamybai, gaminimui buvo pradėta naudoti rekombinantinės DNR metodus. Pasirodė, kad rekombinantinės DNR technika suteikia geriausias galimybes vakcinos prieš AIDS viruso subvienetų gamybai, nes įgalina saugiai ir pigiai gaminti imunogenus dideliais kiekiais. ŽIV-1 apvalkalo baltymo genas buvo ekspresuotas genetiškai pakeistuose rekombinantiniuose vakcinijos virusuose (Chakrabarti, et al.1986; Hu, et al. 1986; Kieny, et al. 1986). Be to, apvalkalo baltymo genai buvo ekspresuojami bakterijose (Putney, et al.1986), žinduolių (Lasky, et al.1986) bei vabzdžių ląstelėse. Buvo laikoma, kad sintetiniai peptidai, atitinkantys ŽIV-1 gp41 amino rūgščių

VALSŲ IR TARPŲ BIURAS

seka, irgi tinka tinka vakcinų prieš AIDS gamybai (Kennedy, et al. 1986).

Bakuloviruso - vabzdžių ląstelės vektorinės sistemos
5 naudojimas rekombinantinio ŽIV-1 apvalkalo baltymo gamybai, aprašytas kartu paduotoje ir pasirašytoje paraiškoje TSRS patentui gauti, serijos Nr. 420 35 83/13, užpildytoje 1987 m. spalio 15 d. Aukščiau minėta paraiška patentui ir joje cituotos publikacijos yra ir šio aprašymo dalis.

10

Buvo parodyta, kad bakuloviruso sistema apskritai yra naudinga gaminant ŽIV-1 bei kitus baltymus. Pavyzdžiui, bakulovirusas - Autographa californica branduolinės poliedrozės virusas (AcNPV) - buvo panaudotas kaip viso
15 ilgio gp160 ir atskirų ŽIV-1 apvalkalo geno dalių ekspresijos vektorius užkrėstose Spodoptera frugiperda (žolinio pelėdgalvio) ląstelėse (Sf9 ląstelės). Be to, ankstesnėse paraiškose patentui yra aprašyta sutrumpintas gp160 genas (rekombinanto numeris Ac3046); baltymas,
20 pagamintas rekombinantiniame Ac3046, ir Ac3046 geno produkto gryninimo būdai, kuriuose naudojama lęšių lektino afininė chromatografija bei gelfiltracinė chromatografija. Buvo nustatyta, kad šiuo būdu išgrynintas ir į daleles agreguotas gp160 baltymas yra labai imunogeniškas graužikams
25 ir primatų rūšims.

Ideali vakcina prieš AIDS turėtų būti ne tik biologiškai gryna bei apirogeniška, bet viena ar kelios jos injekcijos turėtų visam gyvenimui apsaugoti nuo ŽIV-1 infekcijos. Tai
30 yra būdinga gyvoms susilpnintoms vakcinoms. Kai vakcinų gamybai yra naudojamos užmuštos bakterijos ar virusai, arba iš jų išskirtos medžiagos, pavyzdžiui, toksoidai, baltymai, dažniausiai sukeliama silpnas imuninis atsakas ir įgyjamas tik trumpalaikis imunitetas. Siekiant įveikti arba sumažinti
35 šiuos vakcinų trūkumus, paprastai į vakciną įdedama papildoma medžiaga, vadinama adjuvantu. Adjuvantai - tai medžiagos, kurios padeda sukelti imuninį atsaką. Apskritai

VALSTYBINIS PATENTŲ BIURAS

vakcinose, skirtose žmonėms, naudojami adjuvantai yra aliuminio druskų geliai - aliuminio fosfatas arba aliuminio hidroksidas), paprastai vadinami alumo adjuvantais (Bomford, 1985).

5

Tolesni pavyzdžiai iliustruoja išradimą, neribodami jo pritaikymo sferos.

10 Rekombinantinis bakulovirusas - Autographa californica branduolinės poliedrozės virusas (AcNPV), turintis sutrumpintą ŽIV-1 gp160 geną, koduojantį ŽIV apvalkalo baltymo 1-757 amino rūgštis, yra aprašytas kartu paduotoje ir užregistruotoje paraiškoje SSSR patentui (paraiškos Nr. 420 35 83/13). Klonavimo stadijos, naudojamos konstruojant 15 rekombinantinį bakulovirusą, turintį ŽIV genus ar ŽIV-1 genu dalis, irgi yra aprašytos šiame patente ir yra šio patento dalis. Toliau pateiktas detalus geno inžinerinių stadijų, panaudotų konstruojant Ac3046 ekspresijos vektorių, aprašymas.

20

Naudotos medžiagos, tarp jų fermentai ir imunologiniai reagentai, buvo gautos iš komercinių šaltinių.

25 Žemiau pateikiamos praktinės šio išradimo detalės pagal pabaigoje pridedamus pavyzdžius.

1 Pav. iliustruoja klonavimo strategiją, panaudotą ŽIV-1 apvalkalo geno (env) išskyrimui iš E.coli plazmidės pNA2. Užtušiuotos dalys rodo ŽIV-1 DNR seką, neužtušiuotos - 30 klonavimo vektoriaus DNR seką. Tamsus plazmidės p1774 regionas yra sukonstruotas iš sintetinių oligonukleotidų ir įstatytas į plazmidės p1614 SmaI-KpnI saitus kaip SmaI-KpnI fragmentas. Pateikta šio sintetinio oligonukleotido seka.

35 2 Pav. iliustruoja rekombinantinės plazmidės vektoriaus (p3046) konstravimo strategiją, šis vektorius savo ruožtu buvo panaudotas bakuloviruso ekspresijos vektoriaus Ac3046

VIRUSAS

konstravimui. Plazmidė pMGS-3 turi bakuloviruso AcNPV sekas (užbrūkšniuotos skersai) kiekvienoje klonavimo saitų pusėje, pozicijoje 4.00. Šis regionas turi unikalius restrikcijos endonukleazių SmaI, KpnI ir BglII saitus.

5 AcNPV poliedrino promotorius yra 5' galo kryptimi nuo 4.00 pozicijos. Seka 5' -TAATTAATTAA-3' yra 3' kryptimi ir turi transliacijos terminacijos kodoną visuose trijuose skaitymo rėmeliuose. Plazmidė p1774 ir sintetinio oligonukleotido regiono seka yra parodyti 1 pav. Plazmidė p3046 turi visą

10 pMGS-3, išskyrus sekas tarp SmaI ir BglII saitų ir p1774 ŽIV-1 apvalkalo geną.

3 Pav. pateiktos DNR, supančios Ac3046 gp160 koduojančias sekas, nukleotidų sekos. 4 Pav. yra parodyta 3046 env DNA

15 seka tarp +1 ir +2264.

4a-4k Pav. pateikta Ac3046 ŽIV-1 env geno segmento pirminė DNR seka kartu su sintetinio oligonukleotido seka, esančia prie 5' env geno galo (tarp +1 ir +2264). Restrikcijos

20 endonukleazių saitai yra surašyti virš DNR sekos, o numatoma amino rūgščių seka - po DNR seka. Bazės sunumeruotos kairėje ir dešinėje.

5a-5d Pav. yra lyginamos Ac3046 env geno ir publikuota

25 LAV-1 env geno DNR sekos. LAV-1 seka yra viršuje, o Ac3046 - apačioje. Linija (l) po LAV-1 seka rodo, kad šioje pozicijoje Ac3046 seka yra ta pati. DNR sekos sunumeruotos tuo pačiu būdu, kaip LAV-1 Wain-Hobson. et al. 1985.

30 6 Pav. pateiktas antikūnų prieš ŽIV-1 titras, nustatytas imunofermentinės analizės metodu (IFA) teigiamuose žmonių serumuose (viršutinis grafikas), ir rėzus beždžionių, imunizuotų gp160 (IJ55, KL55) ar gp120 (AB55, CD55, GH55) serumuose (apatinis grafikas). Serumų titras prieš gerai

35 išgrynintus baltymus gp120 ir gp160 buvo išmatuotas IFA. Specifiškai prisijungę antikūnai buvo išryškinti, naudojant ožkos antikūnus prieš žmogaus IgG, konjuguotus su

VALSIOVA KILIMAS MURAS

peroksidaze iš krienų. Šiame teste titru laikomas didžiausias serumo praskiedimas, kuriam esant gaunamas teigiamas atsakas.

- 5 Toliau pateikiami pavyzdžiai, iliustruojantys šio išradimo praktinę pusę.

PAVYZDYS 1

- 10 Įterpimo vektoriaus MGS-3 konstravimas

Bakuloviruso vektoriuje klonuojant ir ekspresuojant svetimus baltymus koduojančias sekas reikia, kad koduojanti seka su poliedrino promotoriumi ir prieš ją esančios sekos būtų išrikiuotos vienoje pusėje, o bakuloviruso koduojančios sekos - kitoje pusėje. Esant tokiam išsidėstymui, homologinės rekombinacijos su bakuloviruso genomu metu svetimos koduojančios sekos yra perkeliamos kartu su poliedrino promotoriumi ir neaktyviu poliedrino genu.

20

Todėl ŽIV apvalkalo geno konstravimui buvo sukurti įvairūs įterpimo vektoriai. Įterpimo vektorius MGS-3, aprašytas žemiau, buvo sukonstruotas tam, kad tiektų ATG transliacijos iniciacijos kodoną. Svetimų sekų įterpimas į šį vektorių turėtų būti toks, kad transliacijos rėmelis, prasidedantis iniciacijos kodonu, tiksliai tiktų svetimoms sekoms.

Įterpimo vektorius MGS-3 buvo sukonstruotas iš Eco RI-I restrikcijos fragmento klonu, kurio DNR buvo išskirta iš išgryninto AcMNPV izoliato (WT-1). MGS-3 buvo sukonstruotas taip, kad turėtų šias struktūrines savybes: 4000 b.p. seką, esančią prieš poliedrino promotoriaus iniciacijos kodoną ATG; polilinkerį, įterptą "sait-specifinės" mutagenezės būdu, kuris turi iniciacijos kodoną ATG pozicijoje, atitinkančioje poliedrino iniciacijos kodono poziciją, ir restrikcijos saitus SmaI, KpnI, BglII, o taip pat universalų "stop" kodono segmentą; 1700 b.p. seką, nusitesusią nuo Kpn

INURAO

125

-7-

restrikcijos saito (kuris yra poliedrino gene) iki terminalinio EcoRI-I klonu EcoRI restrikcijos saito.

5 PAVYZDYS 2

Rekombinantinio vektoriaus p3046, turinčio DNR seką, koduojančią ŽIV-1 baltymo gp160 amino rūgštis nuo 1 iki 757, konstravimas.

10

Rekombinantinė plazmidė, pažymėta NA-2, sudaryta iš viso ŽIV-1 proviruso 21.8 k.b. segmento, įterpto į pUC18. Buvo duomenų, kad šis klonas yra infekcinis, kadangi gali gaminti virusą, sugebantį užkrėsti tam tikras žmogaus ląsteles (Adachi et al. 1986). Visos apvalkalo geno sekos, esančios NA-2, yra kilusios iš ŽIV LAV kamieno (Barre-Sinoussi et al. 1983).

ŽIV-1 apvalkalo genas buvo išskirtas ir naudojamas žemiau aprašytose ir pav.1 parodytose genų inžinerinėse procedūrose. Pirmiausiai iš NA-2 buvo išskirtas 3846 b.p. EcoRI/SacI restrikcijos fragmentas, turintis apvalkalo geną ir klonuotas į EcoRI/SacI restrikcijos saitą pUC19. Sukonstruota plazmidė pavadinta p708. Apvalkalo genas buvo pakartotinai išskirtas kaip 2800 b.p. KpnI restrikcijos fragmentas ir klonuotas į pUC18 KpnI restrikcijos saitą. Sukonstruota plazmidė pavadinta p1614. KpnI restrikcijos fragmentas, esantis p1614, turėjo nežymiai sutrumpintą ŽIV apvalkalo geną, kuriame trūko 121 b.p. ilgio N-galą atitinkančios sekos. Ši trūkstama geno dalis, koduojanti signalines peptidų sekas, buvo pakeista, įterpiant dvigrandį sintetinį oligomerą. Įterptas oligomeras buvo susintetintas iš LAV amino rūgščių sekos, naudojant poliedrino genui būdingus kodonus. Siekiant palengvinti tolesnes manipuliacijas, vietoj ATG iniciacijos kodono buvo įterpta nauja SmaI restrikcijos seka. ATG iniciacijos kodonas gaunamas iš bakuloviruso įterpimo vektoriaus. Sukonstruota

VIRUSAS

plazmidė pavadinta p1774.

Remiantis pav. 2 restrikcijos fragmentai iš p1774, turintys
įvairių ŽIV apvalkalo domenų koduojančias sekas, buvo
5 klonuoti į MGS įterpimo vektorių taip, kad skaitymo rėmelyje
būtų įterpimo vektoriaus iniciacijos kodonas ATG ir kartu
apvalkalo geno kodonai. Sukonstruota p3046 susideda iš
SmaI/BamHI restrikcijos fragmento, išskirto iš p1774,
įterpto į plazmidės vektoriaus pMGS-3 SmaI/BamHI saitą. Šis
10 klonas turi sekas, koduojančias baltymo gp160 1 - 757 amino
rūgštis, ir MGS-3 vektoriaus terminacijos kodoną.

PAVYZDYS 3

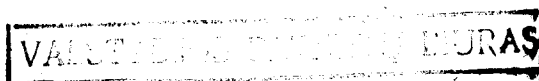
15 Rekombinantinio bakuloviruso ekspresijos vektoriaus Ac3046
paruošimas ir selekcija.

ŽIV env geno rekombinantinė plazmidė p3046 buvo išsodinta
kalcio fosfatu su AcMNPV DNR (WT-1) ir įdėta į neužkrėstas
20 Spodoptera frugiperda ląsteles. Tada chimerinis genas
homologinės rekombinacijos būdu buvo įterptas į AcMNP
genomą. Rekombinantiniai virusai buvo identifikuojami
morfologiškai, pagal neigiamą plokštelių okliuziją. Tokiose
plokštelėse pastebimas citopatinis efektas, bet be
25 branduolio okliuzijos. Siekiant gauti gryną rekombinantinį
virusą, buvo atliktos dvi papildomos lizės dėmių gryninimo
procedūros, einančios viena po kitos. Restrikcijos ir
hibridizacijos charakteristikas lyginant su atitinkamom
"laukinio tipo" virusinės DNR charakteristikom, buvo
30 patikrinta, ar rekombinantinėje virusinėje DNR įvyko ŽIV env
sekų "sait-specifinis" įterpimas. Gautas rekombinantinis
bakuloviruso ekspresijos vektorius Ac3046.

PAVYZDYS 4

35

ŽIV apvalkalo iš rekombinantinio bakuloviruso ekspresija
užkrėstose vabzdžių ląstelėse.



ŽIV env sekų iš rekombinantinių virusų ekspresija vabzdžių
ląstelėse turėtų baigtis pirminio transliacijos produkto
sinteze. Šis pirminis produktas - pre-pro-baltymas - bus
5 sudarytas iš amino rūgščių, transliuojamų nuo
rekombinantinio vektoriaus kodonų. Taip gaunamas baltymas,
kuris turi visas amino rūgštis, koduojamas nuo ekspresijos
vektoriaus iniciacijos kodono ATG, esančio už poliedrino
promotoriaus, iki transliacijos terminacijos signalo,
10 esančio ekspresijos vektoriuje. Pirminiame Ac3046
transliacijos produkte turėtų būti Met-Pro-Gly-Arg-Val, kai
Arg, esantis pozicijoje 4, originaliame LAV klone turėtų
būti pozicijoje 2. Met-Pro-Gly kodonai - klonavimo
strategijos pasekmė.

15

PAVYZDYS 5

gp160 intarpo seka ir supanti DNR seka, esanti
rekombinantiniame bakuloviruso ekspresijos vektoriuje
20 Ac3046 gp160 intarpo ir šoninės DNR nukleotidų seka buvo
nustatyta pagal restrikcijos fragmentą, išskirtą iš
virusinio ekspresijos vektoriaus Ac3046 DNR. Sekos buvo
nustatomos tokia tvarka: 3.9 kb EcoRV-BamHI fragmentas buvo
išgrynintas, restrikcijos endonukleazėmis suskaldžius Ac3046
25 virusinę DNR. Ac3046 virusinė DNR buvo paruošta iš
ekstraląstelinio viruso, esančio ląstelių, naudotų vakcinos
serijos gamybai, terpėje.

Kaip parodyta pav. 2, 3.9 kb EcoRV-BamHI fragmentas
30 sudarytas iš viso gp160 geno ir 100 b.p. DNR, esančios prieš
geną ir 1000 b.p. DNR, esančios už geno.

Taigi sekvenavimo rezultatai parodė, kad gauta chimerinė
konstrukcija, kurią nulėmė klonavimo strategija. gp160 seka
35 iš esmės buvo tokia pati, kaip nurodė Wain-Hobson, et al.
(1988). 2253 bazių porų seka tarp tariamų transliacijos
iniciacijos ir terminacijos kodonų lemia 751 amino rūgščių

128

kodoną ir 28 potencialius N-glikozilinimo saitus. Šio rgp160 molekulinis svoris (kartu su angliavandenių liekanomis) apytiksliai yra 145000.

- 5 Kaip matyti pav. 3, 4 ir 5, 200 bazių, priklausančių supančiai DNR, sekų analizė parodė tikslią inserciją.

6 PAVYZDYS

- 10 gp160 amino rūgščių seka

Naudojant standartinę automatizuotą Edmano degradaciją ir HPLC buvo nustatyta, kad pirmų 15-kos gp160 liekanų N-galinė seka yra identiška pagal DNR numatytai sekai. gp160
15 baltymas neturi N-galinio metionino. Tai atitinka stebėjimus, kad AcNPV poliedrino baltymas taip pat yra sintetinamas be N-galinio metionino. Analizuojant AcNPV 3046 DNR ir išgrynintą gp160, nustatyta, kad pirminės gp160 DNR ir N-galo baltymo sekos yra tokios:

- 20

LAV env genas AcNPV 3046 ekspresijos vektoriuje

123

Liekana # 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
 - Pro Gly Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His Leu Trp Arg
 Trp Gly
 ATG CCC GGG CGT GTG AAG GAG AAG TAC CAA CAC CTG TGG CGT
 5 TGG GGC

LAV env genas AcNPV originaliame LAV-1 klone

Liekana # 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
 10 Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly
 ATG AGA GTG AAG GAG AAG TAT CAG CAC TTG TGG AGA TGG GGC

PAVYZDYS 7

15 Rekombinantinio gp160 gryninimas

Vienas šio išradimo aspektų yra procedūra, naudojama rekombinantinio HIV-1 apvalkalo baltymo, koduoto Ac3046 ekspresijos vektoriuje, ekstrakcijai ir išskyrimui.

20 Rekombinantinis HIV-1 apvalkalo baltymas gp160 yra sintetinamas S. frugiperda ląstelėse 4-5 dienas po užkrėtimo Ac3046. Šio rgp160 baltymo gryninimo procese yra tokios stadijos:

- 25
1. Ląstelių plovimas
 2. Ląstelių suardymas
 3. Gelfiltracinė chromatografija
 4. Lęšių lektino afininė chromatografija
 5. Dializė

30

Tolesnėse stadijose aprašytas rekombinantinio gp160 gryninimas iš maždaug 2×10^9 ląstelių, užkrėstų Ac3046.

1. Ląstelių plovimas. Užkrėstos ląstelės plaunamos buferyje,
 35 turinčiame 50mM Tris'o buferio (pH 7.5), 1 mM EDTA ir 1 % Triton'o X-100. Šiame buferyje ląstelės resuspenduojamos, homogenizuojamos standartiniais metodais ir centrifuguojamos

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GRAS

20 minučių, esant 5000 aps/min. Šis procesas kartojamas 3 kartus.

2. Ląstelių suardymas. Nuplautos ląstelės suardomos ultragarsu 50mM Tris'o buferio (pH 8.0-8.5), 4% dezoksicholato ir 1% β -merkaptoetanolio mišinyje. Ardymas ultragarsu atliekamas naudojant standartinius metodus. Po ardymo ultragarsu lieka nesuirusios tik branduolio membranos dalelės, kurios pašalinamos centrifuguojant 30 minučių, esant 5000 aps/min. Stebėjimai per šviesos mikroskopą rodo, kad supernatante, turinčiame ekstrahuotą gp160, nėra nesuirusių ląstelių.

3. Gelfiltracija. Gelfiltracija atliekama stiklinėse 5.0x50 cm kolonose (Pharmacia), užpildytose Sephacryl (Pharmacia). Bendras sorbento tūris yra apytiksliai 1750 ml. Kolona ir žarnelių jungtys deproteinizuojami bei dezinfekuojami leidžiant per koloną 24 valandas mažiausiai 6 litrus 0.1 N NaOH. Eliuatas, ištekantis iš kolonos, eina per UV-kiuvetę, sujungtą su monitoriumi ir savirašiu (Pharmacia), kolona nulygsvarinama 4 litrais gelfiltracinio buferio. Nevalytas gp160 yra pakraunamas ant kolonos ir per ją leidžiamas gelfiltracinis buferis. Kolonoje nevalytas mišinys susiskirsto į tris dideles UV absorbuojančias frakcijas. Pirmasis pikas nubrėžiamas tarp apytiksliai 500 ir 700 ml, antrasis tarp 700 ir 1400 ml ir trečiasis tarp 1400 ir 1900 ml buferio. Toks pat eliuacijos profilis stebimas nedidelėse analitinėse kolonose, pagal kurias buvo nustatyta, kad pirmą piką duoda medžiaga, kurios molekulinis svoris >2000000. Šio piko frakcija silpnai absorbuoja, nes joje yra didelio molekulinio svorio lipidų bei lipidų kompleksų. Be to, šio piko frakcijoje yra nuo 10% iki 20% gp160, ekstrahuoto iš užkrėstų ląstelių. Neabejotina, kad ši gp160 frakcija sudaro kompleksus pati su savimi ir su kitais ląstelių komponentais, suformuodama didelio molekulinio svorio agregatus. Antrojo, plataus, piko frakcijoje, yra didžioji dalis gp160 ir baltymų, kurių

VILNIAUS UNIVERSITETAS

molekulinis svoris yra maždaug 18,000 - 200,000. Trečiojo piko frakcijoje yra mažai baltymų, ir didžia dalimi UV absorbcija sąlygojama β -merkaptoetanolio, esančio pavyzdyje.

5

Kai tik antrasis pikas užregistruojamas UV detektoriumi, eliuatas, ištekantis iš kolonos, nukreipiamas tiesiai į koloną su lęšių lektinu. Kai antrasis pikas išeina iš kolonos, eliuatas atjungiamas nuo kolonos su lęšių lektinu ir nukreipiamas lauk.

10

4. Lęšių lektinas. Didelis kiekis lęšių lektino afininio sorbento (Lentil Lectin Sepharose 4B) buvo išsigytas firmoje "Pharmacia". Lęšių lektinas buvo išgrynintas iki 98% švarumo afininės chromatografijos būdu ant Sefadekso ir tada imobilizuotas ant Sepharose 4B, naudojant bromcianą. Ligando kiekis matricoje yra maždaug 2 mg/ml gelio. Lęšių lektino kolona - tai 5.0x30 cm stiklinė kolona (Pharmacia), kurioje yra 125 ml lęšių lektino Sepharose 4B gelio.

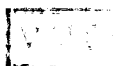
15

Rūpestingai praplovus ir pagal gamintojo rekomendacijas regeneravus, afininę matricą galima naudoti pakartotinai. Nenaudojant gelis yra saugojamas kolonoje, pripildytoje tirpalo, kuri sudaro 0.9% NaCl, 1 mM MnCl₂, 1mM CaCl₂ ir 0.01% mertiolato. Prieš kiekvieną naudojimą kolona yra plaunama ir nulygsvarinama 250 ml anksčiau aprašyto lęšių lektino buferio. Nevalytas gp160 yra leidžiamas tiesiai per koloną, nes nuo gelfiltracinės kolonos jis eliuojamas anksčiau aprašytu būdu. Kai neišgrynintas gp160 prisijungia prie kolonos, jis plaunamas 800 ml lęšių lektino buferio, turinčio 0.1% dezoksicholato. Esant šioms sąlygoms, visas gp160 prisijungia prie kolonos. Prisijungusių lipoproteinų, nustatomų UV detektoriumi, esant 280 nm bangos ilgiui, eliuacijai naudojamas lęšių lektino buferis su 0.3 M α -metil-manozidu.

25

30

35



PAVYZDYS 8

A. gp160 dalelių surinkimas.

5 Vienas šio išradimo aspektų buvo tai, kad gryninimo metu antigenas gp160 gali būti surinktas į > 2000000 molekulinio svorio daleles. Iš ląstelių ekstrahuojamas gp160 baltymų mišinys, turintis 80-90% monomerų (160,000 molekulinio svorio) ir 10-20% polimerų (dalelių forma). Gelfiltracijos
10 stadijoje pašalinamos agreguotos gp160 formos. Bandymai išskirti gp160 iš šios frakcijos (pirmasis pikas po gelfiltracijos) perša išvadą, kad jis sudaro kompleksus su kitais ląstelės baltymais ir galbūt net su membranos fragmentais. Tačiau gp160 antigeno, esančio antrajame
15 gelfiltracijos pike, molekulinis svoris yra maždaug 160000-300000. Tai rodo, kad dominuoja monomerinės bei dimerinės formos. Baltymo gp160 agregatai ar polimerai susidaro kolonoje su lęšių lektinu. Buvo nustatyta, kad antigenas sudaro agregatus tiek eliuojant 0.5% dezoksicholata nuo
20 kolonos su lęšių lektinu, kai kritinė micelių koncentracija (KMK) dezoksicholato atžvilgiu yra apytiksliai 0.2 %, tiek ir eliuojant gp160 nuo kolonos 0.1% dezoksicholatu. Agregatų dydis yra matuojamas didelę skiriamąją gebą turinčioje FPLC Superose 12 kolonoje (Pharmacia). Tipiškų išgryninto gp160
25 serijų pavyzdžiai dažniausiai yra 2000000 ar didesnio molekulinio svorio, lyginant su Dextran Blue standartu. Kadangi neglikozilinti baltymai atskiriami nuo gp160 antigeno lęšių lektino chromatografijos metu, panašu, kad hidrofobinės gp160 dalys pradeda formuoti tarpmolekulinius
30 asocijatus. Dezoksicholatas, matyt, neprisijungia prie gp160, kadangi galima palaikyti didesnę nei KMK jo koncentraciją, o antigenas toliau formuoja kompleksus. Pasirodo, kad toks antigeno agregavimasis yra būdinga šio baltymo savybė, jei jis buvo gryninamas pagal šį išradimą.
35 Gali būti, kad būtent ta hidrofobinė N-galinė seka, kuri yra gp160 baltyme, prisideda prie natūralaus šio baltymo sugebėjimo formuoti daleles. Po gryninimo galima gp160



kompleksus steriliai filtruoti per 0.2 mikronų skersmens celiuliozės acetato filtrą. Tokios procedūros metu neprarandama daug baltymo.

5 B. Dalelių susidarymo analizė.

Išgryninto gp160 dalelių analizė elektroninės mikroskopijos būdu parodė, kad tai yra panašios į baltymus, sferinės 30-100 nM dalelės. Norint įsitikinti, jog dalelės susidarė, išgrynintas gp160 papildomai analizuojamas gelfiltracijos būdu. Apytiksliai 100 mikrogramų gp160 buvo praleista per FPLC gelfiltracijos HR 10/30 Superozės koloną (Pharmacia, Inc.). Prieš tai kolona buvo kalibruojama, naudojant molekulinio svorio baltyminius standartus. Šioje kolonoje baltymų eliucijos profilis labai gerai pasikartoja; eliucijos tūris yra atvirkščiai proporcingas baltymų standartų molekuliniam svoriui. Kolonoje monomerinis gp160 atskiriamas nuo polimerinių formų ir pašalinami globuliniai baltymai, kurių molekulinis svoris $> 2 \times 10^6$. Dirbant su šia kolona, visas baltymas gp160 išteka su tuščiu tūriu, taigi molekulinis svoris yra $> 2 \times 10^6$ (2000000).

PAVYZDYS 9

25

gp160 adsorbcija ant alumo.

Netirpių aliuminio junginių kaip imunologinių adjuvantų efektyvumas priklauso nuo antigenų adsorbcijos ant kietos fazės. Viena šio išradimo dalis - tai atradimas, jog galima padaryti tokius alumo junginius, kurie efektyviai adsorbuotų gp160. Šiuo atveju pH turėtų būti toks, kad nesumažėtų gp160-alumo komplekso imunogeninis aktyvumas. Alumo (aliuminio fosfato gelio) susidarymo metu kontroliuojami tokie faktoriai:

1. Optimalus antigenų adsorbcijos prie alumo pH yra

AS

35

5 apytiksliai 5.0. Tačiau buvo atrasta, kad gp160, esant pH 6.5, praranda imunogeniškumą labiau nei esant pH 7.5. Todėl alumas buvo pagamintas esant pH 7.1+0.1. Buvo atrasta, kad esant šiam pH, visas gp160 dar adsorbuojasi prie alumo.

2. Joninė jėga, sąlygojama NaCl, yra santykinai maža ir mažesnė nei 0.15 M.

10 3. Naudojamas molinis aliuminio chlorido perteklius, lyginant su natrio fosfatu, užtikrinantis, kad supernatante nėra laisvų fosfato jonų.

15 4. Baltymas gp160 įdedamas į šviežiai pagamintą alumą, kad sustotų kristalų augimas ir sumažėtų dalelių dydis.

200 ml alumo ruošiami ir išgrynintas gp160 adsorbuojamas prie alumo taip, kad galutinė antigeno koncentracija būtų 40 µg/ml, kaip nurodyta žemiau.

20

B. Reagentų paruošimas (serijos po 200 ml).

Toliau nurodytus tirpalus ruoškite 100 ml talpos steriliuose depirogenizuotuose buteliuose ar stiklinėse.
25 Sumaišykite druskas, skirtas tirpalo 1 ir tirpalo 2 paruošimui, su natrio hidroksidu ir filtruokite per 0.2 mikronų skersmens celiuliozės acetato filtrus į 100 ml talpos sterilius depirogenizuotus butelius.

30

Tirpalas 1	AlCl ₃ .6H ₂ O	0.895 g
	NaHAc.3H ₂ O	0.136 g

35

Ištirpinti 40 ml vandens injekcijoms (VI), filtruoti per 0.2 mikronų filtrą

Tirpalas 2	Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O	1.234 g
------------	---	---------

VALSTYBINIS PATENTŲ BIŪRAS

Ištirpinti 40 ml VI, filtruoti per 0.2 mikronų filtra

Tirpalas 3 NaOH 2.0 g

5 Ištirpinti 100 ml VI, filtruoti per 0.2 mikronų filtra

Tirpalas 4 Tris 1.25g

10 Ištirpinti 100 ml VI, įpilti 1 ml į 90 ml VI, pH koreguoti iki 7.5 su 0.5N HCl ir pripilti VI iki 100 ml

2. Tirpalus autoklavuoti 30 min; lėtai išleisti garą.

15 Atšaldyti iki kambario temperatūros.

C. Alumo paruošimas

1. Supilti tirpalą 1 (aluminio chloridas-natrio acetatas) į paruošimo indą, naudojant 25 ml sterilias vienkartinės pipetes. Pasižymėti tirpalo 1 tūrį ir pradėti maišyti tirpalą.

2. Į indą įpilti tirpalą 2 (natrio fosfatas), naudojant 25 ml sterilias vienkartinės pipetes ir toliau maišyti krentant nuosėdoms. Pasižymėti tirpalo 2 tūrį.

3. Įpilti 3 ml tirpalo 3 (natrio hidroksidas) ir maišyti dar 5 min. Paimti 0.5 ml pavyzdį ir pamatuoti pH. Jei pH mažesnis nei 7.0, papildomai įpilti 0.5 ml natrio hidroksido, maišyti dar 5 min ir vėl pamatuoti pH. Tęsti, kol pH nusistovės tarp 7.0 ir 7.2.

4. Nustatyti bendrą tūrį, įpilta į paruošimo indą (tirpalas 1 + tirpalas 2 + tirpalas 3), tada įpilti sterilaus VI iki 100 ml.

VALSTYBINIS PATENTŲ BIŪRAS

5. Skubiai idėti 8,000 μ g išgryninto gp160 100 ml 1 mM Tris
pH 7.5 tiesiai į paruošimo indą.

6. Maišyti dar bent 20 minučių, tada paruoštą vakciną
5 išpilstyti į sterilius mėgintuvėlius.

VALSTYBINIS VETERINARINIS TYRIMŲ INSTITUTAS

PAVYZDYS 10

Alumo, adsorbuoto ant gp160, imunogeniškumas.

- 5 Tinkamas metodas antigeninio preparato (vakcinos) imunogeniškumo nustatymui yra specifinio imuninio atsako matavimas pelių, paskiepytų vienkartinė antigeno doze, grupėse. Baigiantis 4-tai savaitei pelės nukraujinamos ir antikūnų prieš nurodytus antigenus (paprastai prieš tuos antigenus, kuriais gyvūnai buvo imunizuoti) lygis serume yra 10 matuojamas standartiniu testu, t.y. IFA (imunofermentinė analizė).

- Išgryninto gp160 be adjuvanto, esant pH 6.0 ir 7.5, 15 adsorbuoto prie alumo (kaip aprašyta pavyzdyje 9) arba sumaišyto su pilnu Freund'o adjuvantu imunogeniškumas pelėms susumuotas žemiau.

	Grupė	gp 160 IFA		Serokonversija	
		ELISA		vidurkis	
5	gp160 Adjuvantas	Serijs #	OT ²	%	(P/N) ³
	1 µg Nėra, pH 7,5	8702		0.140	57 4/6
	Nėra, pH 6.0	8702		0.110	26 2/7
	Alumas	8702		1.000	90 9/10
10	Alumas	8705		2.285	100 6/6
	Freund'o	8604		1.108	83 5/6
	Freund'o	8702		1.396	100 7/7
	0.1 µg Freund'o	8604		0.434	67 4/6
	Alumas	8705		1.003	67 4/6

15

Pelių, imunizuotų vienkartinė 1.0 µg gp160 antigeno doze be jokio adjuvanto, organizme kyla imuninis atsakas į gp160 (žr. lentelę aukščiau). Žymiai stipresnis imuninis atsakas būna tuomet, kai pelės imunizuojamos vienkartinė 1.0 µg gp160, adsorbuoto ant alumo adjuvanto, doze.

20

Vienkartinė, mažesnė nei 0.1 µg gp160, sumaišyto su pilnu Freund'o adjuvantu arba adsorbuoto alumu, dozė sukels serokonversiją ≥50% imunizuotų pelių. Nors ir nestipriai, antigenas gp160 be adjuvanto buvo imunogeniškas pelėms, esant pH 7.5 ir pH 6.0. Esant žemesniam pH, imunogeniškumas prarandamas.

25

²Pelės nukraujintos praėjus 28 dienoms po imunizacijos ir praskiestas (1:10) serumas testuojamas ELISA metodu lyginant su gp160, išvalytu gelfiltracijos metodu. Analogiški rezultatai gauti naudojant komercinį ELISA testą (Genetic Systems Inc.; EIATM ELISA) prieš natyvius ŽIV-1 baltymus, kai serumas praskiestas 1:40.

³Serokonvertavusių pelių skaičiaus (P) santykis su visu pelių skaičiumi (N) bandyme.

140

PAVYZDYS 11

Ant alumo adsorbuoto gp160 imunogeniškumas (serumo tyrimas IFA metodais)

5

Vakcinės sugebėjimas sukelti imuninį atsaką yra labai svarbi biologinė savybė. Siekiant patvirtinti, kad gp160 vakcina, paruošta su alumu, yra imunogeniška gyvūnams, o alumo adjuvantas didina šį imunogeniškumą, buvo atlikti tokie
10 eksperimentai: nulinę dieną pelėms (10-ties gyvūnų grupėje) buvo suleista vienkartinė dozė (0.5 μg, 1.0 μg ir 5.0 μg) vieno gp160, gp160 adsorbuoto prie alumo ar gp160 su pilnu Freund'o adjuvantu (PFA). 28-tą dieną pelės buvo
15 nukraujintos ir IFA (praskiedimas 1:10) būdu patikrinti serumai, ar yra antikūnų prieš gp160.

Rezultatai, gauti po 28 dienų, susumuoti žemiau pateiktoje lentelėje. Visose grupėse daugiau nei 50% pelių buvo stebima serokonversija. Serokonversijų skaičius ir vidutinė serumo
20 absorbcija (OT₄₅₀ nm, esant praskiedimui 1:10, IFA) buvo didesni, suleidus bet kurią gp160, adsorbuoto ant alumo, dozę, nei imunizavus atitinkama vieno gp160 doze. Šie rezultatai rodo, kad alumo adjuvantas žymiai padidina gp160 antigeno imunogeniškumą.

28 dienos po suleidimo

	0.5 µg dozė			1.0 µg dozė		5.0 µg dozė	
	Vidurkis			Vidurkis		Vidurkis	
	P/N ⁴	OT ⁵		P/N	OT	P/N	OT
10	gp160	9/10	0.407	7/10	0.699	7/10	0.430
	gp160	9/10	0.547	8/10	0.797	10/10	0.347
	(alumas)						
	gp160	10/10	1.130	10/10	1.967	10/10	1.317
	(CFA)						

15

PAVYZDYS 12

Neutralizacijos duomenys

20 ŽIV neutralizacijos analizė yra pripažintas metodas norint nustatyti ar antikūnų preparatas inhibuoja ŽIV-1 virusą ir apsaugo nuo užkrėtimo jautrias žmogaus limfocitų kultūrų ląsteles. Gyvūnų, imunizuotų gp160, antiserumai buvo

⁴Serokonvertavusių pelių skaičiaus (P) santykis su visu pelių skaičiumi (N), praėjus 28 dienoms po imunizacijos 0.5 µg, 1 µg arba 5 µg VaxSynTM ŽIV-1.

⁵ Matuota vidutinė absorbcija (OT₄₅₀) serokonvertavusių pelių sponsorinės ELISA testu prieš gp160, kai serumo praskiedimas yra 1:10.



tikrinami ŽIV-1 neutralizacijos analizės būdu; rezultatai susumuoti žemiau pateiktoje lentelėje.

5	Gyvūnas	Identifi- kacija	Imunogenas/ Adjuvantas	Mikro- gramai ⁶	Neutralizuo- jantis titras ⁷
10	Rėzus	G55	gp120/Alumas	16/8/8	1:80-1:160
	Rėzus	H55	gp120/Alumas	16/8/8	1:80-1:160
	Rėzus	L55	gp160/Alumas	16/8/8	>1:80
15	Pelės	Miši- nys 3	gp120/Freund'o	.25/.25/.25	1:40-1:80
	Pelės	Miši- nys 8	gp160/Freund'o	.1/.1/.1	1:40-1:80
20	J.kiaulytės	Išgry- nintas IgG	gp160/Freund'o	10/10/10	1:320

25

Jūrų kiaulytės, triušiai ir rėzus beždžionės irgi buvo imunizuoti gp160 (su alumu arba Freund'o adjuvantu). Apskritai, imunizavus šiuos gyvūnus, buvo stebimas geras imuninis atsakas į ŽIV-1 apvalkalo baltymus.

30

⁶gp160 arba gp120 μg kiekis, suleistas pirmos/antros/trečios imunizacijos metu.
⁷didžiausias serumo praskiedimas, kai užkrėtimas inhibuojamas 50% lyginant su ŽIV-1 užkrėstomis ląstelėmis, kurios buvo eksponuotos su neimunizuotų gyvūnų serumu.

143

5

PAVYZDYS 13

Imunogeniškas šimpanzės organizme.

5 Genetiškai šimpanzės yra artimiausi žmogaus giminaičiai. Šiuo metu tai vienintelis gyvūno modelis, tinkamas ŽIV-1 infekcijos tyrimams. Toksiškumo/imunogeniško bandymai buvo atliekami su trimis beždžionėmis; dvi buvo imunizuotos 40 µg arba 80 µg gp160 su alumu paruošta

10 vakcina. Po 4 savaičių kiekviena jų buvo papildomai imunizuota, atitinkamai 40 µg arba 80 µg gp160. Kontroliniam gyvūnui tuo pat metu buvo suleistas 1 ml druskos tirpalo. Kiekvieną savaitę buvo imami visų trijų šimpanzių kraujo pavyzdžiai ir tikrinama, ar yra antikūnų

15 prieš gp160 ir ŽIV-1 virusinius antigenus. Buvo atliktos trys imunologinės analizės: IFA, naudojant išgrynintą gp160, sukurtą MicroGeneSys, Inc., "Western Blot" analizė ir standartinė ŽIV-1 IFA analizė. Šių analizių duomenys pateikti žemiau:

20

A. IFA (MGSearch HIV 160)

IFA analizė MGSearch HIV 160 (MGSearch yra MicroGeneSys, Inc. of West Haven, Connecticut, U.S.A., imunosorbentinės

25 analizės prieš gp160 prekės ženklas) yra aprašyta kartu paduotoje ir pasirašytoje paraiškoje JAV patentui, serijos Nr. 920,197. Serumo pavyzdžiai paimti prieš imunizaciją ir 11 savaičių po pirminės imunizacijos buvo praskiesti nuo 1:10 iki 1:100000 ir inkubuoti su nitroceliuliozės

30 juostomis, turinčiomis 100 µg išgryninto gp160 kiekviename taške. Galutinis titras - tai didžiausias antikūnų prieš gp160 praskiedimas, kuriame testas davė teigiamus rezultatus, naudojant ožkos antikūnus prieš žmogaus IgG, konjuotus su šarmine fosfataze. Serumo pavyzdžiai, paimti

35 iš kontrolinių bei bandomųjų gyvūnų, prieš imunizaciją buvo neigiami. Šimpanzės, kuriai buvo suleista 80 µg dozė, serumas buvo teigiamas, praskiedus 1:100, praėjus dviem

100

savaitėm, o šimpanzės, kuriai buvo suleista 40 µg dozė, serumas buvo teigiamas, praskiedus 1:10, praėjus keturioms savaitėms. Antikūnų prieš gp160 titras didėjo iki 5-tos savaitės, kai galutinis titras atitinkamai buvo 1:100000 ir 5 1:2000000. Abiejų gyvūnų antikūnų titrai per 6-11 savaites nukrito labai nežymiai. Toks atsako tipas yra ir kokybiškai, ir kiekybiškai panašus į šimpanzių, paskiepytų vakcina prieš žmogaus hepatitą B, imuninį atsaką.

10 B. Komeracinis IFA testas

Iš šimpanzių, imunizuotų VaxSyn, serumų analizės MGSearch ŽIV 160 ELISA ir Western blot'o metodais, aišku, kad jose vyko serokonversija ir buvo antikūnų prieš rekombinantinį 15 gp160 (VaxSyn yra MicroGeneSys, Inc. AIDS vakcinos prekės ženklas). Siekiant iširti, ar jose gaminami ir anti-ŽIV antikūnai, atpažįstantys natyvius virusinio apvalkalo baltymus, serumai prieš imunizaciją ir serumai, paimti 1-11 savaitę, buvo tikrinami naudojant licenzijuotą komercinį IFA 20 testų rinkinį (LAV EIA test kit of Genetic System Corporation, Seattle, Washington, USA, LAV EIA yra Genetic System Corporation prekės ženklas, Seattle, Washington, USA). Gyvūno, imunizuoto 80 µg gp160, serumas buvo teigiamas, praskiedus 1:100, praėjus dviem savaitėm; 25 antikūnų lygis jame ir toliau didėjo visas 6 savaites. Gyvūno, imunizuoto 40 µg gp160, serumas, praskiedus 1:100, buvo teigiamas 6-tą savaitę.

Genetic System Corporation
Seattle, Washington, USA

PAVYZDYS 14

Antikūnų prieš gp120 ir gp41 pasiskirstymas

- 5 Svarbu nustatyti, ar imuninis atsakas į gp160 paskiepytame gyvūne nukreiptas prieš gp41, gp120 ar prieš abu baltymus. Antikūnų prieš įvairius ŽIV-1 apvalkalo baltymo regionus nustatymui ir jų lygio išmatavimui buvo naudojami įvairūs imunologiniai metodai, pavyzdžiui, radioimunoprecipitacija
10 (RIP), imunofluorescencija (IF), "Western blot" analizė (WB) ir kiekybinė IFA prieš tris skirtingus rekombinantinius apvalkalo antigenus.

Pav.6 susumuoti trijų skirtingų rekombinantinių antigenų
15 imuniniai reaktyvumai: (1) gp120- γ (sutrumpintas rekombinantinis ŽIV-1 gp120, kurio molekulės C-gale trūksta maždaug 40 amino rūgščių); (2) gp120 (viso ilgio rekombinantinis ŽIV-1 gp120) ir (3) gp160.

- 20 50 individų, turinčių antikūnus prieš ŽIV-1, serumai ir 3 sumaišyti žmonių serumai gerai reagavo į gp160, vidutiniškai - į gp120 ir silpnai arba visai nereagavo į sutrumpintą gp120. Panašu, kad sutrumpintas gp120, kuris sudaro daugiau nei 90% išorinio ŽIV-1 glikoproteino, turi apsauginių
25 determinančių. Tai, kad AIDS teigiami žmogaus serumai turi mažai antikūnų prieš šį apvalkalo regioną, atitinka faktą, jog imuninis atsakas nevisiškai apsaugo nuo virusinių infekcijų, o teigiami žmonių serumai paprastai rodo žemą neutralizuojančio aktyvumo lygį *in vitro*. Priešingai, rėzus
30 beždžionių, imunizuotų imunogenu gp160 arba sutrumpintu gp120, serumuose yra antikūnų, reaguojančių tik su ŽIV-1 apvalkalo sutrumpinta gp120 dalimi. Gali būti, kad toks skirtingas antikūnų atpažinimo saitų pasiskirstymas viruso apvalkale ir aukštesni beždžionių organizmo titrai sąlygoja
35 aukštus neutralizuojančius titrus beždžionių serumuose. Kiekybinis šių trijų rekombinantinių apvalkalo antigenų imuninio aktyvumo žmogaus ir imunizuotų rėzus beždžionių

serumų įvertinimas yra pateiktas Pav. 6. Visi testuoti beždžionių serumai, tarp jų ir gyvūnų, imunizuotų gp160, turėjo aukštą antikūnų prieš sutrumpintą gp120 antigeną (gp120- γ) titrą.

5

Toliau pateikiamas aukščiau cituotų nuorodų sąrašas ir detalesnis jų aprašymas.

VALSTYBINIS PATYKIMŲ BIŪRAS

Išradimo apibrėžtis

5

1. Baltymo, kurio grynumas ir kokybė atitinka farmacinius reikalavimus, pasižyminčio ŽIV-1 apvalkalo (env) baltymo imuniniu aktyvumu, gamybos būdas, apimantis ekspresijos vektoriaus paruošimą, užkrėstų ekspresijos vektoriumi 10 ląstelių auginimą, jų ardymą ir baltymo gavimą iš lizato, pasižymintis tuo, kad jis susideda iš tokių stadijų:

(a) rekombinantinio įterpimo vektoriaus gaminimas įterpiant 15 bakuloviruso genomo dalį į klonavimo dalelę ir po to įterpiant ŽIV-1 env geną arba jo dalį į modifikuotą įterpimo vektorių taip, kad ŽIV-1 env arba jo dalis ekspresuojama kontroliuojant bakuloviruso promotoriui;

(b) taip modifikuoto ŽIV-1 env geno arba jo dalies 20 perkėlimas į bakuloviruso ekspresijos vektorių sumaišant rekombinantinį įterpimo vektorių su bakuloviruso DNR;

(c) tinkamų vabzdžių ląstelių transfekcija;

(d) rekombinantinio bakuloviruso ekspresijos vektoriaus, turinčio minėtą ŽIV-1 env geną arba jo dalį, išskyrimas;

25 (e) vabzdžių ląstelių arba vabzdžių užkrėtimas gautu rekombinantiniu bakuloviruso ekspresijos vektoriumi;

(f) gautų užkrėstų vabzdžių ląstelių arba vabzdžių auginimas siekiant ekspresuoti ir gaminti baltymą, pasižymintį ŽIV-1 apvalkalo (env) baltymo imuniniu aktyvumu;

30 (g) ląstelių surinkimas ir perplovimas;

(h) ląstelių ardymas;

(i) gauto lizato gryninimas lektinų afininės chromatografijos metodu, po to - gelfiltracijos metodu ir dialize;

35 (k) gauto švaraus baltymo, pasižyminčio ŽIV-1 apvalkalo (env) baltymo imuniniu aktyvumu, surinkimas.

2. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad bakulovirusas yra Autographa Californica branduolio poliedrozės virusas.
3. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad bakuloviruso
5 promotorius yra poliedrino geno promotorius.
4. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad vabzdžių ląstelės priklauso vabzdžių rūšiai Spodoptera frugiperda.
- 10 5. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad i rekombinantinio bakuloviruso ekspresijos vektoriaus sudėtyje įeina daugiau nei vienas ŽIV-1 env genas arba jo dalis.
6. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad ŽIV env genas yra
15 env gp160 genas arba jo dalis.
7. Būdas pagal p. 6, pasižymintis tuo, kad dalis env gp160 geno koduoja gp120.
- 20 8. Būdas pagal p. 6, pasižymintis tuo, kad dalis env gp160 geno koduoja gp41.
9. Būdas pagal p. 6, pasižymintis tuo, kad dalis env gp160 geno atitinka gp160 amino rūgštims padėtyse 1-757.
- 25 10. Būdas pagal p. 6, pasižymintis tuo, kad dalis env gp160 geno yra ta, kuri yra rekombinantinio bakuloviruso ekspresijos vektoriaus Ac3046 sudėtyje.
- 30 11. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad rekombinantinis bakuloviruso ekspresijos vektorius yra Ac3046.
12. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad minėtos ląstelės, turinčios tikslinį ŽIV-1 env baltymą stadijoje (g)
35 plaunamos buferio tirpale, kuriame yra 50 nM Tris buferio, pH 7.5 1 nM EDTA ir 1% Tritono X-100.

13. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad ląstelės stadijoje (h) ardomos ultragarsu 50nM Tris buferyje, pH nuo 8.0 iki 8.5, kuriame yra 4% deoksicholato ir 1% β -merkaptoetanolio.
- 5
14. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad gelfiltracija stadijoje (i) atliekama kolonoje su Sephacryl derva.
15. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad lektinų afininė chromatografija stadijoje (i) atliekama naudojant lęšių lektiną.
16. Būdas pagal p. 1, pasižymintis tuo, kad gaunamas švarus ŽIV-1 env baltymas yra po to aglomeruojamas arba surenkamas į daleles, kurių molekulinis svoris yra maždaug ≥ 2000000 (stadija 1).
17. Būdas pagal p. 16, pasižymintis tuo, kad baltymas yra smulkiai disperguotų dalelių pavidale.
- 20
18. Būdas pagal p. 16, pasižymintis tuo, kad dalelės yra sferinės formos, o jų skersmuo yra maždaug 30-100 nm.
19. Būdas pagal p. 16, pasižymintis tuo, kad baltymas jungiamas su alumu esant pH reikšmėms maždaug 7.0-7.2.
- 25
20. ŽIV-1 infekcijos gydymui skirta farmacinė kompozicija, turinti farmaciniu požiūriu tinkamą užpildą ir/arba adjuvantą ir dozės vieneto receptūrą, pasižyminti tuo, kad jos sudėtyje yra baltymas, pasižymintis ŽIV-1 env baltymo biologiniu aktyvumu, gautas pagal bet kurią iš p. 1-19 .
- 30
21. Vakcina, skirta ŽIV-1 infekcijos profilaktikai, turinti farmaciniu požiūriu tinkamą užpildą ir/arba adjuvantą ir dozės vieneto receptūrą, pasižyminti tuo, kad jos sudėtyje yra baltymas, pasižymintis ŽIV-1 env baltymo biologiniu aktyvumu, gautas pagal bet kurią iš p. 1-19.
- 35

22. Kompozicija pagal p. 20 arba 21, pasižyminti tuo, kad adjuvantas yra dalelių formos alumas.

5 23. Kompozicija pagal p. 20 arba 21, pasižyminti tuo, kad adjuvantas yra dalelių formos aliuminio fosfatas.

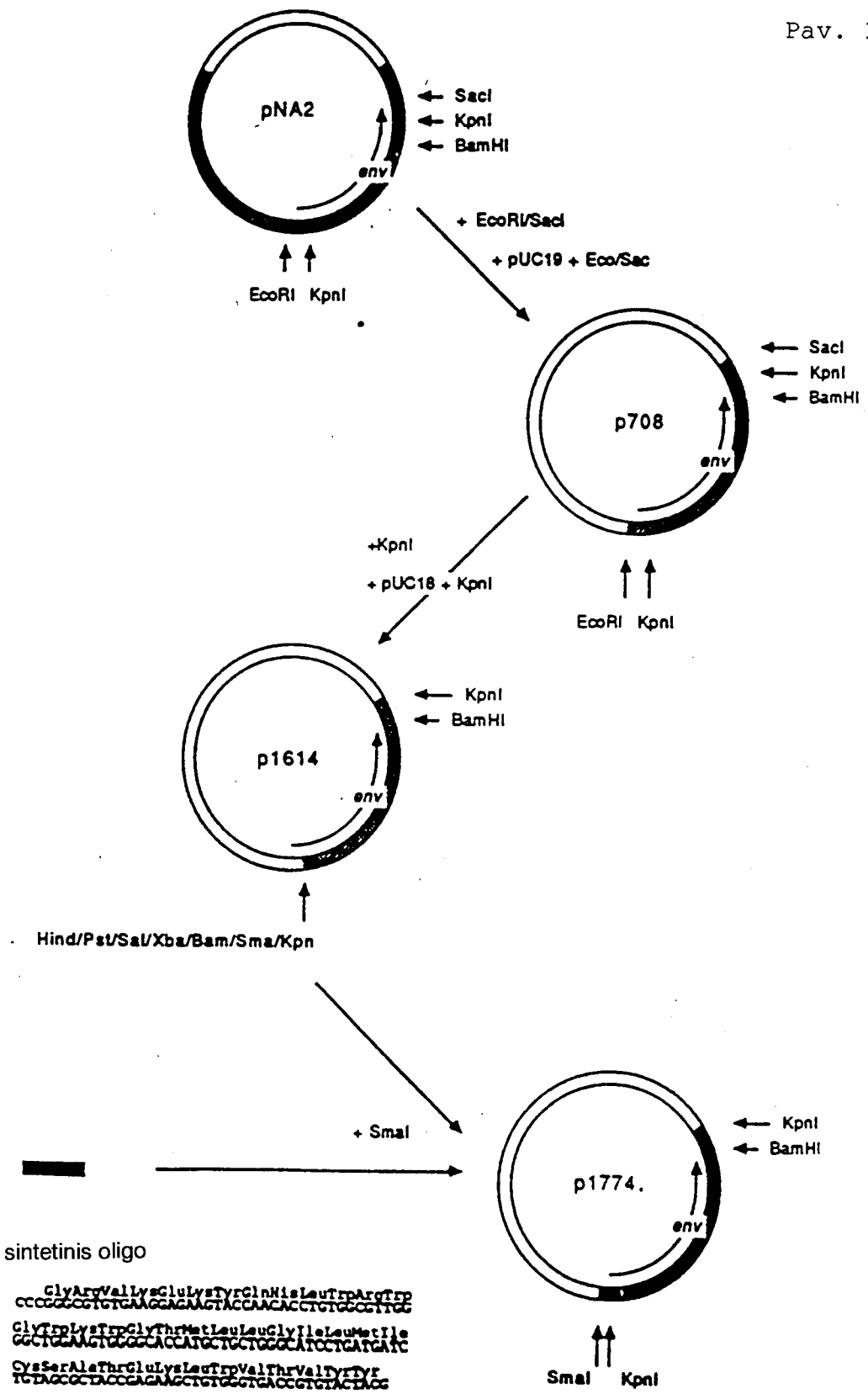
24. Kompozicija pagal p. 20 arba 21, pasižyminti tuo, kad adjuvantas yra dalelių formos aliuminio hidroksidas.

10

25. Kompozicija pagal p. 20 arba 21, pasižyminti tuo, kad baltymo koncentracija yra maždaug 40µg/ml.

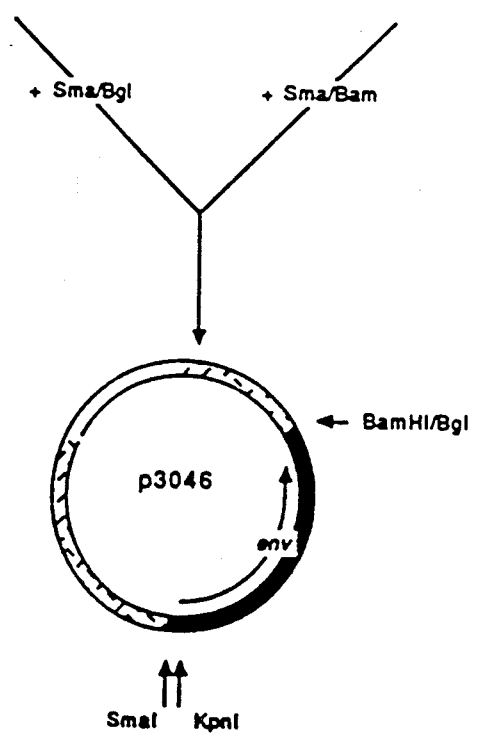
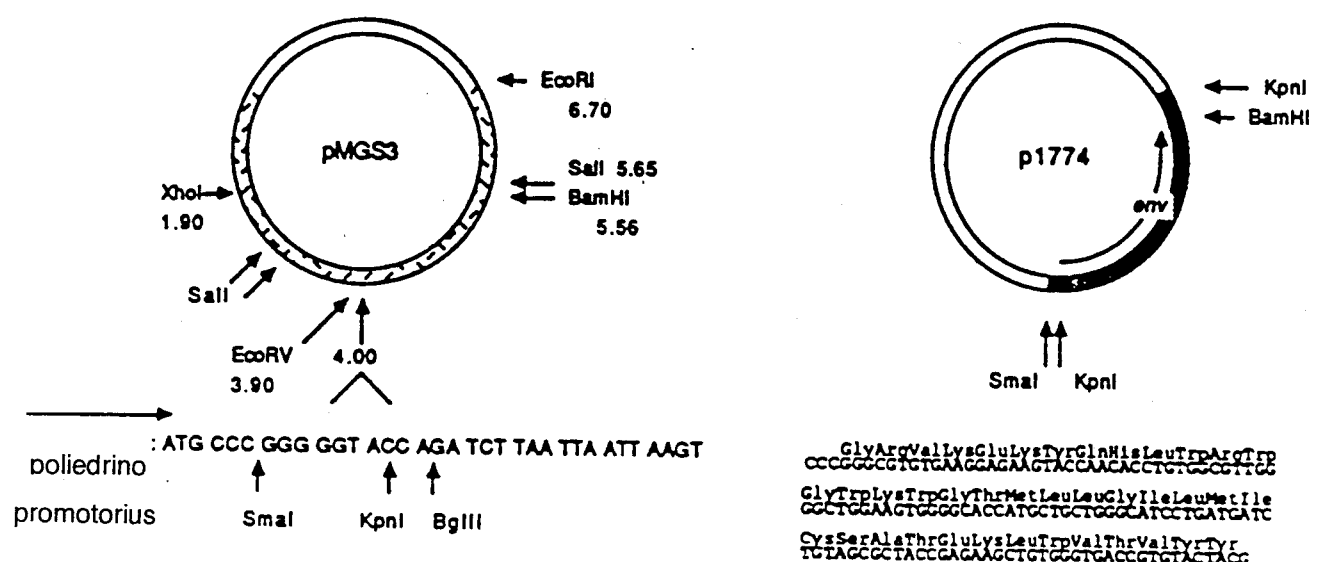
ŽIV-1 env GENO IŠSKYRIMAS IR INŽINERIJA

Pav. 1



REKOMBINANTINIO VEKTORIAUS p3046 KONSTRAVIMAS

Pav. 2



VALSTYBOS TYRUM

DNR, SUPANČIOS Ac3046 gp160 KODUOJANČIAS
SEKAS, NUKLEOTIDŲ SEKA

TGCTGATATC ATGGAGATAA TTTAAATGAT AACCATCTCG CAAATAAATA
-100

AGTATTTTAC TGTTTTTCGTA ACAGTTTTGT AATAAAAAA CCTATAATA
-50

ATG -----/3046/----->TAATTAATTAA GT ACC GAC TCT GGT GAA GAG
+1 +2253

GAG GAA ATT CTC CTT GAA GTT TCC CTG GTG TTC AAA GTA AAG GAG
+2287

TTT GCA CCA GAC GCA CCT CTG TTC ACT GGT CCG GCG TAT TAA
+2332 +2374

12

3046 ATVIRO SKAITIMO RĖMELIO NUKLEOTIDŲ SEKA IR
PROGNOZUOJAMA AMINO RŪGŠČIŲ SEKA

Su fermentais:

SS			
AHNNccSS	R	B	B N
vpccrrem	s	b	a l
aaiiFFca	a	v	n a
12111111	l	l	l 4
/////			

ATGCCCGGGCGTGTGAAGGAGAAGTACCAACACCTGTGGCGTTGGGGCTGGAAGTGGGGC
 1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 TACGGGCCCGCACACTTCCTCTTCATGGTTGTGGACACCGCAACCCCGACCTTCACCCCG
 a: MetProGlyArgValLysGluLysTyrGlnHisLeuTrpArgTrpGlyTrpLysTrpGly -

B	F B	SS	F				B
sF	Nn s	af	nP	HH	B	A	sM
po	lu t	ua	us	ha	b	l	ta
lk	a4 X	3N	4t	ae	v	u	Ee
21	3H 1	A1	H1	12	1	1	23
/		/					/

ACCATGCTGCTGGGCATCCTGATGATCTGCAGCGCTACCGAGAAGCTGTGGGTGACCGTG
 61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 TGGTACGACGACCCGTAGGACTACTAGACGTCGCGATGGCTCTTCGACACCCACTGGCAC
 a: ThrMetLeuLeuGlyIleLeuMetIleCysSerAlaThrGluLysLeuTrpValThrVal -

R H	B NRK		S	S
s p	a lsp		f	f
a h	n aan		a	a
l l	l 411		N	N
	/		l	l

TACTACGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTGCATCAGATGCT
 121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
 ATGATGCCCATGGACACACCTTCCTTCGTTGGTGGTGAGATAAAACACGTAGTCTACGA
 a: TyrTyrGlyValProValTrpLysGluAlaThrThrThrLeuPheCysAlaSerAspAla -

VALENTINUS

	T		S		N
N M	t R		a H		Ns R
d n	h s		u a		lp s
e l	3 a		9 e		aH a
1 1	2 1		6 3		31 1

AAAGCATATGATACAGAGGTACATAATGTTTGGGCCACACATGCCTGTGTACCCACAGAC
 181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
 TTTCGTATACTATGTCTCCATGTATTACAAACCCGGTGTGTACGGACACATGGGTGTCTG
 a: LysAlaTyrAspThrGluValHisAsnValTrpAlaThrHisAlaCysValProThrAsp -

			N
	M		A Ns
	a		f lp
	e		l aH
	3		3 31

CCCAACCCACAAGAAGTAGTATTGGTAAATGTGACAGAAAATTTAACATGTGGAAAAAT
 241 -----+-----+-----+-----+ 300
 GGGTTGGGTGTTCTTCATCATAACCATTTACTGTCTTTTAAAATTGTACACCTTTTTA
 a: ProAsnProGlnGluValValLeuValAsnValThrGluAsnPheAsnMetTrpLysAsn -

	S			S	
fN	M	N N		a	B
al	n	s l		u	i
Na	l	i a		3	n
13	1	l 3		A	l

GACATGGTAGAACAGATGCATGAGGATATAATCAGTTTATGGGATCAAAGCCTAAAGCCA
 301 -----+-----+-----+-----+ 360
 CTGTACCATCTTGCTACGTACTCCTATATTAGTCAAATACCCTAGTTTCGGATTTCCGGT
 a: AspMetValGluGlnMetHisGluAspIleIleSerLeuTrpAspGlnSerLeuLysPro -

			A	BH	
N		D	D	p sg	M
l		r	r	a pi	b
a		a	a	L 1A	o
3		3	l 1	21	2

TGTGTAATAATAACCCCACTCTGTGTTAGTTTAAAGTGCACTGATTTGAAGAATGATACT
 361 -----+-----+-----+-----+ 420
 ACACATTTTAAATGGGGTGAGACACAATCAAATTTACCGTGACTAACTTCTTACTATGA
 a: CysValLysLeuThrProLeuCysValSerLeuLysCysThrAspLeuLysAsnAspThr -

VALS... (Stamp)

RS	E		E	
sc	c	M	c	N
aa	o	a	o	l
11	5	e	5	a
/	7	3	7	3

1201 AGTACTGAAGGGTCAAATAACACTGAAGGAAGTGACACAATCACACTCCCATGCAGAATA
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 TCATGACTTCCCAGTTTATTGTGACTTCCTTCACTGTGTTAGTGTGAGGGTACGTCTTAT
 a: SerThrGluGlySerAsnAsnThrGluGlySerAspThrIleThrLeuProCysArgIle -

	N		
A	Ns		M
f	lp		n
1	aH		l
3	3l		l
/			

1261 AAACAATTTATAAACATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCTCCCATCAGT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1320
 TTTGTTAAATATTTGTACACCGTCCTTCATCCTTTTCGTTACATACGGGGAGGGTAGTCA
 a: LysGlnPheIleAsnMetTrpGlnGluValGlyLysAlaMetTyrAlaProProIleSer -

	F		
B	S	n	
b	s	u	
v	p	4	
l	l	H	

1321 GGACAAATTAGATGTTTCATCAATATTACTGGGCTGCTATTAACAAGAGATGGTGGTAAT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1380
 CCTGTTTAAATCTACAAGTAGTTTATAATGACCCGACGATAATTGTTCTCTACCACCATTA
 a: GlyGlnIleArgCysSerSerAsnIleThrGlyLeuLeuLeuThrArgAspGlyGlyAsn -

E	S	S	BS		
c	AMNa	BaX	M M scG	M	F
o	vblu	guh	n n trs	n	i
5	aoa9	13o	1 1 NFu	1	n
7	2246	2A2	1 1 111	1	l
	//	//	/		

1381 AACACAATGGGTCCGAGATCTTCAGACCTGGAGGAGGOGATATGAGGGACAATTGGAGA
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 TTGTTGTTAACCAGGCTCTAGAAGTCTGGACCTCCTCOGCTATACTCCCTGTTAACCTCT
 a: AsnAsnAsnGlySerGluIlePheArgProGlyGlyGlyAspMetArgAspAsnTrpArg -



Pav. 4g

SS
et
cy
11
/

1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 AGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCAOCCACCAAG
 TCACTTAATATATTTATATTTTCATCATTTTTAACTTGGTAATCCTCATCGTGGGTGGTTC
 a: SerGluLeuTyrLysTyrLysValValLysIleGluProLeuGlyValAlaProThrLys -

M	A	SS
b	l	et
o	u	cy
2	l	11

1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
 GCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTTCCTT
 CGTTTCTCTCTCACCACGTCTCTCTTTTTTCTCGTCACCCTTATCCTCGAAACAAGGAA
 a: AlaLysArgArgValValGlnArgGluLysArgAlaValGlyIleGlyAlaLeuPheLeu -

F	F		
n	BH	Hn	B
u	bg	hu	B
4	va	a4	b
H	11	1H	v
			1
			1 1

1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
 GGGTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAG
 CCCAAGAACCCTCGTCGTCTTTCGTGATACCCGCGTCGCAGTTACTGCGACTGCCATGTC
 a: GlyPheLeuGlyAlaAlaGlySerThrMetGlyAlaAlaSerMetThrLeuThrValGln -

HH	F	F		
aa	n	n	BM	B
ee	u	u	bn	b
13	4	4	vl	v
/	H	H	11	1

1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 GCCAGACAATTATTGTCTGATATAGTGCAGCAGCAGAACAATTGCTGAGGGCTATTGAG
 CGGTCTGTAAATAACAGACTATATCACGTCTGTCGTCTTGTAAACGACTCCCGATAACTC
 a: AlaArgGlnLeuLeuSerAspIleValGlnGlnGlnAsnAsnLeuLeuArgAlaIleGlu -

VALE

1953

	S		S	
B	aX	T	aX	B
i	uh	a	uh	i
n	3o	q	3o	n
l	A2	l	A2	l

AGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCTTAATTAATTA

2221 -----+-----+-----+----- 2264

TCTCTGTCTAGGTAAGCTAATCACTTGCCTAGATTAATTAATT

a: ArgAspArgSerIleArgLeuValAsnGlySerEndLeuIleLys-

Fermentai, kurie skaldo:

Af13	Alu1	Apa1	Ava1	Ava2	Ban1	Ebv1	Bgl2	Bln1	Bsm1	Bsp12
BstE2	BstN1	BstX1	Dde1	Dra1	Dra2	Dra3	Eco57	Fin1	Fnu4H	Fok1
Gsu1	Hae1	Hae2	Hae3	Hga1	HgiA1	Hha1	Hind3	Hinf1	Hpa2	Hph1
Kpn1	Mae1	Mae2	Mae3	Mbo2	Mme1	Mnl1	Mst2	Nci1	Nde1	Nhe1
Nla3	Nla4	Nsi1	NspB2	NspH1	PpuM1	Pst1	Pvu2	Rsa1	Sau3A	Sau96
Scal	ScrF1	Sec1	SfaN1	Sma1	Ssp1	Stu1	Sty1	Taq1	Tth32	Xho2

Fermentai, kurie neskaldo:

Aat2	Acc1	Afl2	Aha2	Apal	Asu2	Avr2	Ball	BamH1	Ban2	Ebv2
Bcl1	Bgl1	BspH1	BspM1	BspM2	BssH2	Cfr1	Cfr10	Clal	Dsal	Eco31
EcoB	EcoK	EcoR1	EcoRV	Esp1	Fsp1	Gdi2	HgiE2	Hinc2	Hpa1	Mlu1
Nae1	Nar1	Nco1	Not1	Nru1	PflM1	PmaC1	Pvu1	Rsr2	Sac1	Sac2
Sall	Sfil	SnaB1	Spe1	Sph1	Spl1	Tha1	Tth31	Xba1	Xho1	Xma3
Xmn1										

H
 i M
 n b
 f o
 l 2

1921 ATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTG
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1980
 TATGTGAGGAATTAACCTTCTTAGCGTTTTGGTCGTTCTTTTCTTACTTGTCTTAATAAC
 a: IleHisSerLeuIleGluGluSerGlnAsnGlnGlnGluLysAsnGluGlnGluLeuLeu -

1981 GAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAAACATAACAAATTGGCTGTGGTAT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2040
 a: CTTAATCTATTTACCCGTTCAAACACCTTAACCAAATTGTATTGTTAACCACACCATA
 GluLeuAspLysTrpAlaSerLeuTrpAsnTrpPheAsnIleThrAsnTrpLeuTrpTyr -

M R
 n s
 l a
 l l

2041 ATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTAAGAATAGTTTTTGTCTGTA
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2100
 a: TATTTAATAAGTATTACTATCATCCTCCGAACCATCCAAATTCTTATCAAAAACGACAT
 IleLysLeuPheIleMetIleValGlyGlyLeuValGlyLeuArgIleValPheAlaVal -

H
 P
 h
 l

2101 CTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTC
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2160
 a: GAAAGATATCACTTATCTCAATCCGTCCTATAAGTGGTAATAGCAAAGTCTGGGTGGAG
 LeuSerIleValAsnArgValArgGlnGlyTyrSerProLeuSerPheGlnThrHisLeu -

		PS	S		
M	AMS	ADFNNpa	aH		
n	vne	vrilluu	ua	M	M
l	alc	aanaaM9	9e	b	b
l	lll	2214416	63	o	o
	/	/////		2	2

2161 CCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGAC
 -----+-----+-----+-----+-----+ 2220
 a: GGTTAGGGCTCCCTGGGCTGTCCGGGCTTCTTATCTTCTTCCACCTCTCTCTCTG
 ProIleProArgGlyProAspArgProGluGlyIleGluGluGluGlyGlyGluArgAsp -

169

Pav. 4k

ATVIRO SKAITYMO RĖMELIO BAZIŲ SKAIČIUS: 2253

AMINO RŪGŠČIŲ KODONŲ SKAIČIUS: = 2253 ÷ 3 = 751

Amino rūgštis	Kiekis	Svoris	Viso
---------------	--------	--------	------

GLY -	53	75.1	3980.3
GLU -	41	147.1	6031.1
ASP -	25	133.1	3327.5
VAL -	48	117.1	5620.8
ALA -	37	89.1	3296.7
ARG -	39	174.1	6793.8
SER -	28	105.1	2942.8
LYS -	42	146.2	6140.4
ASN -	58	132.1	7661.8
MET -	17	149.2	2536.4
ILE -	57	131.2	7478.4
THR -	53	119.1	6312.3
TRP -	26	204.2	5309.2
CYS -	21	121.2	2545.2
TYR -	16	181.2	2899.2
LEU -	61	131.2	8003.2
PHE -	25	165.2	4130.0
SER -	26	105.1	2732.6
GLN -	38	146.2	5555.6
HIS -	11	155.2	1707.2
PRO -	29	115.1	3337.9

VISO:	751		98,342.4
Visas nustatytas neglikozilintų			- H ₂ O (751 x 18)
polipeptidų svoris			= 84,824.4

Viso glikozilinimo saitų	:	28	
			x 2100 (oligosacharido svoris)

Viso gpl60 molekulinis svoris			= 84,824.4 + 58800
-------------------------------	--	--	--------------------

= 143,624.

VAL. ... EURAS

390 Y Y Y
 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 Y
 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 GGC OCT CCC ATC AGC GGA CAA ATT AGA 7570
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||

450 Y Ser
 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
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 Thr Ser Y

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
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 Gly

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 <--- gp120 -----\ /-----> Transmembrane Region (gp 41) ----->
 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
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||

30
 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
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 Ala

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 7930
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 Asp

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
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 Ser Lys Gln

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 TTG TGG GGT TGC TCT GGA AAA CTC ATT TGC 8050
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||

Pav. 6

