

(11) Patent numeris: **4461** (51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/86**
C12N 15/62
(21) Paraiškos numeris: **97-201** **C07K 14/11**
A61K 39/145

(22) Paraiškos padavimo data: **1997 12 23**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1998 09 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1999 02 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US95/06750**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1995 05 26**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1997 12 23**

(72) Išradėjas:

Gale Eugene Smith, US
Franklin Volvovitz, US
Bethanie E. Wilkinson, US
Andrei I. Voznesensky, US
Craig Stanway Hackett, US

(73) Patent savininkas:

Protein Sciences Corporation,
100 Research Parkway, Meriden, CT 06450-7159, US

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metjda", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Gripo hemagliutinino multivalentinių vakcinų gamybos būdas

(57) Referatas:

Pateikiamas rekombinantinio gripo hemagliutinino baltymo gavimo būdas ekspresuojant šį baltymą vabzdžių ląstelėse ir tam tikslui panaudojant bakuloviruso ekspresijos sistemą.

Šiuo būdu gautas baltymas naudojamas multivalentinės gripo vakcinos gamybai, kurios pagrindą sudaro mišinys rekombinantinių hemagliutininų antigenų mišinys, gautų klonavimui panaudojus gripo virusus, pasižyminčius epideminiu potencialu. Rekombinantiniai hemagliutinino baltymai yra viso ilgio nesuskaidyti (HAO) glikoproteinai įskaitant abu HA1 ir HA2 subvienetus (HAO), kurie išvalomi nedenatūruojančiomis sąlygomis iki 95% ar didesnio, o geriausiai iki 99% grynumo.

Geriausiam išradimo įgyvendinime pateikiama, kokių būdu gripo hemagliutinino genai, paimti iš A ir B virusų, yra klonuojami panaudojant tam tikslui specialiai sukurtas oligonukleotidų sekas ir polimerazės grandininės reakcijos metodologiją.

Pateikiamas bendras būdas kaip ekstrahuoti ir išskirti rekombinantinį HA baltymą, pagamintą vabzdžių ląstelėse, aprašant rHA baltymų išskyrimą iš A potipių ir B tipo gripo virusų.

Šis išradimas priklauso rekombinantinių gripo vakcinų sričiai.

Išradimo prielaidos

Gripo epidemijos kyla kasmet ir yra viena iš svarbių žmonių sergamumo ir mirtingumo pasaulyje priežasčių. Dažniausiai suserga vaikai ir jie daugiausiai išplatina gripo virusą žmonių bendruomenėje. Vyresnio amžiaus ir ligoti žmonės daugiau rizikuoja, kad jiems gripo infekcija komplikuosis ir juos reikės hospitalizuoti. Vien tik Jungtinėse valstijose 1956 ir 1988 metų laikotarpyje kiekvieno iš septynių gripo sezonų metu užregistruota daugiau kaip 10,000 mirčių atvejų dėl pneumonijos ir gripo, ir daugiau kaip 40,000 mirčių atvejų užregistruota kiekvieno iš dviejų sezonų metu (Šiuolaikiniai Duomenys: Gripo Aktyvumas - Jungtinės Amerikos Valstijos ir Pasaulis, ir 1992-1993 metų Gripo Vakcinų Sudėtis, Morbidity and Mortality Weekly Report, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 41/No. 18: 315-323, 1992).

Gripo virusai yra labai pleomorfiškos dalelės, sudarytos iš dviejų paviršiaus glikoproteinų - hemagliutinino (HA) ir neuraminidazės (NA). HA sąlygoja viruso prikibimą prie šeimininko ląstelės ir viruso bei ląstelės apvalkalėlių susiliejimą virusui skverbiantis į ląstelės vidų. Gripo viruso genomą sudaro aštuoni vienasidūliai neigiamos prasmės RNR fragmentai, iš kurių keturi didžiausi segmentai koduoja HA geną. Gripo virusai, priklausomai nuo jų antigenų, skirstomi į A, B ir C tipo virusus. Gripo A virusai įvardijami naudojant nomenklatūrą, į kurią įeina potipis ar tipas, geografinė kilmė, kamieno numeris ir išskyrimo metai. Pavyzdžiui, A/Pekinas/353/89. Nustatyta mažiausiai 13 HA potipių (H1-H13) ir 9 NA potipiai (N1-N9). Visi šie potipiai aptinkami paukščiuose ir tik H1-H3 ir N1-N2 aptinkami pas žmogų, kiaules ir arklius (Murphy and Webster "Ortomiksovirusai", Virology, red. Fields, B.N., Knipe D.M., Chanock R.M., 1091-1152 (Raven Press, New York, (1990)).

Antikūnai HA neutralizuoja virusą ir sudaro natūralaus imuniteto gripo infekcijai pagrindą (Clements, "Gripo vakcinos", knygoje "Vakcinos: Imunologinių problemų nauji sprendimo būdai", red. Ronald W. Ellis, P. 129-150 (Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA 1992)). HA molekulės antigeninis variavimas sąlygoja dažnus gripo protrūkius ir ribotą infekcijos kontrolę imunizuojant.

Trimatė HA sandara ir jo sąveika su atitinkamu ląstelės receptoriumi, sialo rūgštimi, ištirta gerai (Wilson ir kt. "Gripo viruso apvalkalėlio glikoproteino hemagliutinino sandara 3 Å skiriamose geboje", Nature 289:366-378 (1981); Weis ir kt., "Gripo viruso hemagliutinino, sujungto su jo receptoriumi, sialo rūgštimi, sandara", Nature, 333:426-431 (1988); Murphy ir Webster, 1990). HA molekulė virione yra trimero forma. Kiekvienas monomeras sudarytas iš dviejų grandinių, HA1 ir HA2, sujungtų bisulfidine jungtimi. Infekuotos šeimininko ląstelės gamina 85,000 molekulinės masės glikozilintą polipeptidą kaip pirmtaką, kuris vėliau suskyla į HA1 ir HA2.

IgG ir IgA antikūnų, specifinių gripo HA, buvimas yra susijęs su organizmo atsparumu infekcijai ir ligai (Clements, 1992). Inaktyvuotos gripo vakcinos, sudarytos iš viso viruso ar dalinai išgrynintos (subvienetinės), standartizuojamos pagal kiekvieno kamieno HA kiekį. Paprastai gripo vakcinos turi nuo 7 iki 25 mikrogramų kiekvieno iš trijų gripo viruso kamienų HA.

Kito pagrindinio apvalkalėlio glikoproteino - NA vaidmuo apsauginiame gripo imunitete (humoraliniame ar T-ląstelių sąlygotame) kol kas neištirtas. Neuraminidazė yra labai neatspari gryninant ir saugojant (Murphy ir Webster, 1990), ir todėl NA kiekis dabartinėse gripo vakcinose nestandartizuojamas. Išgryninta HA, bet ne NA, vakcina apsaugo gyvūnus nuo gripo (Johansson ir kt., "Išgrynintas gripo viruso hemagliutininas ir neuraminidazė yra ekvivalentiškai stimuliuojant antikūnų atsaką, tačiau sukelia skirtingo pobūdžio imunitetą infekcijai", J. Virology, 63:1239-1246 (1989)). Tiriant žmones, nenustatyta, kad bandomoji vakcina, paruošta neuraminidazės pagrindu, gali apsaugoti (Orga ir kt., J. Infect. Dis. 135: 499-506 (1977)).

Licenzinės gripo vakcinos sudarytos iš formalinu inaktyvuotų ar chemiškai suskaidytų subvienetų, pagamintų iš dviejų gripo A potipių (H1N1 ir H3N2) ir vieno gripo B potipio virusų. Prieš kiekvieną gripo sezoną JAV Maisto ir Vaistų Administravimo (FDA) Vakcinų ir Giminingų Biologinių Medžiagų Patarėjų Komitetas rekomenduoja ateinančiam sezonui trivalentės gripo vakcinos sudėtį. 1992-93 metų vakcina savo sudėtyje turėjo A/Teksasas/36/91 (H1N1), A/Pekinas/353/89 (H3N2) ir B/Panama/45/90-panašius virusus.

FDA rekomendavo, kad 1993-94 metų gripo vakcina turėtų turėti tuos pačius Teksaso ir panamos kamienus ir naują gripo A Pekino kamieną (A/Pekinas/32/92).

Asmenų, priklausančių aukštos rizikos grupei, vakcinavimas kiekvienais metais prieš gripo sezoną yra efektyviausia priemonė, padedanti sumažinti gripo infekcijos poveikį. Dabartinių vakcinų trūkumai yra : mažas jų vartojimo lygis; mažas efektyvumas vyresnio ir jaunesnio amžiaus vaikams; jų gamyba kiaušiniuose; antigeninės variacijos ir pašalinės reakcijos.

Ligų Kontrolės Centras (LKC) nustatė, kad mažiau kaip 30% individų, priklausančių didelės rizikos susirgti gripu grupei, yra kasmet vakcinuojami (MMWR, 1992). Šiuolaikinės inaktyvuotos vakcinos sveikiems suaugusiems sąlygoja aukštą apsaugos prieš infekciją lygį tuo atveju, kai vakcinos antigenai yra giminingi cirkuliuojančių virusų antigenams. Tuo tarpu vyresnio amžiaus žmonėms, ypač ligotiems, apsauga prieš infekciją yra silpnesnė (Clements, 1992). Ankstyvesniuose tyrimuose, kuriuos atliko Powers ir Belshe, J. Inf. Dis. 167:584-592 (1993), žymus antikūnų atsakas į trivalentę gripo subvirionų vakciną stebėtas mažiau kaip 30% individų, kuriems buvo 65 ir daugiau metų.

A ir B gripo vakcinoms naudojami gamtiniai virusų kamienai, kurie dauginasi dideliais titrais viščiuko kiaušinio alantojinės alantojinėje erdmėje. Tuo tarpu kamienas, naudojamas gripo A komponentui gauti, priklauso perrūšiuotam virusui, turinčiam reikalingus paviršiaus antigenų genus. Perrūšiuotas virusas – tai toks virusas, kuris turi reikalingus paviršiaus antigenų genus. Perrūšiuotas virusas – tai toks virusas, kuris dėl virusinio genomo segmentacijos pasižymi kiekvieno tėvo kamieno

charakteristikomis. Kuomet ląstelę infekuoja daugiau negu vienas viruso kamienas, tuomet šie virusiniai segmentai susimaišo ir jų palikuonių virionai turi įvairių abiejų tėvų genų rinkinį.

Apsauga, gaunama panaudojant vakcinacijai šiuolaikines pilnas ar suskaidytas gripo vakcinas, yra trumpalaikė ir tampa neveiksminga, jeigu gripo epideminiuose kamienuose įvyksta antigeninis poslinkis (dreifas). Gripo virusams būdingas antigeninis poslinkis vyksta dėl imuninės selekcijos, atrenkančios virusus, kurių hemagliutinino molekulėje yra pakitusios aminorūgščių sekos. Idealiai, tai vakcinos kamienai turėtų atitikti ligą sukeliančius viruso kamienus. Tačiau šiuolaikinių gripo vakcinų gamybą riboja viruso auginimas viščiuko embriono kiaušiniuose. Ne visi viruso kamienai vienodai gerai dauginasi kiaušinyje. Tokie virusai turi būti adaptuoti arba turi būti sukurti perrūšiuoti virusai. Kiaušiniuose auginamų virusų hemagliutininas labai greitai heterogenizuojasi ir skiriasi nuo pirminio viruso, išskirto iš infekuotų individų ir augintų žinduolių ląstelėse, hemagliutinino (Wang ir kt., Viol. 171:275-279 (1989); Rajakumar ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4154-4158 (1990)). HA pokyčiai dėl selekcijos ir gripo vakcinų gamyba gali duoti antigeniškai skirtingų virusų subpopuliacijų mišinį. Todėl vakcinos virusai gali skirtis nuo epideminio kamieno variantų. To pasekoje apsaugos lygis gali būti suboptimalaus lygio.

Asmenims, kurie yra labai alergiški kiaušinio baltymui, dėl šio baltymo likučių vakcinoje gali išsivystyti ūmaus hiperjautrumo reakcijos. 1976 metais kiaulių gripo vakcina buvo susieta su Guillain-Barré sindromu. Kol kas nepastebėta, kad vėlesnės vakcinos, pagamintos iš kitų gripo kamienų, būtų iššaukusios šios retos ligos atvejų pagausėjimą.

Gripo vakcinos gamybos būdas, nereikalaujantis kiaušinių panaudojimo, galėtų pateikti grynesnį produktą, kuris nesukeltų pašalinių imuninių reakcijų. Be to, grynesnės vakcinos paruošimas nereikalautų viruso inaktyvacijos ar organinio virusinio apvalkalėlio komponentų ekstrahavimo, todėl būtų išvengta antigeninių epitopų denatūracijos bei chemikalų likučių vakcinoje.

Be to, gripo vakcina pagaminta nenaudojant viruso auginimo kiaušinyje padėtų išvengti genetinio heterogeniškumo, kuris pasitaiko

adaptacijos metu pasąžuojant ir auginant virusą kiaušinyje. Tai duotų tokia vakcina, kuri labiau atitiktų gripo epideminiam kamienams ir būtų efektingesnė.

Šio išradimo objektas yra gripo vakcinos gamybos būdo, nereikalaujančio viruso auginimo kiaušinyje, pateikimas.

Kitas šio išradimo objektas yra greito ir pigaus gripo vakcinos gamybos būdo, leidžiančio gauti labai gryną produktą iš pirminių gripo šaltinių, pateikimas.

Trumpas iliustracijų aprašymas

1 Fig. – tai HA genų, gautų iš gripo A kamienų išskirtos virusinės RNR, klonavimo, ekspresuoto rHA išskyrimo ir rHA biologinės charakteristikos schema.

Santrumpos: FDA - Maisto ir Vaistų Administravimas; MDCK - Madin Darby šunų inkstas; TPCK – toziflenilalanil chlorometilketonas; RNA ribonukleino rūgštis; cDNA – komplementari dezoksiribonukleino rūgštis; HA – hemagliutininas; FBS – fetalinis veršiuko serumas; PCR – polimerazės grandininė reakcija ir BV – bakulovirusas.

2 Fig. –metodo, paminėto 1 Fig. ir skirto gripo viruso kamieno A/Teksasas/36/91 HA geno klonavimui ir ekspresijai, detalesnė schema. Gripo HA genas gautas iš RNR, išskirtos iš MDCK ląstelių, užkrėstų gripo virusu A/Teksasas/36/91. Tam tikslui panaudota atvirkštinė transkriptazė ir universalus pradmuo (SEQ ID No. 1), atlikti du PCR amplifikacijos ciklai ir klonuota. Kaip parodyta schemeje, PCR pirmojo ciklo metu naudotas 5' galo pradmuo SEQ ID No. 2 ir 3' galo pradmuo SEQ ID No. 3. PCR antrojo ciklo metu naudotas 5' galo pradmuo SEQ ID No. 4 ir 3' galo pradmuo SEQ ID No. 5. Bakuloviruso rekombinacijos vektorius sudarytas iš polihedrino promotoriaus ir signalinio peptido sekų, gautų iš bakuloviruso 61K geno (bakuloviruso genas, koduojantis apie 61,000 molekulinės masės signalinį peptidą) bei sekų, koduojančių subrendusį HA baltymą. Šis rekombinacijos vektorius panaudotas bakuloviruso ekspresijos vektoriui, sąlygojančio šio kamieno viruso HA produkciją, konstravimui.

Fig. 4a, 4b ir 4c – grafikai, rodantys anti-HA imuninį atsaką pas peles, kurios buvo imunizuotos rHA arba licenzine 1994-1995 metų sudėties trivalentine vakcina, ašyse: savaitės po vakcinacijos ir H₁A titras. Fig. 4a – HA1 A/Teksasas/36/91; Fig. 4b – HA1 A/Šangdongas/9/93 ir Fig. 4c - HA1 B/Panama/45/90; rHA (daugiakampiai) ir FLUVIRON[®] patenuota vakcina, kultivuota kiaušiniuose (kvadratai).

Detalus išradimo aprašymas

Detaliai aprašomas rekombinantinės gripo vakcinos gavimo būdas. Gripo viruso viso ilgio nesuskaidytas (HA0) hemagliutinino antigenas gaunamas panaudojant bakuloviruso ekspresijos vektorius vabzdžių ląstelių kultūroje ir po to jis išskiriamas nedenatūruojančiose sąlygose. Gripo A ir/ar gripo B kamienų du ar daugiau išgrynintų hemagliutinino antigenų sumaišomi kartu tam, kad būtų gauta multivalentinė gripo vakcina. Tam, kad būtų padidintas efektyvumas, rekombinantinius antigenus galima sumaišyti su adjuvantiniais nešėjais.

Rekombinantinės DNR technologijos panaudojimas gripo vakcinų gamybai pasižymi keletu privalumų: rekombinantinė gripo vakcina gali būti pagaminta saugesnėmis ir labiau kontroliuojamomis sąlygomis; nereikia gripo viruso auginti kiaušiniuose; rekombinantinis HA baltymas gali būti labiau išgrynintas; išvengiama galimų pašalinių efektų dėl užteršimo kitais baltymais; išskiriant rekombinantinį HA, nereikia inaktyvuoti viruso ar organiniais tirpikliais ekstrahuoti virusinio apvalkalėlio komponentus, ir todėl išvengiama antigenų denatūracijos, o be to nėra pavojaus, kad vakcinoje lieka chemikalų; HA gamyba panaudojant rekombinantinę DNR technologiją, leidžia išvengti genetinio heterogeniškumo, kuris gali atsirasti viruso adaptacijos ir pasažavimo kiaušiniuose metu, o tai savo ruožtu sudaro prielaidas tam kad vakcinos kamienai labiau atitiks gripo epideminius kamienus ir tai savo ruožtu padidins vakcinos efektyvumą; rekombinantinis metodas leidžia geriau parinkti kamieną, suteikdamas laiko atrenkant vadovautis patikimesniais epidemiologiniais duomenimis.

Bakuloviruso ekspresijos sistema

Bakulovirusai – tai DNR virusai, priklausantys *Baculoviridae* šeimai. Žinoma, kad šie virusai turi siaurą šeiminių ratą, kuris apima tik vabzdžių Lepidopteran rūšis (drugelius ir kandis). Bakulovirusas *Autographa californica* branduolio polihedrozės virusas (Nuclear Polyhedrosis Virus) (AcNPV), kuris tapo bakulovirusų prototipu, sėkmingai dauginasi jautriose vabzdžių ląstelių kultūrose. AcNPV turi dvisiūlės

uždaros žiedinės DNR genomą, susidedantį iš apie 130,000 bazių porų ir jo priklausomybė šeimininkui, molekulinė biologija ir genetika yra gerai apibūdinta.

Daugelis bakulovirusų, įskaitant AcNPV, infekuotų ląstelių branduoliuose sudaro didelius baltymo kristalinius darinius - kūnelius. Šiuose kūneliuose beveik 95% visos baltymo masės sudaro vienaarūšis polipeptidas, vadinamas polihedrinu. Polihedrino genas AcNPV viruso genome egzistuoja vienos kopijos forma. Kadangi polihedrino genas nevaizina jokio vaidmens viruso replikacijoje užkrėstose ląstelėse, todėl jį galima modifikuoti svetimų genų ekspresijai. Svetimo geno seka įterpiama į AcNPV genomą 3' gale kaip tik prie polihedrino promotoriaus sekos tam, kad šis svetimas genas atsidurtų polihedrino promotoriaus transkripcijos kontrolėje.

Rekombinantiniai bakulovirusai, ekspresuojantys svetimus genus, yra sukonstruojami panaudojant homologinę rekombinaciją tarp bakuloviruso DNR ir chimerinių plazmidžių, turinčių norimo geno sekas. Rekombinantiniai virusai detektuojami pagal skirtingą poveikio zonos morfologiją bei homogeniškai išgryninus.

Bakulovirusai itin gerai tinka eukariotiniam klonavimui ir kaip ekspresijos vektoriai. Jie yra saugūs, kadangi jų šeimininkų ratas apsiriboja artropodais – nariuotakojais. JAV Aplinkos Apsaugos Agentūra (EPA) aprobavo trijų bakulovirusų naudojimą vabzdžių kenkėjų kontrolei. Pagal EPA Eksperimentinio Naudojimo leidimą AcNPV daugelį metų naudojamas derlingumui pakelti.

Laukinio tipo AcNPV bei rekombinantiniai virusai dauginasi įvairiose vabzdžių ląstelėse, įskaitant pastovias ląstelių linijas, kilusias iš *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *S. frugiperda* ląstelių populiacijos padvigubėjimo laikas yra nuo 18 iki 24 valandų. Jos gali būti auginamos kaip vienasluoksnės arba kaip suspensinės kultūros.

Rekombinantiniai HA baltymai gali būti produkuojami ląstelių kultūrose, kilusiose iš *S. frugiperda* (ir ne tik jose). Ląstelių kultūras, kilusias iš kitų rūšių vabzdžių, tokių kaip *Bombix mori*, *Galleria mellanoma*, *Trichoplusia ni*, arba *Lamantaria dispar*, taip pat galima panaudoti rekombinantinių HA baltymų gamybai.

Tinkamiausia šeimininko ląstelių linija rekombinantinio bakuloviruso baltymo produkcijai yra linija Sf900+. Kita tinkama šeimininko ląstelių linija rekombinantinio bakuloviruso baltymo produkcijai yra linija Sf9. Sf900+ ir Sf9 yra netrasformuotos, netumorogeninės pastovios ląstelių linijos, kilusios iš *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera); Noctuidae). Sf900+ ir Sf9 ląstelės auginamos $28 \pm 2^\circ$ C temperatūroje be anglies dvideginio priedo. Sf9 ląstelėms naudojama TNMFH terpė (paprastas mišinys druskų, vitaminų, angliavandenių ir aminorūgščių) su 10% fetalinio veršiuko serumo. Jokie kiti gyvūninės kilmės produktai (pvz., tripsinas ir pan.), išskyrus fetalinį veršiuko serumą, nenaudojami. Kultūros terpes be serumo (prieinamas kaip Sf900 kultūros terpė, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) galima taip pat naudoti Sf9 ląstelių auginimui, o taip pat ir Sf900 ląstelių.

Sf900 ląstelių populiacijos padvigubėjimo laikas yra 18-24 val. Jas galima auginti ir kaip vienasluoksnes, ir kaip suspensines kultūras. Nepaskelbta jokių duomenų, kad *S. frugiperda* ląstelėse gali replikuotis koks nors žinomas žinduolių virusas.

Specialistai supranta, kad ekspresijos vektoriumi gali būti panaudota ne tik bakuloviruso ekspresijos sistema. Rekombinantiniai HA baltymai gali būti ekspresuojami ir panaudojant kitus ekspresijos vektorius, tokius kaip Entomopox virusai (vabzdžių poksvirusai), citoplazminės polihedrozės virusai (CPV). Vabzdžių ląsteles galima galima transformuoti rekombinantiniu HA genu ar genais ir gauti pastovią ekspresiją.

Gripo viruso kamienų išskyrimas

Vienas ar daugiau gripo viruso kamienų išskiriami iš asmenų, segančių gripu. Tinkamiausi yra tie gripo viruso kamieniai, kuriuos nustatė FDA arba CDC ir apibūdino, kad jie turės epideminį potencialą sekančiam gripo sezonui. Čia aprašomo būdo privalumas yra tai, kad tiesioginiu viruso gavimo šaltiniu gali būti panaudota klinikinė medžiaga tokia, kaip ligonių, infekuotų gripo virusu, nosies išskyros.

Gripo viruso kamienų auginimas

Kamienai auginami ląstelėse, kurios gali produkuoti didelius viruso titrus, tokiose kaip Madin Darby šunų inkstų (MDCK) ląstelės (jas galima gauti iš Amerikietiškos Kultūrų Kolekcijos, numeris ATCC CCL34. MDCK ląstelės, pavyzdžiui, užkrečiamos į terpę pridėjus tozifnilalanil chlorometilketono (TPCK) ir dalinai inaktyvavus tripsiną bei pridėjus fetalinio veršiuko serumo tokia koncentracija, kuri yra optimaliausia didžiausių titrų pirmojo pasažo viruso produkcijai. MDCK ląstelės užkrečiamos gripo viruso kamienais mažiausia infekcijos dauginimosi doze (0.1 - 0.5), nustatoma pagal standartinį HA vertinimo būdą (Rosen, "Hemagliutinacija, sukeliamą gyvūnų virusų" knygoje "Virusologijos Pagrindiniai Metodai", red. K. Habel ir N.P. Salzman, p. 276-28 (Academic Press, New York 1969), kuris pateikiamas ir šiame išradimo aprašyme. Infekuotos ląstelės inkubuojamos prie 33⁰ C 48 valandas ir terpėje vertinama viruso produkcija panaudojant hemagliutinacijos aktyvumo testą. Tos auginimo sąlygos, kurių metu gautas didžiausias HA aktyvumas yra naudojamos ir ruošiant didelius gripo viruso kiekius.

Viruso išskyrimas

Virusinės dalelės, produkuotos pirmojo pasažo metu, išskiriamos iš terpės panaudojant žinomą išskyrimo būdą - centrifūgavimą sacharozės gradientu. Pavyzdžiui, virusas, praėjus 24-48 val. po infekcijos, surenkamas centrifūguojant gripo virusu infekuotų MDCK ląstelių terpę. Virusinės nuosėdos resuspenduojamos buferyje ir centrifūguojamos užbuferintame sacharozės gradientu. Gripo virusai, esantys gradiento 40-45% sacharozės zonoje, surenkami, atskiedžiami buferiu ir centrifūguojami 100,000 x g. Išskirto viruso nuosėdos resuspenduojamos buferyje ir saugojamos -70⁰ C temperatūroje.

Gripo viruso hemagliutinino genų klonavimas

HA genų klonavimo, panaudojant šį metodą, schema pateikiama Fig. 1. Ląstelės užkrečiamos tuo gripo viruso kamieniu, kurį norima klonuoti. Virusas išskiriamas iš ląstelių kultūros terpės ir po to, jeigu tai yra gripo viruso A kamienai, išskiriama virusinė RNR, o , jeigu tai yra B

kamienai, išskiriama mRNR. Virusinė RNR (- RNR) ekstrahuojama iš išgrynintų virionų ir tiriama formaldehido agarozės geliuose standartiniu metodu. cDNR sintezuojama naudojant arba universalią pradmenų sistemą, skirtą gripo viruso A kamienų virusinei RNR, arba naudojant atsitiktinius pradmenis, skirtus gripo viruso B kamienų mRNR. Plius-standartinė komplimentari DNR (cDNR) sintezuojama panaudojant universalų oligonukleotidų pradmenį (5' -AGCAAAAGCAGG-3' (SEQ ID No. 1), kuris yra homologiškas A ir B gripo virusų visų hemagliutinino RNR segmentams (Davis ir kt. " Bakterinio klonu, turinčio gripo viruso WSN kamieno (HON1) hemagliutinino geną, konstravimas ir apibūdinimas ", gene, 10: 205-218 (1980). Sukuriami pradmenys, kurie yra homologiški gripo viruso hemagliutinino geno 5' ir 3' galų konservatyviesiems rajonams. Tiek 5', tiek 3' galo pradmenys turi galuose vietas restrikcijos fermentams, kurių nėra hemagliutinino gene.

Atitinkami gripo viruso A arba B pradmenys yra sumaišomi su gripo viruso cDNR ir, naudojant standartinį PCR būdą, atliekama hemagliutinino geno segmentų amplifikacija. Reakcijos metu gauti dvisiūlės DNR segmentai turi subrendusį hemagliutininą koduojančias sekas. Polimerazės grandininė reakcija (PCR) yra naudojama viso HA geno amplifikacijai. Po to genas klonuojamas panaudojant tinkamą bakteriją - šeimininką tokį, kaip *E. coli*. 5' galai sekvenuojami tam, kad būtų identifikuotas HA genų signalinis peptidas. Tada vėl panaudojamas PCR būdas tam, kad būtų amplifikuoti HA genai, bet jau be signalinio peptido. Gautas produktas subklonuojamas plazmidiniame pernešimo vektoriuje, kuris turi AcNPV polihedrino promotorių. Tuomet pernešimo vektoriai turi tokias 5' - >3' sekas: *A. californica* NPV bakuloviruso polihedrino promotorius, ATG translacijos startinis kodonas, 61K bakuloviruso signalinis peptidas, sekos, koduojančios subrendusį hemagliutininą, natūralus hemagliutinino translacijos terminacijos kodonas, polihedrino RNR poliadenilavimo signalas ir aprėminanti bakuloviruso DNR.

Išskirta chimerinė pernešanti plazmidinė DNR, turinti klonuotą hemagliutinino geną, sumaišoma su AcNPV laukinio tipo DNR, išsodinama precipituojant su kalciu ir transfekuojama į *S. frugiperda* ląsteles. Rekombinantiniai bakulovirusai atrenkami, remiantis poveikio

zonų morfologijos skirtumais, ir toliau yra atrenkami naudojant papildomą selekciją. Klonuoti rekombinantiniai virusai patikrinami, kaip jie ekspresuoja hemagliutininą, atrenkamas vienintelis bakuloviruso ekspresijos vektorius, kuris panaudojamas Pagrindinio Virusų Banko sukūrimui.

Gripo viruso A kamienai :

Gripo viruso A kamienų HA genai klonuojami panaudojant išskirtus virusinės RNR preparatus. Virusinė RNR ekstrahuojama paėmus 100-200 mikrolitrų išvalytų gripo A virionų, turinčių 1,000-2,000 hemagliutinacijos vienetų (HAU). Vienas HAU - tai viruso kiekis, kuris agliutinuos 50% raudonųjų kraujo kūnelių, vertinant standartiniu agliutinacijos metodu (Rosen, 1969). Virionai paveikiami proteinaze K, kuri suskaido baltymą, tuomet virusinė RNR yra ekstrahuojama fenolu/chloroformu lygiomis dalimis ir nusodinama etanoliu panaudojant tRNR nešėją. Virusinė RNR resuspenduojama buferyje ir paveikiama DNR-aze, neturinčia RNR-azės, tam, kad būtų pašalinta bet kokia DNR priemaiša, po to ekstrakcija ir precipitacija yra pakartojamos. Virusinė RNR (vRNR) tiriama formaldehido agarozės geliuose pagal metodą, aprašytą Maniatis ir kt. Molekulinis klonavimas: Laboratorinis vadovas. P. 86-96 ir 366-367 (Cold Spring Harbor lab., Cold Spring, N.Y. 1982).

Gripo viruso B kamienai :

Gripo virusų B kamienų HA genai klonuojami panaudojant visuminę (totalinę) mesendžerinę RNR (mRNR), išskirtą iš ląstelių, užkrėstų gripo viruso B kamieniu. Visuminė RNR ekstrahuojama iš infekuotų ląstelių. Užaugintos ląstelės lizuojamos panaudojant guanidium tiocianatą ir visuminė RNR yra išvaloma, panaudojant, pavyzdžiui, RNR Ekstrahavimo Rinkinį, pagamintą Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, NJ). Totalinė mRNR išskiriama iš ląstelinės RNR panaudojant Oligo-(dt)-celiuliozės

pluošto kolonėles, panaudojant, pavyzdžiui, mRNR išskyrimo Rinkinį, pagamintą Pharmacia Biotech Inc.

Rekombinantinio hemagliutinino ekspresija ir brendimas vabzdžių ląstelėse

Rekombinantinio hemagliutinino antigenai ekspresuojami dideliais kiekiais *S. frugiperda* ląstelėse, infekuotose AcNPV-hemagliutinino vektoriais. Pirminis geno produktas yra nesubrendęs pilno ilgio hemagliutininas (rHA0) ir jis iš ląstelės nėra sekretuojamas, o lieka susijungęs su infekuotos ląstelės periferinėmis membranomis. Šis rekombinantinis HA0 yra 68,000 molekulinės masės baltymas, kurį glikozilina prie N-galo prisijungę manozės tipo glikanai, besiskiriantys nuo glikanų, produkuojamų virusinių baltymų ekspresijos žinduolių ar paukščių ląstelėse metu. Įrodyta, kad rHA0 sudaro posttransliacinius trimerus, kurie kaupiasi citoplazminėse membranose.

HA0 ir kitų baltymų ekspresijos vektoriai

HA0 labiau tinka vakcinai, kadangi jis yra žymiai stabilesnis, palyginus su HA1/HA2 kompleksu, ir jo sankloda nepakinta valant ar saugojant. Stabilumo privalumai ypač išryškėja dirbant su B kamienais, jų titrai yra penkis kartus didesni palyginus su komerciniais atenuotais B kamienais.

Kaip aprašyta žemiau pateiktuose pavyzdžiuose, kuomet HA genai buvo klonuoti pMGS12 per restrikcijos saitus, HA subrendęs signalinis peptidas buvo pašalintas ir pakeistas bakuloviruso chitinazės signaliniu peptidu, nurodomu kaip 61 kD signalinis peptidas. Kadangi HA genas yra sujungtas su chitinazės signaliniu peptidu per skaidymo vietą, tai, priklausomai nuo pasirinkto restrikcijos saito, tarp subrendusio HA0 baltymo ir 61 kD signalinio peptido yra trys - penkios aminorūgštys. Su gripo viruso A kamienais šiuo požiūriu nėra problemų, tačiau B kamienų HA0, ekspresuotas su papildomomis aminorūgštimis, klostosi ne taip kaip įprasta.

Sugalvoti du būdai šiai problemai išspręsti. Pirmas būdas - panaudoti naują vektorių, pMGS3, kuris nekoduoja 61 kD signalinio

peptido. HA0 su savo įprastu signaliniu peptidu yra klonuojamas vektoriuje ir ekspresuojamas. SDS-PAGE analizė rodo, kad B kamienų HA0, ekspresuotas šiame vektoriuje, pasižymi geresniu glikoziliniu ir brendimu negu tuomet, kai yra ekspresuotas pMGS12. HA0 susiklosto taip gerai, kad gali būti kiekybiškai konvertuotas į HA1/HA2. Tačiau, deja, kaip parodė tyrimai Western blotingo būdu, baltymo išeiga nėra didelė. Antras būdas - padidinti išeią panaudojant 61 kD signalinį peptidą pMGS12 nukreipiant ekspresiją, tuo atveju, kai HA0 genas įterptas nepanaudojant restrikcijos fermentų. Naujas vektorius, turintis 61 kD signalinį peptidą ir HA0 geną, bet neturintis sekų, koduojančių įsiterpiančias aminorūgštis, yra nurodomas kaip pMGS27.

pMGS27 gali būti panaudotas bet kokio geno klonavimui ir ekspresijai bakuloviruso ekspresijos sistemoje. Genas - taikiny, vietoje to, kad būtų klonuotas vektoriuje, panaudojant restrikciją ir ligavimą, yra klonuojamas į vektorių anylingo būdu. Reikalingi reagentai gaunami iš Clontech panaudojant jų PCR-sąlygotą Klonavimo Sistemą. pMGS27 konstruojamas tokiu būdu, kad jis galėtų būti linearizuotas chitinazės signalinį peptidą koduojančio rajono gale. Prie linijinės pMGS27 fago T4 DNR pridėjus dATP ir veikiant polimeraze, gaunamos dvi ilgos vienasidės uodegėlės.

Genas - taikiny amplifikuojamas panaudojant polimerazės grandininę reakciją (PGR) arba atvirkštinės transkriptazės-PGR (RT-PGR), naudojant porą oligonukleotidų, tinkamų sukūrimui vienasidžių uodegėlių, kurios yra komplementarios uodegėlėms paveiktos pMGS27, kuri buvo gauta PGR fragmentą veikiant T4 DNR polimeraze ir dTTP. Paprastu anylingu galima sujungti dvi molekules į žiedinę plazmidę, kuri galės transformuoti ląstelę šeimininkę. Be to, kad šis būdas yra greitesnis ir paprastesnis negu tradicinis restrikcijos-ligavimo metodas, naudojamas klonuojant HA geną pMGS12, ši pMGS27 pasižymi tokiu svarbiu privalumu, kad ji neduoda papildomų aminorūgščių, koduojamų restrikcijos saitų, sukurtų tarp chitinazės signalinio peptido ir subrendusio HA baltymo. Šios papildomos aminorūgštys kartais sukelia sunkumų, kuomet signalinė peptidazė negali skaidyti signalinio peptido arba kai

baltymas susiklosto neteisingai, kaip tai atsitinka, pavyzdžiui, kamieno B HA atveju.

Rekombinantinio HA išskyrimas

Praėjus keletai dienų po užkrėtimo, rHA0 galima selektyviai ekstrahuoti iš AcNPV-hemagliutininu infekuotų ląstelių periferinių membranų, panaudojant nedenatūruojantį nejoninį detergentą ar kitus būdus, kurie naudojami rekombinantinių baltymų išskyrimui iš vabzdžių ląstelių, įskaitant tame tarpe ir gelio chromatografiją bei jungimą prie antikūnų. Detergente tirpale esantį rHA0 galima toliau išskirti DEAE jonų kaitos būdu ir panaudojant lęšių lektinoafininę chromatografiją, arba kitus ekvivalentinius žinomus metodus.

Variante, kuriam skiriama pirmenybė, rHA0 išskiriamas naudojant būdą, kuris yra švelnesnis ir leidžia gauti didesnę gripo viruso B kamienų rHA0 kiekį. Darbo eiga atrodo sekančiai:

HA0 baltymas, sudarantis vabzdžių ląstelių membranų integralinę dalį, išskiriamas iš tirpių baltymų, periferinės membranos baltymų, daugumos DNR ir RNR, gauto ekstrahavus ląsteles santykinai klampiam šarminiame tirpale, kurio pH yra tarp 9.5 ir 10.5. Klampumas didinamas pridėdant sacharozės iki 250 mM koncentracijos. Pridedama disulfidinės jungtys redukuojančio agento, pavyzdžiui, β -merkaptoetanolio, tokia koncentracija, kuri padėtų išvengti disulfidinių jungčių tarp baltymų, esančių mišinyje, susidarymo. Ląstelė suspenduojamos ekstrakcijos buferyje, homogenizuojamos ir po to centrifuguojamos. Nuosėdos plaunamos homogenizuojant mažos joninės jėgos buferyje, kuriame pridėta disulfidus redukuojančio agento šarminiame pH (laidumas mažiau negu 1 mS, pH 10.5) ir po to nuosėdos centrifuguojamos. HA0 ekstrahuojamas iš nuosėdų buferyje, kuriame yra nuo 0.3 iki 1.5 % detergento tokio, kaip Tritonas, dezagreguojančio agento tokiame kiekyje, kuris neleidžia susidaryti kompleksams dėl jų elektrinių krūvių sąveikos, tokio kaip nuo 0.3 iki 1.0 M betaino ar paurino, šarminiame pH (geriausiai 9.5). HA0 iš supernatanto išskiriamas anijonų kaitos chromatografijos būdu, po to panaudojant katijonų kaitos chromatografiją. HA0 kraunamas į anijonų kaitos kolonėlę, pavyzdžiui, DEAE ar Q-sefarozė® (agarozės

rutuliukų kolonėlė suketvirtinėmis amino grupėmis), tame pačiame buferyje, kuris naudotas ekstrahavimui, tačiau atskiestame mažiausiai 1:2 papildomu buferiu, ekvilibruojant kolonėlę buferiu, kuriame yra apie 1/10 dalį detegento ir disulfidus-redukuojančio agento. Po to HA0 eliuojamas mažinant pH iki 8.5. Eliuotas HA0 kraunamas į katijonų kaitos kolonėlę tame pačiame buferyje. Kontaminantai pašalinami eliuojant mažinant pH iki maždaug 7.4, po to, padidinus druskos koncentraciją iki 0.15 M NaCl, eliuojamas HA0.

Šis išskyrimo būdas, kuriam skiriama pirmenybė, aprašoma toliau smulkiai:

Membranų frakcijos, savo sudėtyje turinčios rekombinantinį HA, išskyrimas. Ląstelės, ekspresuojančios rekombinantinį HA, (6,2 g ląstelių iš 0,34 L kultūros) suspenduojamos iki 100 mg/mL koncentracijos ledo vonioje atšaldytame tirpale, kuriame yra 100 mM natrio pirofosfato, 100 mM natrio chlorido, 250 mM sacharozės, 0.1% β-merkaptetanolio, pH 10,5. Ląstelės suardomos panaudojant panaudojant Polytron® homogenizatorių (Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY), 4 ciklai po 2 min. Homogenizacinė terpė yra šarminio pH, kadangi siekiama padidinti pašalinių baltymų tirpumą ir membranų preparatų grynumą. Homogenatas centrifuguojamas 30 min. 9,200 g. Supernatantas pašalinamas ir nuosėdos surenkamos. Po to membraninė frakcija plaunama mažos joninės jėgos tirpalu. Nuosėdos resuspenduojamos iki pradinio tūrio ledo vonioje atšaldytame tirpale, kurio sudėtyje yra 0.1% β-merkaptetanolio, pH 10.5, ir homogenizuojamos panaudojant Polytron® homogenizatorių, 4 ciklai po 2 min. Homogenatas centrifuguojamas 30 min, 9,200 g. Supernatantas pašalinamas ir nuosėdos surenkamos. Plaunant mažos joninės jėgos tirpalu, pašalinami papildomi periferinių membranų baltymai. Membranų frakcijos paruošimas suteikia galimybę gauti didesnį rekombinantinio HA kiekį bei pašalinti nukleino rūgštis.

Rekombinantinio HA ekstrahavimas. Po to rekombinantinis HA selektyviai ekstrahuojamas iš membraninių nuosėdų naudojant sąlygas, kuriose nedenatūruojamas antigenas. Membraninės nuosėdos

homogenizuojamos 41 mL ledo vonioje atšaldyto tirpalo, kurio sudėtyje yra 10 mM etanolamino pH 9.5, 1% Tritono N101, 0.1% β -merkptoetanolio, 25 mM NaCl, 400 mM betaino, homogenizuojama 4 ciklais po 2 min. Po inkubuojama 40 min 23°, mišinys centrifuguojamas 30 min. 9,200 g. Supernatantas su rekombinantiniu HA filtruojamas ir atskiedžiamas per pusę tuo pačiu buferiu.

Baltymai tiriami SDS poliakrilamido gelio elektroforezės būdu. Bandiniai, pridėjus 2% natrio dodecilsulfato (SDS) ir 5% β -merkptoetanolio, kaitinami verdančio vandens vonioje 10 min, po to atliekama elektroforezė 11% poliakrilamido gelyje, kurio sudėtyje yra 0.1% SDS, po to dažoma Coomassie mėliu.

Chromatografinis išskyrimas. Rekombinantinio HA chromatografinis išskyrimas buvo supaprastintas ir apsieita be brangios afininės chromatografijos, naudojamos Lęsinio Lektino Sefarozę, pakeičiant ją dvižingsniu chromatografinio išskyrimo procesu, leidžiančiu gauti labai išgrynintą rekombinantinį HA antigeną, kuris yra nedenatūruotas ir tinkamas kaip komponentas gripo viruso vakcinai, skirtai žmonėms. Naudojamos Pharmacia Q-Sepharose® Fast Flow ir CM-Sepharose Fast Flow® chromatografijos gelio matricos.

Anijonų-kaitos chromatografija. Visos chromatografijos atliekamos kambario temperatūroje. Rekombinantinio HA ekstraktas, gautas kaip nurodyta aukščiau, 1 mL tūryje pakraunamas į kolonėlę su Pharmacia Q-Sepharose Fast Flow® (5 mL C10/C10 Pharmacia kolonėlė), išlyginama su 10 mM etanolaminu pH 9.5, 0.1% Tritonu® N101, 0.01% β -merkptoetanoliumi, 25 mM NaCl, 400 mM betainu. Po to kolonėlė plaunama ekvilibravimo buferiu tol, kol efluento UV absorbcija grįžta prie pagrindinės linijos. Šiomis sąlygomis rekombinantinis HA prisiriša prie kolonėlės, kai tuo tarpu pašalinės medžiagos išplaunamos. Po to dalinai išvalytas rekombinantinis HA eliuojamas 30 mM dietanolaminu pH 8.5, 0.1% Tritonu N101®, 0.01% β -merkptoetanoliumi, 25 mM NaCl, 400 mM betainu.

Katijonų-kaitos chromatografija. Q-Sefarozės eliuatas (23 mL) skiedžiamas du kartus 30 mM dietanolaminu pH 8.5, 0.1% Tritonu N101®, 0.01% β-merkaptioetanoliu, 25 mM NaCl, 400 mM betainu. Kolonėlė po to praplaunama 35 mL 10 mM natrio fosfato pH 7.4, 0.1% Tritonu N101®, 0.01% β-merkaptioetanoliu, 25 mM NaCl, 400 mM betainu. Plovimas pašalina pašalines medžiagas iš kolonėlės, kai tuo tarpu rekombinantinis HA lieka prisijungęs prie CM Sefarozės. Po to detergentas pašalinamas praplaunant kolonėlę 10 mM natrio fosfatu pH 7.4, 10 mM NaCl, kol efluento UV absorbcija grįžta prie pagrindinės linijos. Išvalytas rekombinantinis HA eliuojamas fosfatinio buferiniu druskos tirpalu, pH 7.5 (PBS).

Išvalytas rHA0 resuspenduojamas izotoniniame buferiniame tirpale. Nuo detergento išvalytas rHA0 efektyviai agliutinaoja eritrocitus.

Rekombinantinio HA0 struktūriniai ir biologiniai ypatumai

rHA0 išvalomas iki mažiausiai 95% grynumo, o geriausiai iki 99% grynumo. SDS-poliakrilamido gelyje jis keliauja kaip vienas pagrindinis 68,000 molekulinės masės polipeptidas. Išskirto rekombinantinio HA0 ketvirtinė struktūra ištirta elektroniniu mikroskopu, nustatytas rezistentiškumas tripsinui, atlikta sedimentacijos gradientė analizė, nustatytas sugebėjimas agliutinuoti eritrocitus. Tyrimų duomenys rodo, kad rekombinantinis HA0 sudaro trimerus, kurie susirenka į rozetes.

Išskirtas rHA0 neagliutinaoja ląstelių tol, kol nepašalinamas detergentas, todėl spėjama, kad tam, kad jis galėtų suklijuoti viščiuko eritrocitus, antigenas turi sudaryti kompleksus (rozetes). Išskirto rHA0 kiekybinis sugebėjimas agliutinuoti ląsteles naudojamas antigeno buvimo įvertinimui. Vienas hemagliutinino vienetas apibrėžiamas kaip antigeno kiekis, reikalingas 50% agliutinacijai pasiekti standartiniame hemagliutinacijos teste su viščiukų eritrocitais. Palyginamieji duomenys rodo, kad išskirti rHA0 antigenai agliutinaoja eritrocitus panašiu efektyvumu kaip ir gripo virionai.

Rekombinantinis HA0 gali būti suskaidytas ties disulfidine jungtimi, tai sukelia konformacinius pokyčius, pasireiškiančius dviejų grandinių HA1 ir HA2 atsiradimu, kuris buvo aprašytas Carr C.M. ir Kim P.S. "Gripo

viruso hemagliutinino konformacinio pokyčio mechanizmas", *Cell*, 73: 823-832 (1993) (nuoroda įtraukta). Rekombinantinio HA0 skaidymas aprašytas detaliau žemiau pateikiamame 6 pavyzdyje. Tikimasi, kad suskaidžius natūralų HA0 į HA1 ir HA2, grandinės tampa infekcinėmis, įgyja sugebėjimą įsilieti į ląstelę, tuo būdu sukeldamos geresnį imuninį atsaką. Tokių antigenų, kaip gripo viruso hemagliutininas, paruošimas (procesingas) vyksta prisijungiant antigeniniams peptidams prie pagrindinio audinių suderinamumo komplekso (MHC) molekulių. Antigeno/MHC kompleksą atpažįsta T ląstelės ir inicijuojamas imuninis atsakas taip, kaip tai aprašyta Harding ir Heuze apžvalgoje, *Current Opinion in Cell Biology* 5: 596-605 (1993), kurios taip pat įjungtos į literatūros sąrašą. rHA0, produkuojamas bakuloviruse, tačiau yra labai stabilus ir imunogeniškas kaip intaktinė molekulė. Palyginus ekspresuoto vabzdžių ląstelėse HA0 angliavandenių molekules, rasta, kad glikanai skiriasi nuo tų, kurie yra pas HA0, kuriuos ekspresuoja žinduolių ar paukščių ląstelės.

Sulieti baltymų gamyba

Sulieti baltymai, susidedantys iš HA0, sulieto su antru antigeniniu baltymu, gali būti ruošiami tais atvejais, kuomet antrojo baltymo antigeniškumas yra mažas arba yra privalumai sukeliant imuninį atsaką į daugelį antigenų. Antrojo antigeno, kuriam teikiama pirmenybė, pavyzdžiu yra gripo viruso produkujama neuraminidazė. Antigeną gali sudaryti ląstelinis, virusinis ar bakterinis baltymas arba antigeno dalis, turinti nors nuo penkių iki aštuonių aminorūgščių. Kiti antigenai gali būti sudaryti iš hepatito B viruso, ŽIV antigenų ar karcinoembrioninio antigeno. Šiuo atveju kaip "imuninis atsakas" bus vertinamas arba humoralinis atsakas pagal antikūnų antigenui produkciją, arba ląstelinis atsakas pagal T ląstelių sąlygotą atsaką į antigeną. Kai kuriais atvejais neantigeninių aminorūgščių "sąsaja" gali būti įterpta tarp HA ir antigeno tam, kad būtų padidintas antigeno antigeniškumas palyginus pastarąjį su HA. Darbo eiga susideda iš DNR plazmidės, reikalingos norimų taikinių antigenų genų suliejimui su visu gripo viruso HA genu ar jo fragmentais, sukūrimo

tam tikslui panaudojant oligonukleotidus ir polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodologiją.

HA taikiniai antigenų suliejimo genai modifikuojami tokiu būdu, kad jų ekspresija vabzdžių ląstelėse būtų geresnė, tuo tikslu pašalinant gamtinio hidrofobinio signalinio peptido sekas ir pakeičiant jas nauju bakuloviruso signaliniu peptidu. Suliejamas genas įterpiamas bakuloviruso ekspresijos vektorių taip, kad bakuloviruso polihedrono promotorius reguliuotų sulietų baltymų transkripciją infekuotose vabzdžių ląstelėse. 18 aminorūgščių bakuloviruso signalinis peptidas nukreipia HA taikinio antigeno sulieto polipeptido transliaciją vabzdžių ląstelėse glikozilinimo keliu ir jo jau nebebūna subrendusiame sulietame baltyme.

Pavyzdžiui, plazmidė pA9440, turinti gripo viruso kamieno A/Beijing/32/92 HA geną pMGS12 bakuloviruso nešančioje plazmidėje, aprašytoje žemiau, buvo panaudota kaip matrica HA geno amplifikacijai polimerazės grandininės reakcijos (PGR) būdu darbe prisilaikant protokolo, kurį pasiūlė tiekėjas (Gene Amp PCR cloning kit, Perkin Elmer Cetus). PGR reakcijos mišinyje (100 µl), buvo 20 pmol HA genui tinkamų pradmenų. 5' ir 3' pradmenys buvo sukurti taip, kad galuose būtų restrikcinės endonukleazės saitai, kurių paprastai nėra HA gene. HA0 ir HA1 fragmentų 5' pradmuo (0-567) prasideda gamtinio HA geno koduojančių sekų 5' galo 52 bazių pora, pašalinus gamtinio signalinio peptido seką ir prijungus *Sma*I saitą 5' gale tuoj po HA koduojančių sekų. HA2 fragmento 5' PGR pradmuo (0-651) prasideda gamtinio HA geno 1108 nukleotidu tuojau pat po kodono, koduojančio arginino liekaną, pašalinamą skaidant HA0 į HA1 ir HA2. HA0 ir HA2 fragmentų 3' PGR pradmuo (0-680) sukurtas taip, kad pasibaigus HA koduojančioms sekoms būtų prijungtas *Kpn*I saitas pašalinant gamtinį stop kodoną. HA1 3' PGR pradmuo (0-679) sutrumpina geną prieš pat arginino liekaną, pašalinamą HA0 skaidymo metu. HA geno fragmento amplifikacija atliekama 30 ciklų, kurių kiekvieną sudaro 1 min. 94° C denatūracijai, 2 min. 55° C pradmenų sujungimui ir 2 min. 72° C ekstencijai. Gauti amplifikuoti HA fragmentai elektroforezuojami agarozės geliuose ir išskiriami iš gelio panaudojant GeneClean rinkinį (Bio 101, Inc.), prijungiami prie plazmidės, sukurtos priimti PGR-generuotus fragmentus

(pCRII, Invitrogen). Taip gaunamos plazmidės pB142, pB144 ir pB330, į kurių sudėtį įeina atitinkamai HA0, HA1 ar HA2 geno fragmentai.

HA geno fragmentai, panaudojus *SmaI* ir *KpnI* restrikcijos fermentus, išskiriami iš plazmidžių pB142, pB144 ir pB330 ir subklonuojami naudojant standartinius DNR metodus (Sambrook ir kt., 1989) AcNPV nešančioje plazmidėje pMGS12. PMGS12 plazmidė turi, pradedant 5' ir einant link 3' galo, AcNPV polihedrono promotorių, ATG inicijuojantį kodoną, 61000 molekulinės masės bakuloviruso glikoproteino (61K) atskeliamo signalinio peptido seką, *SmaI* ir *KpnI* restrikcijos fermentų klonavimo saitus ir TAA universalaus stop kodono seką. Šiuos reguliuojančius rajonus riboja AcNPV genomo *EcoRI* I fragmento DNR (Summers ir Smith, "Bakuloviruso vektorių ir vabzdžių ląstelių kultūrų metodų vadovas". Teksas Agricultural Experimental station Bulletin No. 1555 (1987). Klonuoti HA PGR fragmentai išskiriami iš pCRII klonuojančio vekatoriaus, panaudojant *SmaI* ir *KpnI* ir elektroforezę agarozės gelyje, ir naudojant GeneClean rinkinį, įjungiami į pMGS12, kuri taip pat buvo skaidyta *SmaI* ir *KpnI*. Gautos AcNPV nešančios plazmidės, pB879, pB1201 ir pB1205, turinčios atitinkamus HA0, HA1 ar HA2 koduojančius rajonus, jungiamos rėmelyje su atskeliama 61K geno bakuloviruso signaliniu peptidu ir polihedrono promotoriumi. AcNPV nešančios plazmidės, pB879, pB1201 ir pB1205 gali būti naudojamos sulieti HA0, HA1 ar HA2 su bet kuriuo norimu genu.

Sekantis žingsnis konstruojant HA-CEA sulietą geną nešančias plazmides buvo susijęs su CEA koduojančių sekų įterpimu į HA-koduojančias konstrukcijas. Panaudojus PGR amplifikaciją, plazmidės pA9080 abiejuose CEA geno galuose įtaisyti restrikcinių endonuklezių *SmaI* ir *KpnI* atpažinimo/skaidymo saitai. 5' PGR pradmuo, 0-649, prasideda geno, neturinčio gamtinio CEA signalinio peptido sekos, 5' galo 82 bazių pora. 3' PGR pradmuo 0-650, sukurtas išmesti geno 3' galo, paskutiniąsias 72 bazių porų, koduojančias hidrofobinio C-terminalinio rajono seką. CEA geno fragmento amplifikacija atlikta 30 ciklų, kurių kiekvieną sudarė 1 min. 94° C denatūracijai, 2 min. 55° C atjungimui ir 2 min. 72° C ekstencijai. Gauti amplifikuoti CEA geno fragmentai elektroforezuojami agarozės geliuose ir išskiriami iš gelio panaudojant

GeneClean rinkinį, prijungiami prie plazmidės pCRII (Invitrogen) pagal gamintojo instrukciją. Gaunama plazmidė pB806, turinti CEA geną be jo gamtinio signalinio peptido, C-terminalinio hidrofobinio domeno, ar stop kodono, bet su abiem *SmaI* ir *KpnI* saitais abiejuose geno galuose.

Naudojant pB806 plazmidę, atliktas plačios apimties darbas, DNR suskaidyta naudojant arba *SmaI*, arba *KpnI*. CEA-koduojantys fragmentais išskirti naudojant agarozės gelio elektroforezę ir GeneClean rinkinį, išskirti fragmentai įjungiami į kiekvieną iš trijų HA-koduojančių konstrukčių (pB879, pB1201 ar pB1205), suskaidytų tuo pačiu restrikcijos fermentu. Pavyzdžiui, CEA-koduojantys fragmentai su *SmaI*-nuskeltais galais buvo sujungti su HA0-, HA1- ir HA2-koduojančiais konstruktais (atitinkamai pB879, pB1201 ir pB1205) ir suskaidyti *SmaI*, gaunant atitinkamai plazmidės pB1250, pB1555 ir pB1584. CEA-koduojantys fragmentai su *KpnI* atskeltais galais sujungti su HA0-, HA1- ir HA2-koduojančiais konstruktais, suskaidoma *KpnI* ir gaunamos plazmidės pB1264, pB1564 ir pB1593. Įterpiant geną CEA *SmaI* saite, pasiekama, kad CEA geną koduojančios sekos atsiduria už HA koduojančių sekų. PGR pradmenys visiems konstruktais sukurti tokie, kad EA genas būtų įterpiamas rėmelyje su HA ir sulieto geno transliacija būtų terminuota universaliu transliacijos terminacijos signalu (TAATTAATTAA) (Seka ID No. 4) pMGS12 vektoriaus sekose toliau nuo *KpnI* saito.

Šis konstruktas gali būti pagerintas išmetant įsiterpiančias aminorūgštis, esančias arba tarp signalinio peptido ir HA0, kaip tai aprašyta žemiau, arba esančias tarp HA0 ir suliejamo geno, tam, kad pagerėtų baltymo sankloda ir imunogeniškumas.

Vakcinų vaisto forma ir pakuotė

rHA gali būti paruoštas pakuotėje vienas arba derinyje su kitais gripo viruso antigenais, panaudojant metodus ir medžiagas, žinomas gripo vakcinų gamyboje. Variante, kuriam teikiama pirmenybė, multivalentinės vakcinos gamybai naudojamas dviejų A kamienų ir vieno B kamieno HA baltymų derinys.

Ypatingu privalumu pasižymi tas variantas, kuomet HAi yra derinami su adjuvantu, pridedamu tokiu kiekiu, kuris užtikrina

imunogeninio atsako prieš HA baltymus padidėjimą. Šiuo metu vienintelis adjuvantas, plačiai naudojamas žmonėms yra alūnas (aliuminio fosfatas ar aliuminio hidroksidas). Saponinas ir jo igrynintas komponentas Quil A, Freund'o pilnas adjuvantas bei kiti adjuvantai, naudojami eksperimente ir veterinarijoje, pasižymi toksiškumu, mažinančiu potencialią galimybę juos panaudoti vakcinų žmonėms gamyboje. Tačiau nauji cheminiai preparatai tokie, kaip muramilo dipeptidas, monofosforilo lipidai A, fosfolipido konjugatai tokie, kaip Goodman-Snitkoff ir kt. aprašyti J. Immunol. 147: 410-415 (1991) (yra literatūros sąrašė), baltymo inkapsuliacija proteoliposome, aprašyta Miller ir kt., J. Exp. Med. 176: 1739-1744 (1992) (yra literatūros sąrašė), baltymo inkapsuliacija lipidinėse pūslelėse tokiose kaip NovasomeTM lipidų pūslelės (Micro Vascular Systems, Inc., Nashua, NH) taip pat galėtų būti naudingi.

Variante, kuriam teikiama pirmenybė, paruošta vakcina pateikiama vienkartinės dozės pavidalu, kuri gali būti panaudota parenteraliai imunizacijai (į raumenis, į odą ar į paodę) ar nosiaryklinei imunizacijai (pvz. į nosį). Efektyvi dozė nustatoma būdu, kuris pateikiamas žemiau aprašomuose pavyzdžiuose. Nešėju paprastai būna vanduo ar užbuferintas druskos tirpalas su ar be konservanto. Antigenas gali būti liofilizuotas ir prieš panaudojimą resuspenduotas arba gali būti ištirpintas.

Nešėjas taip pat gali būti ir polimerinė uždelsto skleidimo sistema. Gaminant kontroliuojamą antigenų skleidimo vakciną ypač naudingi yra sintetiniai polimerai. Tarp pirmųjų tokio tipo pavyzdžių buvo metilo metakrilato rutuliukai, kurių diametras mažiau už vieną mikroną, taip vadinamų nano dalelių, polimerizacija, aprašyta Kreuter J., Mikrokapsulės ir nano dalelės medicinoje ir farmakologijoje. M. Donbrow (red.) CRC Press, p. 125-148. Tokiu atveju antikūnų atsakas ir apsauga prieš gripo virusą būna žymiai geresnė negu naudojant derinį su aliuminio hidroksidu. Bandymai, atlikti naudojant kitas daleles, parodė, kad šių polimerų adjuvantinis efektas priklauso nuo dalelės dydžio ir hidrofobiškumo.

Mikroinkapsuliacija panaudota suleidžiant mikroinkapsuliuotą vaisto formą tam, kad pastaroji duotų kontroliuojamo skleidimo efektą. Daugelis veiksnių sąlygoja mikroinkapsuliacijai tinkamo polimero pasirinkimą. Polimero sintezės reprodukcibilumas ir mikroinkapsuliacijos

procesas, mikroinkapsuliacijos medžiagų ir proceso kaštai, toksikologiniai ypatumai, variabilios skleidimo kinetikos parametrai ir polimero bei antigenų fizikocheminis suderinamumas – tai faktoriai, į kuriuos būtina atsižvelgti. Naudingų polimerų pavyzdžiais yra polikarbonatai, poliesteriai, poliuretanai, poliortoesterai ir poliamidai, ypač tie kurie, pasižymi biodegradacinėmis savybėmis.

Dažniausiai nešėju farmaciniais preparatams, o neseniai ir antigenams, pasirenkams poli (d,l – laktid – ko – glikolidas) (PLGA). Tai biodegraduojantis poliesteras, kuris jau seniai naudojamas medicinoje laikiniems protezams, kaip kaulų plokštelėms ir kt. gaminti, ir per tą laiką neparodė jokio toksiškumo. Įvairūs farmaciniai preparatai, tame tarpe peptidai ir antigenai, yra ruošiami inkapsuliuojant į PLGA mikrokapsules. Sukaupta daug duomenų apie PLGA panaudojimą kontroliuojamam antigeno skleidimui, pavyzdžiui, tai pateikiama Eldrige J.H. ir kt. apžvalgoje Šiuolaikinės mikrobiologijos ir imunologijos problemos, 1989, 146: 59-66. Nustatyta, kad antigenų inkapsuliacija nuo 1 iki 10 mikronų diametro PLGA mikrosferose sąlygoja didesnį adjuvantinį efektą tuo atveju, kai preparatas naudojamas per os. PLGA mikroinkapsuliacijos metu reikalingas vandens-aliejaus emulsijos fazių atskyrimas. Tikslinis preparatas paruošiamas kaip vandeninis tirpalas ir PLGA ištirpinamas atitinkamuose organiniuose tirpykčiuose, kaip antai metileno chloride ir etilo acetate. Šie du nesumaišomi tirpalai yra ko-emulsionuojami didelio greičio plakimo būdu. Po to pridedamas polimero ne-solventas, sukelia polimero precipitacija apie vandeninius lašelius ir prasideda pirminių mikrokapsulių susidarymas. Mikrokapsulės surenkamos ir stabilizuojamos vienu iš šių agentų – polivinilo alkoholiu (PVA), želatina, alginatais, polivinilpirolidonu (PVP), metilo celiulioze, tirpiklis pašalinamas arba džiovinant vakuume arba jį ekstrahuojant.

Pateikiamas išradimas aiškinamas sekančiais neribotais pavyzdžiais.

Pavyzdys 1: Gripo virusų auginimas ir išskyrimas

Sekantys gripo vakcinos viruso kamienai buvo gauti iš FDA viščių kiaušinio alantoitinio skysčio pavidalu:

A/Pekinas/353/89-tipo (H3N2)

A/Pekinas/32/92-tipo (H3N2)

ATeksasas/36/91-tipo (H1N1)

B/Panama/45/90

Iš FDA gautų virusų kamienai kultivuoti infekuotose MDCK ląstelėse, pridėjus TPCK-paveikto tripsino (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ir fetalinio veršiukų serumo tokia koncentracija, kuri yra optimali aukščiausių pirmojo pasažo viruso titrų gavimui. MDCK ląstelės infekuotos gripo viruso kamienais naudojant mažiausią infekcijos dauginimosi koncentraciją, kuri buvo nustatyta standartiniu HA testu (Rosen, "Gyvūnų virusų sukelta hemagliutinacija" knygoje *Virusologijos metodų pagrindai*, red. K. Habel ir N.P. Salzman, p. 276-28 (Academic Press, New York 1969). Infekuotos ląstelės inkubuotos 33 ° C 48 val. ir hemagliutinacijos aktyvumo testu terpėje įvertinta viruso produkcija. Auginimo sąlygos, kurių metu pasiektas didžiausias HA aktyvumas, naudotas ruošiant plačios apimties gripo viruso kiekius. Lentelėje 1 pateikiamos optimaliausios gripo viruso auginimui TPCK tripsino ir fetalinio veršiuko serumo koncentracijos.

Lentelė 1. Optimalios TPCK tripsino ir fetalinio veršiukų serumo koncentracijos

	A/Pekinas/353/89	A/Pekinas/32/92	A/Teksasas/36/91	B/Panama/45/90
%, fetalinio serumo	0.25%	0.25%	0.25%	5.0%
TPCK-paveikto tripsino kiekis	45 µg/ml	45 µg/ml	45 µg/ml	3 µg/ml

Gripo viruso išskyrimas: Virusai surinkti praėjus 24-48 val. po užkrėtimo nuskaidrinant ($1,000 \times g$ 10 min.) virusu užkrėstų MDCK ląstelių terpę, surinktą iš 10 kultivavimo flakonų T175. Virusas surenkamas centrifūguojant terpę $100,000 \times g$ 1 val. gautos virusinės nuosėdos resuspenduojamos 1 ml fosfatais užbuferinto druskos tirpalo (PBS) pH 7.4 ir centrifūguojamos 20 ml 20-60% (w/v) sacharozės gradientu PBS tirpale. Gripo viruso juostelė surenkama iš 40-45% sacharozės gradiento zonos, atskiedžiama PBS ir centrifūguojama $100,000 \times g$. Išskirto viruso nuosėdos resuspenduojamos 0.5 ml PBS ir saugomos $-70^{\circ}C$.

Pavyzdys 2. Gripo viruso A/Teksasas/36/91 HA geno klonavimas.

2 Fig. pateikiamas specialus vieno iš gripo viruso HA genų klonavimo etapas. Iš CDC gauto gripo viruso kamieno A/Teksasas/36/91 virusinė RNR ekstrahuota panaudojant aukščiau aprašytą būdą. Universalus pradmuo, komplementarus gripo viruso 3' galo RNR segmentams 5' -AGCAAAGCAGG (SEQ ID No. 1), drauge su pelių Maloney leukemijos viruso (M-MuLV) atvirkštine transkriptaze panaudotas gripo viruso cDNR gamybai. Išskirta virusinė RNR ar mRNR (5'g) panaudota kaip matrica cDNR gamybai drauge su M-MuLV atvirkštine transkriptaze (cDNR pirmojo siūlo sintezės rinkinys, Pharmacia Inc.) Pradmeniu gripo viruso A kamienų virusinės RNR cDNR sintezei naudotas sintetinis oligonukleotidinis pradmuo (5' -AGCAAAGCAGG-3') (SEQ ID No. 1), homologiškas visų viriono HA geno segmentams.

HA genų amplifikacija panaudojant cDNR atlikta polimerazės grandininės reakcijos (PGR) būdu standartinėmis reakcijos sąlygomis (Gene Amp kits; Cetus/Perkin Elmer, Norwalk, CT). PGR reakcijos mišinys (100 μ l) susidėjo iš 20 pmol pradmenų, specifinių gripo viruso A (H3) arba A (H1), arba B kamienų HA geno 5' ir 3' galams, nustatytų pagal konsensusines sekas, rastas GenBank DNR duomenų bazėje (lentelė 2). Amplifikacija vykdyta 30 ciklų, kiekvieną ciklą sudarė 1 min denatūracijai $94^{\circ}C$, 2 min $55^{\circ}C$ sujungimui ir 3 min $72^{\circ}C$ ekstencijai. PGR produktai tirti 0.8% agarozės geliuose atrenkant pagal dydį prieš klonavimą.

Lentelė 2. Pradmenys, naudoti PGR amplifikacijai

<u>A/Pekinas/</u> <u>32/93</u>	
5' galo genas (SEQ ID No. 27)	5' GGG <u>GGA TCC GGT ACC</u> AGC AAA AGC AGG GGA TAA TTC TAT 3' BamH1 Kpn1
5' galas be HA signalinio peptido (SEQ ID No. 28)	5' GGG <u>GGT ACC CCC GGG</u> GAC TTT CCA GGA AAT GAC AAC AG 3' Kpn1 Sma1
3' galas (SEQ ID No. 29)	3' TAA TTA ATT TTT GTG GGA ACA AAG ATC CTA <u>AGC CAT GGC</u> CC 5' Kpn1
<u>A/Teksasa</u> <u>s/36/91</u>	
5' galo genas	5' GGG <u>GGT ACC CCC GGG</u> AGC AAA AGC AGG GGA AAA TAA AAA 3' Kpn1 Sma1
5' galas be HA signalinio peptido (SEQ ID No. 4)	5' GGG <u>GGT ACC CCC GGG</u> GAC ACA ATA TGT ATA GGC TAC CAT 3' Kpn1 Sma1
3' galas (SEQ ID No. 3)	3' GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT <u>CCA TGG</u> CCC 5' Kpn1
<u>B/Panama</u> <u>45/90</u>	
5' galo genas (SEQ ID No. 30)	5' GGG <u>GAA TTC GGT ACC CCC GGG</u> AAG GCA ATA ATT GTA CTA CTC ATG GT 3' EcoR1 Kpn1 Sma1
5' galo be signalinio peptido (SEQ ID No. 31)	5' <u>GGT ACC CCC GGG</u> GAT CGA ATC TGC ACT GGG ATA ACA 3' Kpn1 Sma1

3' galas (SEQ ID No. 32)	3' TG TTA CAA AGA ACA/G AGG TAG ACA GAC ACT <u>CCA TGG CCT AGG</u> <u>CTT AAG GGG</u> 5' BamH1 EcoR1
-----------------------------------	--

Kpn1

HA geno 5' galo PGR pradmenys: 5' - GGG GGT ACC CCC GGG AGC AAA AGC AGG GGA AAA TAA AAA-3' (SEQ ID No. 2) ir HA geno 3' galo : 5' - GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT CCA TGG CCC-3' (SEQ ID No. 3) naudoti PGR viso ilgio HA geno sintezei.

Naujas 5' PGR pradmuo sukurtas geno 5'-galui: 5' galo minus signalinė seka: 5' -GGG GGT ACC CCC GGG GAC ACA ATA TGT ATA GGC TAC CAT -3' (SEQ ID No.4) ir geno 3' galo: 5' -GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT CCA TGG CC- 3' (SEQ ID No.5). Jie panaudoti PGR HA geno be signalinio peptido sekos gavimui. Po to šis genas įterptas į TA vektorių suskaidytą *KpnI*. 61K signalinis peptidas bakuloviruso ekspresijai ir polihedrino promotoriui buvo įterptas į TA vektorių, turintį HA geną be signalinio peptido sekos. Gautas bakuloviruso rekombinantinis vektorius turi polihedrino promotorių, 61K bakuloviruso signalinį peptidą ir gripo viruso A/Teksasas/36/91 HA geną.

Gripo viruso B kamienų HA genai klonuoti panaudojant totalinę mesendžerinę RNR (mRNR), išskirtą iš MDCK ląstelių, užkrėstų B kamieno gripo virusu B/Panama/45/90. Totalinė RNR išskirta iš infekuotų ląstelių, augintų T175 flakonuose. Surinktos ląstelės lizuotos pridėjus guanidinio tiocianato ir išskirta totalinė RNR panaudojant būdą, aprašytą aukščiau. Totalinė mRNR išskirta iš ląstelinės RNR panaudojant Oligo- (dT) - celiuliozės pluošto kolonėlės pagal aukščiau aprašytą būdą.

Gripo viruso B kamienų mRNR gavimui pradmeniu naudotas atsitiktinis oligonukleotidinis DNR pradmuo (Pharmacia, Inc.).

Pateikiamas pavyzdys reagentų, naudotų cDNR sintezei, kuomet gripo viruso A/Teksasas/36/91 virusinė RNR buvo panaudota kaip matrica. cDNR segmentų, koduojančių gripo viruso baltymus, lokalizacija apibūdinama sekančiai. Išskirta virusinė RNR reakcijos mišinyje buvo sujungta su universaliu vienasilės DNR pradmeniu 5' - AGCAAAAGCAGG-3' (SEQ ID No. 1). Šis pradmuo komplementarus gripo viriono 3' galo segmentui, aprašytam aukščiau. Reakcijos mišinyje

taip pat buvo pridėta ir [α - 32 P]dCTP tam, kad būtų vizualizuoti cDNR produktai, kurie buvo išskirti 1.5% šarminės hidrolizės gelyje (Maniatis ir kt., 1982) ir eksponuoti ant X-OMAT-AR filmo.

Pavyzdys 3: HA genų klonavimas bakterinėse plazmidėse

Amplifikuoti PGR būdu rHA genai klonuoti pUC tipo plazmidiniame vektoriuje panaudojant TA Klonavimo Sistemą (Invitrogen, Inc.). HA genų buvimas verifikuotas plazmidinės DNR, išskirtos standartiniu būdu (Maniatis ir kt., 1982), restrikcijos fermentų analize. rHA genų 5' galas ištirtas nustatant DNR sekas ir sukurti nauji pradmenys sekų, koduojančių HA baltymų N-galo hidrofobinį signalinį peptidą, pašalinimui. Specifiniai 5' ir 3' galo oligonukleotidiniai pradmenys, išvardinti lentelėje 2, panaudoti cDNR produktų amplifikacijai PGR būdu ir po to klonuoti E. coli TA plazmidiniame vektoriuose (Invitrogen, Inc.) panaudojant standartinius klonavimo metodus. Gauti DNR klonai turėjo sekas, koduojančias subrendusius HA.

A/Teksasas/36/91, A/Pekinas/353/89, A/Pekinas/32/92 ir B/Panama/45/90 rHA genai buvo subklonuoti standartiniu būdu (Maniatis ir kt., 1982) bakuloviruso ekspresijos vektoriuose. HA genai pašalinti iš TA klonavimo plazmidės panaudojant atitinkamus restrikcijos fermentus ir išskirtas HA DNR fragmentas įterptas į bakuloviruso rekombinantinę plazmidę. Gauti bakterijų klonai patikrinti pagal rezistentiškumą ampicilinui ir po to apdoroti restrikcijos fermentais tam, kad būtų išlaisvintas įterptas HA genas ir patvirtintas jo buvimas. Rekombinantinės plazmidės, turinčios HA genus, išskirtos cezio chlorido-etidijum bromido gradientu (Maniatis ir kt., 1982). Plazmidžių 5' galas sekvenuotas tam, kad būtų nustatytas buvimas teisingų bakuloviruso signalų (AcNPV polihedrino promotorius, ATG translacijos starto signalas ir bakuloviruso signalinio peptido seka) ir atitinkama HA koduojanti seka teisingame skaitymo rėmelyje. HA genų 5' galo DNR sekos ir ribojantis AcNPV polihedrino promotorius ir bakuloviruso signalinis peptidas (pirmosios 18 aminorūgščių) parodyti SEKŲ LAPE.

SEQ ID No.6 koduoja gripo viruso A/Pekinas/32/92 HA geno 5' galo sekas (sekos 1-481). SEQ ID No. 7 yra atitinkama aminorūgščių seka (pradžia starto kodone "ATG" [nukleotidas 21] SEQ ID No.6). 61K signalinio peptido amino rūgščių seka yra ketvirtas rinkinys SEQ ID No.7 kaip aminorūgštys 1-18.

SEQ ID No.8 koduoja gripo viruso A/Teksasas/36/91 HA geno 5' galo sekas (sekos 1-481). SEQ ID No.9 yra atitinkama aminorūgščių seka (pradžia starto kodone "ATG" [nukleotidas 21] SEQ ID No.8). 61K signalinio peptido amino rūgščių seka yra ketvirtas rinkinys SEQ ID No.9 kaip aminorūgštys 1-18.

SEQ ID No.10 koduoja gripo viruso B/Panama/45/90 HA geno 5' galo sekas (sekos 1-434). SEQ ID No.11 yra atitinkama aminorūgščių seka (pradžia starto kodone "ATG" [nukleotidas 21] SEQ ID No.10). 61K signalinio peptido amino rūgščių seka yra ketvirtas rinkinys SEQ ID No.11 kaip aminorūgštys 1-18.

SEQ ID No. 6, 8 ir 10 nukleotidai 1-20 yra poliheidrino promotoriaus 3' galas, nukleotidai 21-74 koduoja 61K signalinį peptidą ir gale nukleotidai pradedant 75 koduoja HA geno 5' galą.

Pavyzdys 4: rekombinantinio HA ekspresija vabzdžių ląstelėse

Chimerinės rekombinantinės plazmidės, turinčios klonuotus HA genus, išskirtos ir 2 μ g sumaišyti su 1 μ g AcNPV laukinio tipo DNR. DNR kalciu koprecipituota ir standartiniu metodu transfekuota į *S. frugiperda* ląsteles (Smith, Summers, Fraser, Mol. and Cell. Biol. 3: 2156-2165 (1983). Rekombinantiniai bakulovirusai identifikuoti pagal jų poveikio zonos morfologiją ir po to išskirti atliekant pakartotinius užkrėtimus ir atrenkant poveikio zonas. Išskirti rekombinantiniai bakulovirusai ištirti, ar ekspresuoja rHA, ir tolimesniai darbo eigai atrinktas vienas bakuloviruso ekspresijos vektorius.

S. frugiperda ląstelės užkrėstos bakuloviruso vektoriumi, turinčiu gripo viruso B/Panama/45/90 HA geną. Praėjus 24, 48 ir 72 val. po infekcijos, 1×10^6 ląstelių 15 min. inkubuota su 25 Ci [35 S]metionino tam, kad pasižymėtų naujai sintezuoti baltymai. Po to ląstelės surinktos ir

išskirti baltymai, tam tikslui panaudojant 11% poliakrilamido gelį su 0.1% SDS. Radioaktyviai pažymėti baltymai detektuoti eksponuojant X-OMAT-AR filme. Baltymo tyrimai pagal standartus ir masę kilodaltonais (kd) parodė, kad 85 kd rekombinantinis HA baltymas yra vienas didžiausių baltymų, kurie buvo sintezuoti ląstelėse praėjus 48 val. ir 72 val. po užkrėtimo.

Pavyzdys 5: rekombinantinio HA gamyba ir išskyrimas

Bakuloviruso ekspresijos vektorius A8611, turintis gripo viruso A/Beijing/353/89 geną, sukurtas kaip aprašyta aukščiau apie A/Beijing/32/92 hemagliutinina, esantį polihedrino promotoriaus kontrolėje, panaudotas užkrečiant *S. frugiperda* ląsteles. Ląstelės kultivuotos 27° C temperatūroje 1 x 10⁶ ląstelių/ml tankiu TNMFH terpėje (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), į kurią pridėta 10% fetalinio veršiuko serumo, ir užkrėstos 1 infekcijos dauginimosi intensyvumu (MOI) panaudojant A8611 rekombinantinį bakulovirusą. Infekcijos metu gripo viruso A/Beijing/353/89 hemagliutininas gaminamas bakuloviruso polihedrino promotoriaus transkripcinėje kontrolėje. Praėjus 72 val. po infekcijos, ląstelės surenkamos centrifūguojant 15 min 3,400 x g, plaunamos resuspenduojant beseruminėje TNMFH terpėje ir po to vėl centrifūguojamos 30 min. 10,400 x g. Supernatantas pašalinamas ir infektuotų ląstelių nuosėdos saugomos -70° C.

Rastas būdas, kurio metu rekombinantinis HA yra selektyviai ekstrahuojamas iš infektuotų ląstelių tokiomis sąlygomis, kurios nedenaatūruoja antigeno. Visa ekstrakcija atliekama prie 4° C. Ląstelės, surinktos iš 0.5 L kultūros (maždaug 5 x 10⁸ ląstelių), suardytos veikiant 2 min PolytronTM homogenizatoriumi (Brinkmann Instruments Inc. Westbury, NY) ledo vonioje atšaldytame 40 mL tirpale, kuriame yra 30 mM tris-HCl, pH 8.4, 25 mM LiCl, 1% (v/v) Tween-20, 1 mg/mL leupeptino. Gautas homogenatas centrifūguotas 30 min 9,200 x g. Supernatantas pašalinamas ir nuosėdos surenkamos. Šios darbo eigos metu pašalinami vabzdžių ląstelių tirpūs ir periferinių membranų baltymai ir nereikia integralinių membranų baltymų, kuriems priklauso rHA, ekstrakcijos.

Tam, kad būtų ekstrahuotas rHA, nuosėdos homogenizuojamos 2 min ledo vonioje atšaldytame 40 mL tirpale, kurį sudaro 30 mM Tris, 10 mM etanolamino, pH 11, 25 mM LiCl, 2% Tween-20. Po to inkubuojama 60 min ledo vonioje, homogenato pH keičiamas iki 8.4 pridedant 1N HCl ir netirpioji frakcija pašalinama centrifūguojant 30 min 9,200 x g. Supernatantas, turintis tirpų rHA, surenkamas, patikrinamas pH ir, jeigu reikia, keičiamas iki 8.4 kambario temperatūroje. Netirpi frakcija resuspenduojama 40 mL vandens analizei. HA integralus membranos baltymas soliubilizuojamas esant aukštam pH, Tween-20 detergente ir lieka tirpus net sumažėjus pH.

Baltymai tirti SDS poliakrilamido gelio elektroforezės metodu. Pavyzdžiai suardyti verdančio vandens vonioje 2% natrio dodecilsulfato (SDS) ir 5% beta-merkatoetanolio tirpale, po to elektroforezuoti 11% poliakrilamido gelyje, kuriame buvo 0.1% SDS, ir nudažyti Coomassie mėliu.

Rekombinantinio HA išskyrimui panaudota chromatografija, kurios metu gautas labai išgrynintas rekombinantinio HA antigenas, kuris buvo nedenatūruotas ir tiko kaip komponentas žmogaus gripo vakcinos gamybai. Sekantis būdas buvo panaudotas gripo viruso A/Pekinas/353/89 HA išskyrimui iš *S. frugiperda* ląstelių, užkrėstų rekombinantiniu virusu A8611.

HA išskyrimo iš 0.5 L infekuotų *S. frugiperda* ląstelių metu chromatografijos gelio matricoms naudota - 30 mL Pharmacia DEAE greitos tėkmės Sefarozė (Pharmacia C16/20 kolonėlė) ir 4 mL Pharmacia Lęsinio Lektino Sefarozė 4B (Pharmacia C10/10 kolonėlė). DEAE kolonėlės išleidimas buvo sujungtas su lęsinio lektino kolonėlės įleidimu, ir S/N 2 ląstelių ekstraktas, paruoštas kaip aprašyta aukščiau, įvestas į suporintas kolonėles tėkmės greičiu 1 mL/min. Kolonėlės plautos 30 mM Tris-HCl, pH 8.4, 25 mM LiCl, 0.5% Tween-20, pakol lęsinio lektino effluento 280 nm UV absorbcija sugrįžo prie pamatinės linijos. Esant šioms sąlygoms, dauguma pašalinių baltymų jungėsi prie DEAE, o rekombinantinis HA pratekėjo pro kolonėlę. Likusieji kontaminantai praėjo pro lęsinio lektino kolonėlę, o glikozilintas rHA prisijungė prie lęsinio lektino afininės matricos. DEAE kolonėlėl buvo atjungta, o lektininio lęšio

kolonėlė praplauta kita porcija 40 mL 30 mM tris-HCl, 25 mM LiCl. 0.5 naudota Tween-20. Po to lektininė kolonėlė praplauta 40 mL 30 mM Tris-HCl, pH 8.4, 25 mM LiCl, 0.4 % (v/v) natrio dezoksicholato (DOC). Šio plovimo metu detergantas Tween-20 pakeičiamas kitu detergentu - DOC, kuris gali būti pašalintas nuo baltymo dializės metu. Rekombinantinis HA eliuotas iš lektininės kolonėlės panaudojant 20 mL iš 40 mL 30 mM Tris-HCl, pH 8.4, 25 mM LiCl, 0.4% (v/v) natrio dezoksicholato, turinčio 0.3 M a - D -metilo manozido. Gautas baltymas ištirtas PAGE būdu.

Dėl gripo viruso HA baltymų genetinio variabilumo aukščiau aprašyta išskyrimo eiga gali varijuoti, priklausomai nuo kiekvieno unikalaus rekombinantinio HA baltymo. Pavyzdžiui, rHA gali jungtis prie DEAE jonų kaitos kolonėlės vietoje to, kad ją pratekėtų. Jeigu tai atsitiktų rHA galima būtų pašalinti iš DEAE kolonėlės plaunant kolonėlę buferiu, turinčiu didesnes LiCl, NaCl ar kitų druskų koncentracijas.

Tam, kad būtų pašalinta DOC detergantas bei kiti buferio komponentai. Lektininės kolonėlės eliuatas, turintis išskirtą rHA, buvo dializuotas panaudojant fosfatais užbuferintą druskos tirpalą, pH 7.5 (PBS). Išskirtas rekombinantinis rHA, patikrintas SDS poliakrilamido gelio elektroforeze, pasirodė besą mažiausiai 95% grynumo.

Pavyzdys 6: rHA atsparumo proteazei analizė

Subrendę HA buriasi į trimeres struktūras, kurios yra atsparios įvairių proteazių, įskaitant tripsiną, poveikiui, kai tuo tarpu HA monomerai yra jų degraduojami (Murphy ir Webster, 1990). Todėl atsparumas tripsino poveikiui gali būti panaudotas kaip funkcionalaus trimero susidarymo įrodymas. rHA atsparumas proteazės poveikui patikrintas sekančiu būdu.

Išskirto rHA (A/Pekinas/353/89) du bandiniai po 60 µg/mL buvo inkubuoti 30 min. ledo vonioje su 30 mM Tris-HCl, pH 8.4, 150 mM NaCl, pridėjus ar ne pridėjus 50 µl/mL TPCK-paveikto tripsino. Reakcija sustabdyta pridėjus 57.4 mM fenilo metilo sulfonilfluorido izopropanolyje iki 1 mM galutinės koncentracijos. Kiekvieno bandinio reakcijos mišinys denatūruotas virinant 3% SDS redukcinėmis sąlygomis, po to tirti elektroforezės 11.5% poliakrilamido geliuose būdu ir pernešti ant

nitroceliuliozės filtrų pagal standartinį Western blotingo metodą. HA polipeptidai nustatyti panaudojant jūros kiaulyčių anti-HA serumą, gautą imunizuojant išskirtu rHA, ir ožkos antiserumą jūros kiaulytės imunoglobulinams, konjuguotą su šarmine fosfataze.

Nepaveiktas rHA keliauja kaip HA pirmtakas (HA0). Paveikus proteaze, gaunamos dvi pagrindinės juostos, kurios keliauja kaip gripo viruso hemagliutininas HA1 ir HA2. Gauti rezultatai parodė, kad tripsinas skaido rHA baltymą į du polipeptidus, kurie yra panašaus į HA1 ir HA2 dydžio. Tolimesnė proteolizė nebevyksta. Šie rezultatai rodo, kad rHA, išskirtas aukščiau aprašytu būdu, yra atsparus proteazės degradacijai. Šis ypatumas susijęs su išskirtojo rHA trimerine forma.

Pavyzdys 7: rHA imunogeniškumo nustatymas standartiniu pelių potencijos įvertinimo būdu.

Vienas iš antigeno imunogeniškumo nustatymo būdų yra kiekio, reikalingo apčiuopiamo antikūnų atsako pelėse indukcijai, nustatymas (pelių potencijos įvertinimo būdas). Standartinis pelių potencijos potencijos įvertinimo būdas naudojamas rHA0 vakcinės imunogeniškumo nustatymui. 5-10 pelių grupės vieną kartą imunizuojamos vakcina, turinčia įvairius išskirto rHA atskiedimus, pvz., 0.500 μ g, 0.1 μ g, 0.02 μ g, ir 0.004 μ g. Serumai surenkami praėjus 28 dienoms po imunizacijos ir naudojant standartinį imunofermentinės analizės metodą (ELISA) 96 šulinėlių mikroplokštelėse, nustatomi antikūnai rHA antigenui. Pelė laikoma serokonvertuota, jeigu OD450 esant 1:100 atskiedimui yra didesnis negu trys standartiniai nuokrypiai nuo pelės preimuninio serumo OD450 vidurkio. Vakcinės efektyvi dozė, reikalinga pelės 50 % serokonversijai (ED_{50}), yra antigeno imunogeniškumo matas.

Pavyzdžiui, keturios grupės po 10 pelių, yra imunizuojamos vieną kartą rHA0 vakcinės arba 0.1 μ g, 0.02 μ g, 0.004 μ g, arba 0.0008 μ g (5-kartis atskiedimas). Serumai surenkami praėjus 28 dienoms po imunizacijos ir ELISA metodu įvertinama serokonversija rHA0 antigenui. Dozė, reikalinga pelės 50 % serokonversijai (ED_{50}) apskaičiuojama kaip minimali ED_{50} , nustatyta kiekvienam rHA antigenui.

Preliminarūs duomenys rodo, kad vienkartinė rHA0 0.004 µg dozė sukels pelių 50% serokonversiją.

Pavyzdys 8: rHA panaudojimas derinyje su adjuvantu ir palyginimas su kitomis komercinėmis gripo viruso vakcinomis.

Pelių potencijos įvertinimo būdu testuotas išskirto gripo viruso A/Pekinas/353/89 rHA imunogeniškumas panaudojant jį drauge su alūnu arba be jo (gryną) ir palygintas su komercine gripo viruso vakcina, FLUZONE® (Connaught Laboratories, Inc. Swiftwater, PA), turinčia gripo virusą A/Pekinas/353/89. Naudotos šios vakcinų dozės 0.5 µg, 0.1 µg, 0.02 µg ir 0.04 µg. 28 dieną pelės buvo paskiepytos išskirto rHA dozėmis, nurodytomis aukščiau. 42 dieną serumai surinkti ir titruoti naudojant ELISA būdą ir nustatant IgG anti-HA antikūnus.

Rezultatai pateikti Fig. 3. Imunizuojant be adjuvanto, tik 0.5 µg doze indukavo žymesnį antikūnų gamybos titrą (200,000). Naudojant su adjuvantu, prireikė tik tokios mažos, kaip 0.004 µg, rHA dozės, kad būtų indukuoti žymūs antikūnų titrai. Gyvuliukai, imunizuoti rHA (grynu) produkavo beveik tuos pačius anti-rHA antikūnų kiekius kaip ir imunizuotieji komercine vakcina. Alūnas padidino rHA imunogeniškumą ir buvo indukuoti tokie anti-rHA antikūnų titrai, kurie buvo 10 kartų ar daugiau didesni negu imunizuojant be adjuvanto.

Tokiu būdu, išskirtų rHA0 imunogeniškumo palyginimas su gripo viruso pilno viriono vakcina FLUZONE® (Connaught Laboratories, Inc. Swiftwater, PA) rodo, kad rHA0 sukelia pelėse panašų imuninį atsaką 42 dienų laikotarpyje. rHA0 absorbcija alūnu ženkliai padidina išskirto rHA0 imunogeniškumą pelėse, kaip tai buvo įvertinta būdu, aprašytu 7 pavyzdyje. Imunizuojant derinyje su alūnu indukuojami didesni IgG hemagliutininiai antikūnų kiekiai negu imunizuojant gripo vakcina FLUZONE®.

Pavyzdys 9: Hemagliutinacijos slopinimo tyrimai.

Hemagliutinacijos inhibicijos (HAI) antikūnai jungiasi prie trijų iš keturių žinomų hemagliutinino epitopų ir blokuoja gripo viruso gebą agliutinuoti eritrocitus (Wilson ir kt., "Gripo viruso apvalkalėlio glikoproteino hemagliutinino sandara 3Å skiriamoje geboje", *Nature*, 289: 366-378 (1981). Šie antigeniniai determinantai yra susikaupę apie hemagliutininių trimerų sialo rūgšties receptoriaus jungiamąją vietą. Antikūnai šioms vietoms neutralizuos viruso infektyvumą (Weis ir kt., "Gripo viruso hemagliutinino, sujungto su jo receptoriumi, sialo rūgštimi, sandara", *Nature*, 333: 426-431 (1988). HAI antikūnų titras ir specifiškumas yra svarbus gripo viruso vakcinės apsauginės galios prieš panašių ar giminingų gripo viruso kamienų infekciją rodiklis.

Tyrimai atlikti pelėse palyginant iš kamieno A/Pekinas/353/89 išskirto rHA ir vakcinės FLUZONE® (Connaught Laboratories, Inc. Swiftwater, PA) sugebėjimą indukuoti HAI antikūnus. Grupėms po 5 pelės 0 ir 28 dieną suleista po 0.5 µg, 0.1 µg, 0.02 µg ar 0.04 µg rHA0 arba tris kartus didesnes dozes FLUZONE® hemagliutinino taip, kad būtų suleisti vienodi rekombinantinio ar virusinio A/Pekinas/353/89 hemagliutinino kiekių. Pavyzdžiui, didesnės dozės grupės pelės buvo imunizuotos 1.5 µg FLUZONE® hemagliutinino (kiekvieno kamieno po 0.5 µg hemagliutinino) ir 0.5 µg rHA0. Tai, kad FLUZONE® yra papildomas hemagliutininis antigenas dėl kitų dviejų gripo viruso kamienų, gali būti kai kurių kryžmiškai reaguojančių antikūnų priežastimi.

Anti-hemagliutinininiai antikūnai (hemagliutinininiai IgG) nustatyti standartiniu skiedimo ELISA metodu kaip antigeną naudojant rHA0. HAI antikūnai įvertinti prieš 4 sekančių antigenų hemagliutinino vienetus: pilnas gripo kamieno A/Pekinas/353/89 virusas (A/bei), išskirtas iš kamieno A/Pekinas/353/89 rHA antigenas, ir FLUZONE®. HAI titrai yra reciprokiniai didžiausio antiserumo atskiedimo, slopinančio 50 % viščiuko eritrocitų agliutinaciją, atžvilgiu.

Lentelėje 3 susumuoti pelių serumo hemagliutinino IgG ir HAI titrai 42 dieną. Dideli anti-hemagliutinino antikūnų kiekiai gauti imunizuojant

rekombinantinio rHA vakcina. Jų titrai buvo apie 10 kartų didesni negu FLUZONE[®] atveju. Svarbiausia yra tai, kad rHA0 vakcina sąlygojo gerus titrus antikūnų, blokuojančių eritrocitų agliutinaciją, kurią galėjo sukelti A/pekinas/353/89 virusas ir rHA0 antigenai. Tokiu būdu, rHA0 vakcina indukavo HAI antikūnus, kurie gerai atpažino tiek patį imunogeną, tiek ir gripo virusą A/Pekinas/353/89. Žemesni HAI titrai FLUZONE[®] atveju gali būti sąlygoti antiserumo nesugebėjimo blokuoti agliutinaciją, kurią sukelia kitų kamienų virusų, esančių FLUZONE[®] hemagliutininas. Tuo tarpu, priešingai, pelės, imunizuotos FLUZONE[®], gamina didelius HAI antikūnų titrus, kurie nustatomi tik prieš FLUZONE[®] antigenus. Tuo tarpu HAI titrai prieš gripo virus¹ A/Beijing/353/89 ir rHA antigeną yra sumažėję. Panašus atsakas stebėtas ir žemesnių dozių grupėse.

Šie duomenys taip pat pagrindžia prielaid¹, kad galimi genetiniai skirtumai tarp gripo viruso kamieno A/Pekinas/353/89, esančio FLUZONE[®] ir to paties viruso kamieno, gauto iš FDA ir auginto kiaušinyje, kol buvo atliktas HAI testas. Tai, kad antikūnai, pasigaminę atsakant į rekombinantinį HA0, gautą klonuojant gripo viruso kamieną A/Pekinas/353/89, blokuoja eritrocitų agliutinaciją, kurią sukelia šio kamieno gripo virusas, jau savaime yra geras įrodymas, kad klonavimo eigoje neįvyko genetiniai pokyčiai, galėję paveikti sialo rūgšties receptoriaus sujungimo vietą, esančią išskirtame rHA0 antigene.

Lentelė 3 HAI titrai rHA0 ir FLUZONE® atžvilgiu

RHA A/Bei (42 diena)					FLUZONE® (42 diena)			
HA IgG		HAI			HA IgG	HAI		
Pelė	rHA0	A/Bei	rHA	FLUZ ONE®	rHA0	A/Bei	RHA0	FLUZ ONE®
1	4,096,000	1,920	960	15	256,000	<10	<10	600
2	4,096,000	480	480	15	512,000	120	120	600
3	8,192,000	1,920	960	15	256,000	60	60	300
4	4,096,000	960	960	30	128,000	30	30	400
5	4,096,000	1,920	960	60	512,000	80	80	400
Vidur kis	4,915,000	1,440	864	27	332,800	58	58	460

**Pavyzdys 10: 1993/1994 gripo vakcinos vaisto forma ir
klinikinis efektyvumas**

Su žmonėmis atlikta kelios serijos klinikinių tyrimų nustatant eksperimentinės gripo vakcinos, į kurios sudėtį įeina rekombinantinis HA, saugumą ir imunogeniškumą bei gaunant preliminarūs duomenis apie tokios vakcinos apsauginį efektyvumą prieš natūralią infekciją epideminio sezono metu. Gauti rezultatai rodo, kad vakcinos, turinčios savo sudėtyje rekombinantinį gripo viruso hemagliutininą (rHA0), pagamintos pagal aukščiau aprašytą metodiką, sukėlė stebėtinai mažai pašalinių vietinių reakcijų ir sąlygojo ekvivalentinį ar didesnį apsauginį imuninį atsaką, palyginus su komercine, licenzine atenuota gripo vakcina, pagaminta auginant virusą kiaušiniuose.

MEDŽIAGA IR METODAI

Vakcinos. Rekombinantinės HA vakcinos, naudotos šiame tyrime, savo sudėtyje turėjo pilno ilgio nesuskaidytą HA (HA0) (H3N2) virusą. Rekombinantinis HA0 (rHA) produkuotas *Lepidopteran* (vabzdžių) kultūros ląstelėse, kuomet į jas buvo eksponuotos su bakuloviruso vektoriumi, savo sudėtyje turinčiu cDNR su HA koduojančiu genu. Ekspresuotas baltymas buvo išskirtas nederinatūruojančiomis sąlygomis iki >95% grynumo, vertinant kiekybine skenuojančia densitometrija antigeną, gautą po elektroforezės natrio dodecilsulfato poliakrilamido geliuose. Peptidas identifiкуotas panaudojant aminorūgščių analizę, N-terminalinį sekvenavimą ir Western bloto analizę su antiserumu prieš gripo virusą A/Pekinas/32/92. rHA0 vakcinos turėjo nustatytą kiekį sintetinio HA antigeno, ištirpinto fosfatais užbuferintame druskos tirpale arba aliuminio fosfato (alūno) adjuvanto adsorbuoto gelio suspensijos formoje. Licenzinė trivalentinė subviriono vakcina, naudota šiame tyrime, turėjo po 15 µg/dozei įvairių gripo viruso kamienų A/Teksasas/36/91 (N1N1), A/Pekinas/32/92 (H3N2) ir B/Panama/45/90 hemagliutininų (FLUZONE® atenuotos gripo vakcinos, pagamintos kiaušiniuose, Connaught Laboratories, Swiftwater, PA).

Klinikiniai tyrimai. Saint Louis Universiteto ir Rochester Universiteto Institucinių Peržiūrų Tarybos išbandė tapačius tyrimų protokolus. Abiejų institucijų organizuotuose tyrimuose dalyvavo sveiki suaugę žmonės nuo 18 iki 45 metų amžiaus. Tiriamieji buvo parinkti atsitiktinai tam, kad panaudotų vieną iš sekančių penkių vakcinų pagal dvigubo-aklumo būdą: (1) 15 µg rHA0, (2) 15 µg rHA0 plius alūnas, (3) 90 µg rHA0, (4) licenzinė trivalentė inaktyvuota gripo viruso vakcina, arba (5) druskos tirpalo placebo. Vakcinos suleistos į raumenis 0.5 ml tūryje. Tam, kad būtų preliminariai įvertintas trijų vakcinų preparatų, į kurių sudėtį įėjo rHA0, saugumas, pirmieji 25 asmenys buvo vakcinuoti randomizuotai (t.y. 5 asmenys tyrimui) nepriklausomai nuo kitų asmenų ir buvo sekami apklausiant telefonu 48 val po vakcinacijos pakol vėl bus atiktos likusios vakcinacijos. Visi asmenys buvo apmokyti, kaip pirmąsias 6 dienas po vakcinacijos pildyti kasdienę pašalinių reakcijų stebėjimo kortelę, įskaitant

tiek vietinius, tiek sisteminius simptomus. Simptomai buvo suskirstyti į silpnai išreikštus, vidutinius ir stipriai išreikštus. Temperatūra matuota kasdien oraliu būdu ir tyrimų dalyviai ją užrašydavo karščiavimo atveju. Injekcijos vietoje atsiradęs patinimas ar paraudimas buvo įvertinami pagal pasireiškimo laipsnį priklausomai nuo to, ar plotas savo diametru buvo didesnis ar mažesnis už ketvirčio dolerio monetą. Visos vakcinacijos atliktos laikotarpyje tarp 1993 metų lapkričio mėnesio paskutinės savaitės ir gruodžio mėnesio pirmosios savaitės. Serumo bandiniai imti iš kiekvieno tiriamojo prieš pradedant vakcinaciją, 3 savaitės po vakcinacijos ir dar vieną kartą 1994 metais kovo pabaigoje ar balandžio mėnesį, praėjus mažiausiai 2-3 savaitėms po to, kai gripo virusai jau nebecirkuliavo vietinėje bendruomenėje. Kiekvienoje institucijoje savanoriai buvo apmokyti, kaip susisiekti su tyrimų centru, jeigu pajustų į gripą panašius požymius žiemos epideminio sezono metu. Į gripą panašiams požymiams buvo priskiriami bet kuris respiratorinis simptomas (ai), besitęsiantys dvi ar ilgiau dienų ir lydymas karščiavimo ir/ar tokių sisteminių simptomų kaip raumenų skausmai ar šalčio krėtimas. Iš asmenų, kurie pranešdavo apie į gripą panašius simptomus, buvo imami šluostiniai bandiniai iš nosies ir ryklės tam, kad būtų gauta viruso kultūra ir virusas būtų identifikuotas. Klinikiniai bandiniai buvo numeruojami koduojant ir tiriama aklai.

Serologija. Kiekvienam serologiniam tyrimui abiejų institucijų visi bandiniai buvo testuoti kaip vienas rinkinys vienoje laboratorijoje. Hemagliutinacijos inhibicijos (HAI) antikūnai gripo viruso A/Pekinas/32/93 (H3N2) antigenui nustatyti serumuose panaudojant standartinį mikrotitravimo būdą, prieš tai pašalinus nespecifinį inhibitorių receptorių skaidančią fermentu bei šalčio agliutininus tam tikslui panaudojus hemadsorbciją 4° C. Titrą nustatytas, kaip didžiausias serumo atskiedimas, kuris apsaugo nuo hemagliutinacijos viruso 4 antigeninius vienetus, pradėjus skiesti serumą nuo 1 : 4. Serumo HA-specifiniai imunoglobulininiai G (IgG) antikūnai tirti imunofermentiniu metodu (ELISA), panaudojant išskirtą gripo viruso A/Pekinas/32/93 (H3N2) rHA0 kaip dengiantį antigeną. Kietoje fazėje naudotų reagentų seka buvo ši: (1) išskirtas rHA0 antigenas, (2) serumo bandinys, (3) su šarmine fosfataze

konjuguotas ožkos serumas prieš žmogaus IgG, ir (4) p-nitrofenilo dinatrio fosfato substratas. ELISA titras išreikštas kaip didžiausias atskiedimas, kuriam esant šulinėlio, padengto antigenų, optinis tankis yra bent du kartus didesnis negu atitinkamo kontrolinio šulinėlio be antigeno. Neutralizuojantys antikūnai išmatuoti panaudojant mikroneutralizacijos testą, anksčiau aprašytą pas Treanor J.J., Betts R.F.. *J. Infect. Dis.* 168: 455-459 (1993). Trumpai, karščiu inaktyvuoto serumo serijiniai skiedimai buvo sumaišyti su gripo viruso A/Pekinas/32/93 (H3N2) maždaug 100 TCID₅₀ ir inkubuoti 37° C 1 val. Po to viruso-serumo mišinys adsorbuotas ant Madin-Darby šuns inksto ląstelių (MDCK) ištisinio vienasluoksnio 96-šulinėlių planšetėse 1 val. kambario temperatūroje. Planšetės atplautos, kad būtų pašalintas likęs inokuliumas, pripilta beseruminės Dulbecco MEM terpės su 2 µg/ml tripsino ir inkubuota 5% CO₂ atmosferoje 33° C 72 val. Ląstelės fiksuotos metanoliu ir viruso replikacija įvertinta panaudojant pelių monokloninių antikūnų, specifinių matriksui ir gripo viruso A kamieno nukleoproteinams panelį (Ligų Kontrolės Centrai, Atlanta, GA) bei po to sekančiame etape - su šarmine fosfataze konjuguotus antikūnus pelių IgG. Galutinis serumo titras nustatytas kaip didžiausias jo atskiedimas, sąlygojantis didesnę negu 50% signalo sumažėjimą palyginus su kontroliniais neneutralizuotais šulinėliais.

Virusologija. Nosiaryklės šluostinių bandinių virusų kultūros užaugintos kiekvienoje institucijoje naudojant standartinius metodus. Bandiniai inokuliuoti arba į MDCK, arba rhesus beždžionių inkstų ląsteles ir inkubuoti 33° C 4 dienas. Hemadsorbcija ant ląstelių vienasluoksnių išbandyta panaudojant 0.4% jūros kiaulytės eritrocitų suspensiją. Gripo virusai identifikuoti HAI būdu hemadsorbcijos pozityviose kultūrose panaudojant H3-specifinius antiserumus (Ligų Kontrolės Centrai).

Statistinė analizė. Statistinei analizei reciprokiniai HAI, ELISA IgG ir neutralizuojančių antikūnų titrai buvo logaritmiškai transformuoti. Žymiu atsaku į vakcinaciją buvo laikomas 4-kartis ar didesnis antikūnų titrų pakilimas, nustatytas palyginus antikūnų titrą prieš vakcinaciją su antikūnų titru, praėjus 3 savaitėms po vakcinacijos. Gripo viruso A (H3N2) infekcijos laboratorinis įrodymas buvo laikomas tuomet, jeigu iš nosiaryklės išskyrų buvo išsirtas virusas ir/arba serume buvo nustatytas 4-

kartis ar didesnis HAI antikūnų titras tarp postvakcinacijos 3 savaitės (prieš sezoną) bandiniuose, surinktuose gruodžio mėnesį ir atitinkamuose posezoniniuose bandiniuose, surinktuose sekantį pavasarį. Skirtumai tarp vakcinuojamų grupių išanalizuoti naudojant Fisher'io tikslųjį testą, skirtą palyginti asmenų su pašalinėmis reakcijomis kiekį, žymų antikūnų atsaką arba laboratoriskai patvirtintą gripo susirgimą ar infekciją, o taip pat panaudojant variantų analizę (ANOVA) tam, kad būtų palyginti postvakcinaciniai vidurkiniai reciprokiniai $\log_2$ antikūnų titrai. Modifikuoti Bonferroni nelygybės ir Tukey-Kramer testai buvo panaudoti daugybiniais galimais palyginimams.

REZULTATAI

Reaktogeniškumas. rHA0 vakcinos, naudotos šiame tyrime, buvo saugios ir gerai toleruojamos. Pašalinių reakcijų dažnis nebuvo įtakojamas besikeičiančių rHA0 antigeno dozių nuo 15 μ g iki 90 μ g, tačiau jos nežymiai padažnėdavo pridėjus alūno. Vietinis paraudimas, skausmas ir jautrumas injekcijos vietoje buvo stebimi žymiai dažniau, kai recipientai naudojo licenzinę subviriono vakciną, negu tada, kai recipientai naudojo arba 15 μ g, arba 90 μ g rHA0 druskos tirpale. Išskirtinai tik vienas asmuo patyrė stiprų skausmą, jautrumą ir nepatogumą žaste po imunizacijos licenzine vakcina, kai tuo tarpu kitiems visi simptomai buvo priskirti vidutiniškai išreikštiems ir tęsėsi 1-2 dienas. Jei išsivystydavo vietinis paraudimas ir/ar sukietėjimas, jis buvo mažesnis negu ketvirčio dolerio moneta.

Imunogeniškumas. Pagrindiniai serumo HAI titrai gripo viruso A/Pekinas/32/92 (H3N2) buvo mažesni ar lygūs 1 : 8 pas 64 (50%) asmenis iš 127 tiriamųjų. Dauguma asmenų kiekvienoje iš 4 vakcininių grupių pasižymėjo HA-specifiniais serologiniais atsakais, įvertintais HAI ir ELISA būdais (lentelė 4). Serume HAI antikūnų postvakcinaciniai titrai buvo didesni arba lygūs 1 : 32 pas visus vakcinos recipientus, išskyrus du asmenis, kurių vienas gavo 15 μ g rHA0, o kitas gavo licenzinę vakciną. Atrodo, kad pas daugumą savanorių vakcinacija buvo susijusi su neutralizuojančių antikūnų produkcija. Vidutiniškai antikūnų titrų ir serokonversijos lygio pakilimas turėjo tendenciją būti truputį mažesniu po imunizacijos 15 μ g rHA, palyginus su licenzine vakcina, tačiau šie

skirtumai statistiškai nebuvo patikimi. Pridėjus alūno, antikūnų atsakas į rHA0 nepadidėjo. Pas asmenis, imunizuotus 90 µg rHA0, vidutiniškai postvakcinaciniai HAI ir ELISA IgG antikūnų titrai buvo nuo dviejų iki penkių kartų aukštesni negu bet kurioje kitoje iš trijų vakcinavimo grupių (skirtumai buvo statistiškai patikimi palyginus serumo HAI titrus).

Apsauginis efektyvumas. Tiriamuoju laikotarpiu 26 asmenys pranešė apie 28 į gripą panašius susirgimus. Keturi iš šių individų (trys iš jų gavo placebo ir vienas buvo imunizuotas 15 µg rHA0) turėjo gripo A kamieno (H3N2) virusą, išskirtą iš jų nosiaryklės kultūrų. Žymus HAI antikūnų gripo virusui A/Pekinas/32/92 titrų pakilimas stebėtas tiriant presezoninius ir postsezoninius serumų bandinius trijų iš keturių kultūrose patvirtintų atvejų metu, tačiau šis reiškinys nebuvo stebėtas tiriant gripu susirgusius individus. Vienintelis rHA0 recipientas, kuris vėliau susirgo laboratoriskai patvirtintu gripu, turėjo pozityvią kultūrą, gautą praėjus 31 dienai po imunizacijos ir turėjo išreikštą serokonversiją nuo prevakcinacinio HAI titro mažiau kaip 1 : 4 iki postvakcinacinio (presezoninio) titro 1 : 32. Dviems papildomiems placebo recipientams ir vienam savanoriui, imunizuotam licenzine vakcina, serologiškai įrodyta gripo viruso A (H3N2) infekcija, įvykusi epideminio sezono metu, tačiau praėjusi be klinikinių ligos požymių. Palyginant visus vakcinuotus asmenis (arba visus asmenis, gavusius bet kurią rHA0 vakciną) kaip vieną grupę, žymiai didesnė placebo recipientų dalis turėjo laboratoriskai patvirtintą A kamieno (H3N2) gripo viruso sukeltą susirgimą ($p < .05$) arba infekciją ($p < .005$).

Išvardinti duomenys rodo, kad gripo vakcinos, į kurių sudėtį įeina išskirtas rHA0 antigenas, paruoštas kaip aprašyta aukščiau patentinėje paraiškoje, yra gerai toleruojamos ir sugeba pas žmones sukelti apsauginį imuninį atsaką. Netgi naudojant 90 µg dozę, šiame tyrime rHA0 nebuvo reaktogeniškesnis negu druskos tirpalo placebo ir sukėlė žymiai mažiau vietinių pašalinių reakcijų negu licenzinė trivalentė subviriono vakcina, turinti pusę (t.y. 45 µg) totalinio HA antigeno.

Neutralizuojantys, HA-specifiniai antikūnų atsakai į 15 µg rHA0 preparatą buvo panašūs į tuos, kuriuos sukėlė subvirioninė vakcina, ir žymiai išaugo, kai rHA0 dozė buvo padidinta iki 90 µg.

Visumoje infekcijos ir susirgimų dažnis, kurį sąlygojo gamtinė ekspozicija su cirkuliuojančiu epideminiu gripo viruso A (H3N2) kamieniu, buvo žymiai mažesnis tarp vakcinuotų asmenų negu tarp placebo recipientų. Duomenys leidžia prielaidą, kad apsauginis efektas, kurį sukėlė rHA0, ypač tais atvejais, kai buvo taikytas didesnėmis dozėmis, gali būti prilygintas arba yra aukštesnis už tą, kurį sąlygojo šiuolaikinės komercinės vakcinos.

Pavyzdys 11: Pagerinto HA0 klonavimo vektoriaus gavimo būdas

Pagerintas klonuojantis vektorius, skirtas subrendusio HA ekspresijai, lokalizuotas tuoj pat žemiau sekos, koduojančios chitinazės signalinį peptidą, buvo sukurtas.

Lentelė 4: Serumo antikūnų atsakas pas jaunus žmones, kurie buvo imunizuoti vakcinomis, į kurių sudėtį įeina išskirtas gripo viruso A/Pekinas/32/92 (H3N2) rekombinantinis hemagliutininas (rHAO), licenzinis trivalentinis subvirionas, turintis 15 gg kamieno A/Pekinas/32/92 (H3N2) HA, arba druskos tirpalo placebo.

Vakcinos (skaičius grupėje)	HAI antikūnai			ELISA IgG HA antikūnai		Neutralizuojantys antikūnai		
	HAI titrai		% su >4x padidėjimu	% su post > 1:32	ELISA titras	% su >4x padidėjimu	Mikroneutralizacijos titras	
	prieš	po			prieš	po	prieš	po
rHAO 15 µg (26)	3.7±0.3	9.0±0.6*	85	92	8.7±0.3	12.0±0.3	5.7±0.3	10.0±0.4
rHAO 15 µg + alūnas (26)	4.3±0.5	8.6±0.4*	88	100	9.4±0.4	11.5±0.4	6.4±0.4	9.3±0.2
rHAO 90 µg (26)	3.3±0.4	11.1±0.3	100	100	8.5±0.4	13.1±0.4	5.7±0.3	10.2±0.4
Licenzinis subvirionas (26)	3.7±0.4	9.3±0.5*	100	96	8.1±0.4	12.0±0.4	5.8±0.3	9.9±0.4
Placebo (24)	3.7±0.5	3.8±0.5#	0	38	9.1±0.3	9.1±0.3	5.3±0.4	5.4±0.4
								8

HAi, hemagliutinacijos inhibicija; HA, hemagliutininas; ELISA, imunofermentinės analizės metodas. Postvakcininiai serumų bandiniai buvo paimti praėjus 3 savaitėms po imunizacijos. Antikūnų titrai išreikšti kaip reciprokiniai vidurkiai $\log_2 \pm \text{SEM}$. Statistiniai palyginimai atlikti tarp tam tikros grupės postvakcininio HAI titro vidurkio ir tarp tos vakcininės grupės, kuri imunizuota 90 µg rHAO, analizuojant variavimą Dunnet testu, skirtu daugiabiniams palyginimams. *, $P < 0.01$; #, $P < 0.005$; #, $P < 0.01$.

Linijinė pMGS27 su vienasidėmis uodegomis buvo sukurta

Plazmidėje pMGS27 HA buvo klonuotas *Sma1* ar *Kpn1* vietoje žemiau tuoj už chitinazės signalinio peptido. Nukleino ir aminorūgščių sekos parodytos atitinkamai kaip SEQ ID No.22 ir SEQ ID No.23:

5' - chitinazės signalinis peptidas *Sma1* *Kpn1*
TGG TTG GTC GCC GTT TCT AAC GCG ATT CCC GGG GGT ACC
 TRP LEU VAL ALA VAL SER ASN ALA ILE PRO GLY GLY THR

Panaudojant oligo kryptingą mutagenę, pakeistas šis rajonas sukuriant pMGS27 (pakeistos bazės pabrauktos) (SEQ ID No. 24):

5'-
TGG TTA GTC GCC GTG TCCTGCAGGCCAGAGAGGCCTT GGT ACC
Pst1

Plazmidė pMGS27 paversta linijine panaudojant *Pst1*.

(SEQ ID No. 24 liekanos 6-35 parodytos):

A GTC GCC GTG TCC TGCA 5' GGCCAGAGAGCC T
 T CAG CGG CAC AGG 5' ACGTCCGGTCTCTCCGG A

ir po to linijinė pMGS27 paveikta T4 DNR polimeraze +dATF tam, kad būtų sintezuotos vienasidės uodegėlės, kaip tai parodyta žemiau (liekanos 23-36 ir SEQ ID No.24 komplementarios liekanos):

A 5' GGCCAGAGAGGCC T
 T CAG CGG CAC AGG 5' A

Tikslinis genas HA buvo klonuotas pMGS27

1 etapas. PGR pradmenys buvo sintezuoti.

Pradinis oligonukleotidas (SEQ ID No. 25):

5' GTC GCC GTG TCC AAC GGG (subrendusio HA 5' galo 20 bazių)

Reversinis oligonukleotidas (SEQ ID No.26 komplementarus):

(subrendusio HA 3' galo 20 bazių) ATT AA

CCGGTCTCTCCGG 5'

HA geno PGR

Tikslinio HA geno PGR atlikta panaudojant du oligonukleotidus tam, kad būtų gauta (SEQ ID No.25 ir SEQ ID No. 26):

5' GTC GCC GTG TCC AAC GCG (subrendęs HA)
 CAG CGG CAC AGG TTG CGC (subrendęs HA)
 TAA TTGGCCAGAGAGGCC 3'
 ATT AACCGGTCTCTCCGG

Tikslinio HA geno prijungimas prie pMGS ir *E. coli* transformacija

Sumaišomi linijinė pMGS27 ir T4 DNR polimeraze paveiktas HA geno fragmentas. Dvi molekulės prijungiamos viena prie kitos taip, kad susidarytų žiedinė plazmidė, kurią galima būtų panaudoti *E. coli* transformacijai. Diagramoje parodytas SEQ ID No. 25 ir 26, ir SEQ ID No. 24 liekanos 23-36 ir 6-18.

GTCGCCGTGTCCAACGCG (subrendęs HA) TAATT
 TTGCGC (subrendęs HA)
 ATTAACCGGTCTCTCCGG

+

A GGCCAGAGAGGCCT
 TCAGCGGCACAGG A

iki

Chitinazės signalinis peptidas stop

GTCGCCGTGTCCAACGCG (subrendęs HA) TAATTGGCCAGAGAGGCCT

Kaip parodyta aukščiau, čia nėra papildomų aminorūgščių tarp signalinio peptido ir subrendusio HA.

Pavyzdys 12: 1995-1996 metų trivalentės gripo viruso A ir B tipų vakcinos paruošimas ir efektyvumas.

Gripo viruso vakcina, išskirtas rekombinantinis hemagliutininas, trivalentė, tipai A ir B (A/Teksasas/36/92\1 (H1N1), A/Johanesburgas/33/94 (H3N2) ir B/Harbinas/7/94) yra neinfekcinis subvienetas, kilęs iš išskirto rekombinantinio gripo viruso hemagliutinino antigeno (HA). Naudojant aukščiau aprašytą būdą, buvo klonuoti A ir B kamienų gripo virusų, gautų iš Ligų Kontrolės Centro/Maisto ir vaistų administravimo, HA genai ir kiekvienas klonuotas genas buvo identifikuotas pagal sekų analizės duomenis. Bakuloviruso ekspresijos vektoriai, turintys gripo viruso kamienų A/Teksasas/36/91 (H1N1), A/Johanesburgas/33/94 (H3N2), B/Harbinas/7/94 klonuotus HA genus,

buvo panaudoti rekombinantinių HA antigenų produkcijai vabzdžių ląstelių kultūrose. Rekombinantiniai HA baltymai yra pilno ilgio, nesuskaidyti hemagliutininai (rHA0), jų molekulinė masė apie 69,000. rHA0 produkuoti *Spodoptera frugiperda* (Lepidopteran) ląstelių linijoje, augintoje beseruminėje terpėje. Trivalentės vakcinos sudarytos iš išvalytų (daugiau negu 95% ar net daugiau 99% grynumo) rHA, išskirtų iš dviejų gripo viruso A kamienų ir vieno B kamieno sumaišant juos lygiomis dalimis. Vakcina pateikiama klinikiniam naudojimui kaip išvalyti A ir B tipų rHA0 baltymai fosfatais užbuferintame druskos tirpale nepridedant konservanto.

Monovalentinės, bivalentinės ir trivalentinės rHA0 vakcinų eksperimentiniai tyrimai, atlikti su gyvuliukais, parodė, kad jos nepasižymi žymiu toksiškumu. Vakcinoje nestebėti toksiški ar atsitiktiniai agentai. A/Pekinas/32/92 ir A/Teksasas rHA0 saugumo ir imunogeniškumo tyrimai atlikti pelėse ir jūrų kiaulytėse. Nepastebėta pašalinių reakcijų. Pelėse, vienkartinė imunizacija panaudojant 15 mikrogramų rHA0 antigenų be adjuvanto, per dvi - tris savaites iššaukia anti-HA IgG antikūnų, hemagliutinino inhibicijos (HAI) antikūnų ir neutralizuojančių antikūnų aukštų lygių pasirodymą.

Viename tyrime, pelių grupės po 10 pelių buvo imunizuotos 15 mikrogramų išskirto A/Pekinas/32/92 (H3N2) rHA0, kuris buvo produkuotas vabzdžių ląstelių kultūroje, adaptuotoje augti beseruminėje terpėje (rHA-SF). Praėjus dviems - trimis savaitėms po injekcijos, pelės buvo nukraujinamos ir paruošiami serumo bandiniai. Serumuose įvertinti anti-HA IgG ir HAI antikūnai. Tiek rHA, tiek rHA0-SF antigenai sukėlė panašius anti-HA ir HAI antikūnų titrus. Praėjus dviems savaitėms po vienkartinės imunizacijos, daugumoje pelių pastebėti aukšti HAI antikūnų titrai, o trečią savaitę 8/10 pelių HAI titrai buvo 32 ar dar aukštesni. Šie ir kiti biocheminiai ir imunologiniai tyrimai rodo, kad rHA0, produkuotas beseruminėje vabzdžių ląstelių kultūroje, savo ypatumais nesiskiria nuo rHA, pagaminto fermentacinėse sąlygose terpėje su serumu.

Atliktas tyrimas, norint palyginti 1994-1995 metų trivalentės gripo vakcinos rHA0 vaistinę formą su licenzine išskirto viruso paviršiaus vakcina, Fluvirin® (atenuota gripo viruso vakcina, pagaminta kultivuojant kiaušiniuose). Į kiekvienos vakcinos sudėtį įėjo 15 mikrogramų rHA0 arba

po 0.5 ml gripo viruso kamienų Teksasas/36/91 (H1N1), A/Šangdongas/9/93 (H3N2) ir B/Panama/45/90 virusinio HA. Tiek rekombinantinis rHA0, tiek Fluvirin® vakcinos pateikiamos fosfatais užbuferintame druskos tirpale. Pelių grupės po 10 pelių buvo nukraujinamos praėjus 0, 2 ir 3 savaitėm po injekcijos ir paruošti serumo bandiniai. Serume įvertinti anti-HA IgG antikūnų, antikūnų, slopinančių virusus, auginamus kiaušiniuose, ir neutralizuojančių antikūnų, nukreiptų prieš įvairių kamienų virusus, auginamus kiaušiniuose, kiekiai.

Kaip parodyta Fig. 4a, 4b, ir 4c, tiek rekombinantinis rHA0, tiek licenzinės gripo vakcinos, sukėlė pasirodymą didelių kiekių serumo IgG antikūnų, nukreiptų prieš kiekvieno iš trijų vakcinos viruso kamienų hemagliutininus. Palyginus su licenzine vakcina, rHA0 vakcina sukėlė nuo 4 iki 10 kartų didesnius IgG antikūnų titrus. Kaip parodyta 5 lentelėje, pasigamino taip pat antikūnai, kurie slopino kamienų A ir B virusų sukeltą viščiukų eritrocitų hemagliutinaciją. Palyginus antikūnų kiekį, sukeltą po imunizacijos trivalente rHA0 vakcina, su kiekiu, atsiradusiu po imunizacijos licenzine vakcina, rasta kad pirmuoju atveju HAI titrai buvo ekvivalentiški arba aukštesni kiekvieno iš trijų viruso kamienų atžvilgiu. Vakcinos taip pat indukavo atsiradimą didelių kiekių antikūnų, nukreiptų prieš specifinius gripo viruso A ir B kamienus, nustatant juos standartiniu mikrotitro viruso neutralizacijos testu. Geometriniai neutralizuojančių antikūnų titrai buvo beveik du kartus aukštesni pas peles, kurios buvo imunizuotos rHA0, palyginus su pelėmis, imunizuotomis licenzine išskirto viruso paviršiaus vakcina, Fluvirin®. Šie duomenys rodo, kad rHA0 vakcinos trivalentinė vaisto forma, kurios pagrindą sudaro 1994-1995 metų viruso A ir B kamienai, yra ekvivalentinė arba net efektyvesnė už licenzinę subvienetinę gripo vakciną ir sukelia serume veiklius HAI ir neutralizuojančius antikūnus, nukreiptus prieš visus tris vakcinos viruso kamienus.

Čia aprašytų būdų ir sudėčių, naudotų ruošiant ir vartojant rekombinantinę gripo viruso vakciną, modifikacijos ir variacijos bus aiškos patyrusiems. Tokias modifikacijas ir variacijas ketinama paminėti pridedamose išradimo apibrėžtyse.

Lentelė 5. Trivalentinės rHA0 vakcinos palyginimas su Fluvirin®

Viruso kamienas, naudotas kaip antigenas	Trivalentinė rHA0 gripo vakcina (n=10)		Gripo vakcina Fluvirin® (n=10)	
	Anti-HA IgG		Anti-HA-IgG	
	0 savaitių	3 savaitės	0 savaitių	3 savaitės
A/Teksasas/36/91 (H1N1)	<1000	103,000	<1000	11,200
A/Šangdongas/32/92 (H3N2)	<1000	162,400	<1000	41,000
B/Panama/45/90	<1000	164,800	<1000	26,000
Viruso kamienas, naudotas kaip antigenas	HAI		HAI	
A/Teksasas/36/91 (H1N1)	<8	1,522	<8	1,088
A/Šangdongas/32/92 (H3N2)	<8	494	<8	435
B/Panama/45/90	<8	174	<8	42
Viruso kamienas, naudotas kaip antigenas	Neutralizuojantys antikūnai		Neutralizuojantys antikūnai	
A/Teksasas/36/91 (H1N1)	<100	5,800	<100	2,700
A/Šangdongas/32/92 (H3N2)	<100	840	<100	360
B/Panama/45/90	<100	1,300	<100	700

SEKŲ SĄRAŠAS

(1) BENDRA INFORMACIJA:

(I) PATEIKĖJAS: MicroGeneSys, Inc.

(II) IŠRADIMO PAVADINIMAS: GRIPO HEMAGLIUTININO
MULTIVALENTINIŲ VAKCINŲ GAMYBOS BŪDAS

(III) SEKŲ SKAIČIUS: 32

(IV) KORESPONDENCINIS ADRESAS :

(A) ADRESANTAS: Patrea L. Pabst

(B) GATVĖ: 2800 One Atlantic Center
1201 West Peachtree Street

(C) MIESTAS: Atlanta

(D) VALSTIJA: GA

(E) VALSTYBĖ: JAV

(F) KODAS: 3039-3450

(V) KOMPIUTERINĖ VERSIJA:

(A) IŠORINĖ ATMINTIS: diskelis

(B) KOMPIUTERIS: IBM PC suderinamas

(C) OPERACINĖ SISTEMA: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMINĖ ĮRANGA: PatentIn Release # 1.0, versija #1.25

(vi) DABARTINIAI PARAIŠKOS DUOMENYS:

(A) PARAIŠKOS NUMERIS: PCT/US95/06750

(B) UŽPILDYMO DATA: 26-GEGUŽĖ-1995

(C) KLASIFIKACIJA:

(ix) TELEKOMUNIKACINĖ INFORMACIJA:

(A) TELEFONAS: (404) -873-8794

(B) TELEFAKSAS: (404) -873-8795

(1) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 1:

(I) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 12 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasidulė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(iii) HIPOTETINĖ: NE

(iv) ANTISENSINĖ: NE

(vi) PRADINIS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: gripo virusas

(x) PUBLIKACIJOS DUOMENYS:

(A) AUTORIAI: Davis ir kt.

(B) PAVADINIMAS: Bakterinio klonu, turinčio gripo viruso WSN kamieno
(H0N1) hemagliutinino geną, konstravimas ir apibūdinimas.

(C) ŽURNALAS: Gene

(D) TOMAS: 10

(E) PUSLAPIAI: 205-218

(F) DATA: 1980

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 1:

AGCAAAAGCA GG

- (2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 2:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
(A) ILGIS: 39 bazių porų
(B) TIPAS: nukleino rūgštis
(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasidulė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė
(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)
(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 2:

GGGGGTACCC CCGGGAGCAA AAGCAGGGGA AAATAAAAA

- (2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 3:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
(A) ILGIS: 35 bazių porų
(B) TIPAS: nukleino rūgštis
(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasidulė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė
(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)
(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 3:

CCCGGTACCT CAKATKCATA TTCTGCACTG CAAAG

- (2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 4:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
(A) ILGIS: 39 bazių porų
(B) TIPAS: nukleino rūgštis
(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasidulė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė
(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)
(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 4:

GGGGGTACCC CCCCCACAC AATATGTATA GGCTACCAT

- (2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 5:
(xi) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
(A) ILGIS: 35 bazių porų
(B) TIPAS: nukleino rūgštis
(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasidulė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė
(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)
(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 5:

CCCGGTACCT CAKATKCATA TTCTGCACTG CAAAG

- (2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 6:
(xi) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
(A) ILGIS: 1793 bazių porų
(B) TIPAS: nukleino rūgštis
(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasidulė

- (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)
 (iii) HIPOTETINĖ: NE
 (iv) ANTISENSINĖ: NE
 (vi) PRADINIS ŠALTINIS:
 (B) ORGANIZMAS: gripo virusas
 (C) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: A/Pekinas/32/92/rHA
 (ix) YPATUMAS
 (A) VARDAS/RAKTAS: polihedrino mRNR lyderinė (dalinė)
 (B) BUVIMO VIETA: 1 iki 18
 (ix) YPATUMAS
 (A) VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis AcNPV 61K baltymo signalinę
 seką
 (B) BUVIMO VIETA: 19 iki 72
 (ix) YPATUMAS
 (A) VARDAS/RAKTAS: Smal restrikcijos saitas
 (B) BUVIMO VIETA: 76 iki 81
 (ix) YPATUMAS
 (A) VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis subrendusį rHA
 (B) BUVIMO VIETA: 73 iki 1728
 (ix) YPATUMAS
 (A) VARDAS/RAKTAS: KpnI restrikcijos saitas
 (B) BUVIMO VIETA: 1771 iki 1777
 (ix) YPATUMAS
 (A) VARDAS/RAKTAS: BglII restrikcijos saitas
 (B) BUVIMO VIETA: 1776 iki 1782
 (ix) YPATUMAS
 (A) VARDAS/RAKTAS: universalus transliacijos terminacijos signalas
 (B) BUVIMO VIETA: 1783 iki 1793
 (xi) SEKOS APRAYMAS: SEQ ID N: 6:

```

TAAAAAACC   TATAAATAAT   GCCCTTGTAC   AAATTGTTAA
ACGTTTTGTG   GTTGGTCGCC   GTTCTAACG   CGATTCCCGG
GGACTTTCCA   GGAAATGACA   ACAGCACAGC   AACGCTGTGC

```

CTGGGACATC ATGCAGTGCC AAACGGAACG CTAGTGAAAA CAATCACGAA TGATCAAATT	180
GAAGTGAATA ATGCTACTGA GCTGGTTCAG AGTTCCTCAA CAGGTAGAAT ATGCGACAGT	240
CCTCACCGAA TCCTTGATGG AAAAACTGC AACTGATAG ATGCTCTATT GGGAGACCCT	300
CATTGTGATG GCTTCCAAAA TAAGGAATGG GACCTTTTTG TTGAACGCAG CAAAGCTTAC	360
AGCAACTGTT ACCCTTATGA TGTACCGGAT TATGCCTCCC TTAGGTCACT AGTTGCCTCA	420
TCAGGCACCC TGGAGTTTAT CAATGAAGAC TTCAATTGGA CTGGAGTCGC TCAGGATGGG	480
GGAAGCTATG CTTGCAAAAG GGGATCTGTT AACAGTTTCT TTAGTAGATT GAATTGGTTG	540
CACAAATCAG AATACAAATA TCCAGCGCTG AACGTGACTA TGCCAAACAA TGGCAAATTT	600
GACAAATTGT ACATTTGGGG GGTTCACCAC CCGAGCACGG ACAGAGACCA AACCAGCCTA	660
TATGTTTCGAG CATCAGGGAG AGTCACAGTC TCTACCAAAA GAAGCCAACA AACTGTAACC	720
CCGAATATCG GGTCTAGACC CTGGGTAAGG GGTCACTCCA GTAGAATAAG CATCTATTGG	780
ACAATAGTAA AACCAGGAGA CATACTTTTG ATTAATAGCA CAGGGAATCT AATTGCTCCT	840
CGGGGTTACT TCAAAATACG AAATGGGAAA AGCTCAATAA TGAGGTCAGA TGCACCCATT	900
GGCACCTGCA GTTCTGAATG CATCACTCCA AATGGAAGCA TTCCCAATGA CAAACCTTTT	960
CAAAATGTAA ACAGGATCAC ATATGGGGCC TGCCCCAGAT ATGTTAAGCA AAACACTCTG	1020
AAATTGGCAA CAGGGATGCG GAATGTACCA GAGAAACAAA CTAGAGGCAT ATTCGGCGCA	1080
ATCGCAGGTT TCATAGAAAA TGGTTGGGAG GGAATGGTAG ACGGTTGGTA CGGTTTCAGG	1140
CATCAAAATT CTGAGGGCAC AGGACAAGCA GCAGATCTTA AAAGCACTCA AGCAGCAATC	1200
GACCAAATCA ACGGGAAACT GAATAGGTTA ATCGAGAAAA CGAACGAGAA ATTCCATCAA	1260
ATCGAAAAAG AATTCTCAGA AGTAGAAGGG AGAATTCAGG ACCTCGAGAA ATATGTTGAA	1320
GACACTAAAA TAGATCTCTG GTCTTACAAC GCGGAGCTTC TTGTTGCCCT GGAGAACCAA	1380
CATACAATTG ATCTAACTGA CTCAGAAATG AACAACTGT TTGAAAAAC AAGGAAGCAA	1440
CTGAGGGAAA ATGCTGAGGA CATGGGCAAT GGTGCTTCA AAATATACCA CAAATGTGAC	1500
AATGCCTGCA TAGGGTCAAT CAGAAATGGA ACTTATGACC ATGATGTATA CAGAGACGAA	1560
GCATTAAACA ACCGGTTCCA GATCAAAGGT GTTGAGCTGA AGTCAGGATA CAAAGATTGG	1620
ATCCTATGGA TTTCCTTTC CATATCATGC TTTTGTCTTT GTGTTGTTTT GCTGGGGTTC	1680
ATCATGTGGG CCTGCCAAAA AGGCAACATT AGGTGCAACA TTTGCATTG AGTGTATTAA	1740
TTAAAAACAC CCTTGTTTCT AGGATGATTC GGTACCAGAT CTTAATTAAT TAA	1793

DUOMENYS APIE SEQ ID No: 7:

(xii) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 570 bazių porų

(B) TIPAS: aminorūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienas

(D) TOPOLOGIJA: linjinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(iii) HIPOTETINĖ: NE

(iv) ANTISENSINĖ: NE

(v) FRAGMENTO TIPAS: N-terminalinis

(vi) PRADINIS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: gripo virusas

(C) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: A/Pekinas/32/92/rHA

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: AcNPV 61K baltymo signalinė seka

(B) BUVIMO VIETA: 1 iki 18

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: subrendęs rHA

(B) BUVIMO VIETA: 19 iki 552

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 7:

Met	Pro	Leu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Val	Leu	Trp	Leu	Val	Ala	Val	Ser
1				5					10					15	
Asn	Ala	Ile	Pro	Gly	Asp	Phe	Pro	Gly	Asn	Asp	Asn	Ser	Thr	Ala	Thr
		20						25					30		
Leu	Cys	Leu	Gly	His	His	Ala	Val	Pro	Asn	Gly	Thr	Leu	Val	Lys	Thr
		35					40					45			
Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	Ile	Glu	Val	Thr	Asn	Ala	Thr	Glu	Leu	Val	Gln
	50					55					60				
Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Arg	Ile	Cys	Asp	Ser	Pro	His	Arg	Ile	Leu	Asp
65					70					75				80	
Gly	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro	His	Cys
				85					90					95	
Asp	Gly	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	Trp	Asp	Leu	Phe	Val	Glu	Arg	Ser	Lys
			100					105					110		
Ala	Tyr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser	Leu
		115					120					125			
Arg	Ser	Leu	Val	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu	Asp
	130						135				140				
Phe	Asn	Trp	Thr	Gly	Val	Ala	Gln	Asp	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Cys	Lys
145					150					155				160	
Arg	Gly	Ser	Val	Asn	Ser	Phe	Phe	Ser	Arg	Leu	Asn	Trp	Leu	His	Lys
				165					170					175	
Ser	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Ala	Leu	Asn	Val	Thr	Met	Pro	Asn	Asn	Gly
			180					185					190		
Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Val	His	His	Pro	Ser	Thr	Asp
	195						200					205			
Arg	Asp	Gln	Thr	Ser	Leu	Tyr	Val	Arg	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Thr	Val
	210					215					220				
Ser	Thr	Lys	Arg	Ser	Gln	Gln	Thr	Val	Thr	Pro	Asn	Ile	Gly	Ser	Arg
225					230					235				240	
Pro	Trp	Val	Arg	Gly	Gln	Ser	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Tyr	Trp	Thr	Ile
				245					250					255	
Val	Lys	Pro	Gly	Asp	Ile	Leu	Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Gly	Asn	Leu	Ile
			260					265					270		
Ala	Pro	Arg	Gly	Tyr	Phe	Lys	Ile	Arg	Asn	Gly	Lys	Ser	Ser	Ile	Met
		275					280					285			
Arg	Ser	Asp	Ala	Pro	Ile	Gly	Thr	Cys	Ser	Ser	Glu	Cys	Ile	Thr	Pro
	290					295					300				
Asn	Gly	Ser	Ile	Pro	Asn	Asp	Lys	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	Asn	Arg	Ile
305					310					315				320	
Thr	Tyr	Gly	Ala	Cys	Pro	Arg	Tyr	Val	Lys	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu
				325					330					335	
Ala	Thr	Gly	Met	Arg	Asn	Val	Pro	Glu	Lys	Gln	Thr	Arg	Gly	Ile	Phe
		340					345						350		
Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Val	Asp
		355					360					365			
Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Arg	His	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Thr	Gly	Gln	Ala
	370					375						380			
Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	Gln	Ala	Ala	Ile	Asp	Gln	Ile	Asn	Gly	Lys
	385					390				395				400	
Leu	Asn	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Thr	Asn	Glu	Lys	Phe	His	Gln	Ile	Glu
			405						410					415	
Lys	Glu	Phe	Ser	Glu	Val	Glu	Gly	Arg	Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Lys	Tyr
			420					425					430		
Val	Glu	Asp	Thr	Lys	Ile	Asp	Leu	Trp	Ser	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu
		435					440						445		

```

Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met
  450                               455                               460
Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu
  465                               470                               475                               480
Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala
                               485                               490                               495
Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg
                               500                               505                               510
Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys
                               515                               520                               525
Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys
                               530                               535                               540
Phe Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln
  545                               550                               555                               560
Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
                               565                               570

```

DUOMENYS APIE SEQ ID No: 8:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 1766 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasitūlė

(D) TOPOLOGJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(iii) HIPOTETINĖ: NE

(iv) ANTISENSINĖ: NE

(v) FRAGMENTO TIPAS: N-terminalinis

(vi) PRADINIS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: gripo virusas

(B) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: A/Teksasas/36/91/rHA

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: polihedrino mRNR lyderinė (dalinė)

(B) BUVIMO VIETA: 1 iki 18

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis AcNPV 61K baltymo signalinį peptidą

(B) BUVIMO VIETA: 19 iki 72

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: SmaI restrikcijos saitas

(B) BUVIMO VIETA: 76 iki 81

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: KpnI restrikcijos saitas

(B) BUVIMO VIETA: 82 iki 87

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: SmaI restrikcijos saitas

(B) BUVIMO VIETA: 88 iki 93

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis subrendusį rHA

(B) BUVIMO VIETA: 73 iki 1734

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: KpnI restrikcijos saitas

(B) BUVIMO VIETA: 1744 iki 1749

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: BglII restrikcijos saitas

(B) BUVIMO VIETA: 1750 iki 1755

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: universalus transliacijos terminacijos signalas

(B) BUVIMO VIETA: 1756 iki 1766

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 8:

```

TAAAAAACC TATAATAAT GCCCTGTGAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC      60
GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGGTACCCCC GGGGACACAA TATGTATAGG CTACCATGCG      120
AACAACTCAA CCGACACTGT TGACACAGTA CTTGAGAAGA ACGTGACAGT GACACACTCT      180
GTCAACCTAC TTGAGGACAG TCACAACGGA AAATATGTC GACTAAAGGG AATAGCCCCA      240

```

CTACAATTGG GTAATTGCAG CGTTGCCGGA TGGATCTTAG GAAACCCAAA ATGCGAATCA	300
CTGTTTTCTA AGGAATCATG GTCCTACATT GCAGAAACAC CAAACCCTGA GAATGGAACA	360
TGTTACCCAG GGTATTTTCGCG CACTATGAG GAACTGAGGG AGCAATTGAG TTCAGTATCA	420
TCATTCGAGA GATTCGAAAT ATTCCCCAAA GAAAGCTCAT GGCCCAACCA CACCGTAACC	480
AAAGGAGTAA CGAGATCATG CTCCCATAAAT GGGAAAAGCA GTTTTTACAG AAATTTGCTA	540
TGGCTGACGG AGAAGAATGG CTTGTACCCA AATCTGAGCA AGTCCTATGT AAACAACAAA	600
GAGAAAGAAG TCCTTGTAAT ATGGGGTGTT CATCACCCGT CTAACATAAG GGACCAAAGG	660
GCCATCTATC ATACAGAAAA TGCTTATGTC TCTGTAGTGT CTTACATTA TAGCAGAAGA	720
TTCACCCCAG AAATAGCAAA AAGACCCAAA GTAAGAGATC AAGAAGGAAG AATTAACACT	780
TACTGGACTC TGCTGGAACC CGGGGACACA ATAATATTTG AGGCAAATGG AAATCTAATA	840
GCGCCATGGT ATGCTTTTCGCG ACTGAGTAGA GGCTTTGGGT CAGGAATCAT CACCTCAAAC	900
GCATCAATGG ATGAATGTGA CGCGAAGTGT CAAACACCCC AGGGAGCTAT AAACAGTAGT	960
CTTCCTTTCC AGAATGTACA CCCAGTCACA ATAGGAGAGT GTCCAAAGTA TGTCAGGAGT	1020
ACAAAATTAA GGATGGTTAC AGGACTAAGG AACATCCCAT CCATTCAATC CAGAGGTTTG	1080
TTTGAGCCA TTGCCGTTT CATTGAAGGG GGGTGGACTG GAATGATAGA TGGATGGTAT	1140
GGTTATCATC ATCAGAATGA ACAAGGATCT GGCTATGCTG CGGACCAAAA AAGCACACAA	1200
AATGCCATTA ACGGGATTAC AAACAAGGTG AATTCTGTAA TCGAGAAAAT GAACACTCAA	1260
TTCACAGCTG TGGGCAAAGA ATTCAACAAA TTAGAAAGAA GGATGGAAAA CTAAATAAAA	1320
AAAGTTGATG ATGGATTCTT GGACATTTGG ACATATAATG CAGAATTGTT GGTCTACTG	1380
GAAAATGGAA GGACTTTGGA TTTTCATGAC TCAAATGTGA AGAATCTGTA TGAGAAAGTA	1440
AAAAGCCAAT TGAAGAATAA TGCCAAAGAA ATAGGGAACG GGTGTTTTGA ATTCTATCAC	1500
AAGTGTAACA ATGAATGCAT GGAAAGTGTG AAAAATGGAA CTTATGACTA TCCAAAATAT	1560
TCCGAAGAAT CAAAGTTAAA CAGGGGAAAA ATTGATGGAG TGAAATTGGA ATCAATGGGA	1620
GTCTATCAGA TTCTGGCGAT CTAATCAACT GTCGCCAGTT CACTGGTGCT TTTGGTCTCC	1680
CTGGGGGCAA TCAGCTTCTG GATGTGTTCT AATGGGTCTT TGCAGTGCAG AATATGAATC	1740
TGAGGTACCA GATCTTAATT AATTAA	1766

DUOMENYS APIE SEQ ID No: 9:

(vii) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 572 bazių porų

(B) TIPAS: aminorūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasitūlė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(viii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(ix) HIPOTETINĖ: NE

(x) ANTISENSINĖ: NE

(xi) FRAGMENTO TIPAS: N-terminalinis

(xii) PRADINIS ŠALTINIS:

(B) ORGANIZMAS: gripo virusas

(B) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: A/Teksasas/36/91/rHA

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: AcNPV 61K baltymo signalinė seka

(B)BUVIMO VIETA: 1 iki 18

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: subrendes rHA

(B)BUVIMO VIETA: 19 iki 554

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 9:

Met	Pro	Leu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Val	Leu	Trp	Leu	Val	Ala	Val	Ser
1				5					10					15	
Asn	Ala	Ile	Pro	Gly	Gly	Thr	Pro	Gly	Asp	Thr	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr
			20					25					30		
His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Asp	Thr	Val	Asp	Thr	Val	Leu	Glu	Lys	Asn
		35					40					45			
Val	Thr	Val	Thr	His	Ser	Val	Asn	Leu	Leu	Glu	Asp	Ser	His	Asn	Gly
	50					55				60					
Lys	Leu	Cys	Arg	Leu	Lys	Gly	Ile	Ala	Pro	Leu	Gln	Leu	Gly	Asn	Cys
65					70				75					80	
Ser	Val	Ala	Gly	Trp	Ile	Leu	Gly	Asn	Pro	Lys	Cys	Glu	Ser	Leu	Phe
			85					90						95	
Ser	Lys	Glu	Ser	Trp	Ser	Tyr	Ile	Ala	Glu	Thr	Pro	Asn	Pro	Glu	Asn
			100					105					110		
Gly	Thr	Cys	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Phe	Ala	Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu
		115					120					125			
Gln	Leu	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys
	130					135					140				
Glu	Ser	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Thr	Val	Thr	Lys	Gly	Val	Thr	Arg	Ser
145					150					155				160	
Cys	Ser	His	Asn	Gly	Lys	Ser	Ser	Phe	Tyr	Arg	Asn	Leu	Leu	Trp	Leu
			165						170					175	
Thr	Glu	Lys	Asn	Gly	Leu	Tyr	Pro	Asn	Leu	Ser	Lys	Ser	Tyr	Val	Asn
		180						185					190		
Asn	Lys	Glu	Lys	Glu	Val	Leu	Val	Leu	Trp	Gly	Val	His	His	Pro	Ser
	195						200					205			
Asn	Ile	Arg	Asp	Gln	Arg	Ala	Ile	Tyr	His	Thr	Glu	Asn	Ala	Tyr	Val
	210					215					220				
Ser	Val	Val	Ser	Ser	His	Tyr	Ser	Arg	Arg	Phe	Thr	Pro	Glu	Ile	Ala
225					230					235				240	
Lys	Arg	Pro	Lys	Val	Arg	Asp	Gln	Glu	Gly	Arg	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Trp
			245						250					255	
Thr	Leu	Leu	Glu	Pro	Gly	Asp	Thr	Ile	Ile	Phe	Glu	Ala	Asn	Gly	Asn
		260						265					270		
Leu	Ile	Ala	Pro	Trp	Tyr	Ala	Phe	Ala	Leu	Ser	Arg	Gly	Phe	Gly	Ser
	275					280						285			
Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Asn	Ala	Ser	Met	Asp	Glu	Cys	Asp	Ala	Lys	Cys
	290					295					300				
Gln	Thr	Pro	Gln	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser	Leu	Pro	Phe	Gln	Asn	Val
305					310					315				320	
His	Pro	Val	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys	Tyr	Val	Arg	Ser	Thr	Lys
		325							330					335	
Leu	Arg	Met	Val	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ile	Pro	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg
		340						345					350		
Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Thr	Gly
		355					360					365			
Met	Ile	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	His	His	Gln	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser
	370					375					380				
Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Gln	Lys	Ser	Thr	Gln	Asn	Ala	Ile	Asn	Gly	Ile
385					390					395				400	
Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Val	Ile	Glu	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Thr
			405						410					415	
Ala	Val	Gly	Lys	Glu	Phe	Asn	Lys	Leu	Glu	Arg	Arg	Met	Glu	Asn	Leu
			420					425					430		
Asn	Lys	Lys	Val	Asp	Asp	Gly	Phe	Leu	Asp	Ile	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala
		435					440					445			
Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Glu	Asn	Gly	Arg	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Asp
		450				455					460				
Ser	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Tyr	Glu	Lys	Val	Lys	Ser	Gln	Leu	Lys	Asn
465					470					475				480	

```

Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys
                        485                        490                        495
Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro
                        500                        505                        510
Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Gly Lys Ile Asp Gly Val
                        515                        520                        525
Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr
                        530                        535                        540
Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe
545                        550                        555                        560
Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile
                        565                        570

```

DUOMENYS APIE SEQ ID No: 10:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 1799 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasiuolė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: RNR (genominė)

(iii) HIPOTETINĖ: NE

(iv) ANTISENSINĖ: NE

(vii) PRADINIS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: gripo virusas

(B) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: B/Panama/45/90 rHA

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: polihedrino mRNR lyderis (dalinis)

(B) BUVIMO VIETA: 1 iki 18

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis HA signalinio peptido seka

(B) BUVIMO VIETA: 19 iki 69

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: SmaI restrikcijos saitas

(B) BUVIMO VIETA: 22 iki 27

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis subrendusį rHA

(B) BUVIMO VIETA: 70 iki 1773

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: KpnI restrikcijos saitas

(B) BUVIMO VIETA: 1777 iki 1782

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: BglII restrikcijos saitas

(B) BUVIMO VIETA: 1783 iki 1788

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: universalus transliacijos terminacijos signalas

(B) BUVIMO VIETA: 1789 iki 1799

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 10:

```

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCGGGAAG GCAATAATTG TACTACTCAT GGTAGTAACA      60
TCCAACGCAG ATCGAATCTG CACTGGGATA ACATCTTCAA ACTCACCTCA TGTGGTCAAA      120
ACAGCTACTC AAGGGGAAGT CAATGTGACT GGTGTGATAC CACTGACAAC AACACCAACA      180
AAATCTCATT TTGCAAATCT AAAAGGAACA AAGACCAGAG GGAAACTATG CCCAAACTGT      240
CTCAACTGCA CAGATCTGGA TGTGGCCTTG GGCAGACCAA TGTGTGTGGG GACCACACCT      300
TCGGCAAAAG CTTCAATACT CCACGAAGTC AGACCTGTTA CATCCGGGTG CTTTCCTATA      360
ATGCACGACA GAACAAAAAT CAGACAGCTA CCAATCTTC TCAGAGGATA TGAAAATATC      420
AGATTATCAA CCCAAAACGT TATCAACGCA GAAAGAGCAC CAGGAGGACC CTACAGACTT      480
GGAACCTCAG GATCTTGCCC TAACGTTACC AGTAGAGACG GATTCTTCGC AACAAATGGCT      540

```

TGGGCTGTCC CAAGGGACAA CAAAACAGCA ACGAATCCAC TAACAGTAGA AGTACCATAC 600
 ATTTGTACCA AAGGAGAAGA CCAAATTACT GTTTGGGGGT TCCATTCTGA TAACAAAATC 660
 CAAATGAAAA ACCTCTATGG AGACTCAAAT CCTCAAAAGT TCACCTCATC TGCCAATGGA 720
 GTAACCACAC ATTATGTTTC TCAGATTGGT GGCTTCCCAA ATCAAACAGA AGACGGAGGG 780
 CTACCACAAA GCGGCAGAAT TGTGTTGAT TACATGGTGC AAAACCTGG GAAAACAGGA 840
 ACAATTGTCT ATCAAAGAGG TGTTTTGTTG CCTCAAAAGG TGTGGTGCGC AAGTGGCAGG 900
 AGCAAGGTAA TAAAAGGGTC CTTGCCTTTA ATTGGTGAAG CAGATTGCCT TCACGAAAAA 960
 TACGGTGGAT TAAACAAAAG CAAGCCTTAC TACACAGGAG AACATGCAAA AGCCATAGGA 1020
 AATTGCCCAA TATGGGTGAA AACACCTTTG AAGCTTGCCA ATGGAACCAA ATATAGACCT 1080
 CCTGCAAAAC TATTAAAGGA AAGGGGTTTC TTCGGAGCTA TTGCTGGTTT CTTAGAAGGA 1140
 GGATGGGAAG GAATGATTGC AGGTTGGCAC GGATACACAT CTCATGGAGC ACATGGAGTG 1200
 GCAGTGGCAG CAGACCTTAA GAGTACGCAA GAAGCCATAA ACAAGATAAC AAAAAATCTC 1260
 AATTCTTTGA GTGAGCTAGA AGTAAAGAAT CTTCAAAGAC TAAGTGGTGC CATGGATGAA 1320
 CTCCACAACG AAATACTCGA GCTGGATGAG AAAGTGGATG ATCTCAGAGC TGACACAATA 1380
 AGCTCGCAA TAGAGCTTGC AGTCTTGCTT TCCAACGAAG GAATAATAAA CAGTGAAGAT 1440
 GAGCATCTAT TGGCACTTGA GAGAAAACTA AAGAAAATGC TGGGTCCCTC TGCTGTAGAC 1500
 ATAGGGAATG GATGCTTCGA AACCAAACAC AAGTGCAACC AGACCTGCTT AGACAGGATA 1560
 GCTGCTGGCA CCTTTAATGC AGGAGAATTT TCTCTCCCA CTTTTGATTC ACTGAATATT 1620
 ACTGCTGCAT CTTTAAATGA TGATGGATTG GATAATCATA CTATACTGCT CTACTACTCA 1680
 ACTGCTGCTT CTAGTTTGGC TGTAACATTG ATGATAGCTA TTTTATTGT TTATATGGTC 1740
 TCCAGAGACA ATGTTTCTTG TTCCATCTGT CTGTGAGGTA CCAGATCTTA ATTAATTAA 1799

DUOMENYS APIE SEQ ID No: 11:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 585 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasilė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(iii) HIPOTETINĖ: NE

(iv) ANTISENSINĖ: NE

(v) FRAGMENTO TIPAS: N-terminalinis

(vi) PRADINIS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: gripo virusas

(C) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: B/Panama/45/90 rHA

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTASHA signal peptide

(B) BUVIMO VIETA: 1 to 17

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: subrendęs rHA)

(B) BUVIMO VIETA: 18 iki 568

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 11:

Met Pro Gly Lys Ala Ile Ile Val Leu Leu Met Val Val Thr Ser Asn
 1 5 10 15
 Ala Asp Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val
 20 25 30

Val Lys Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro
 35 40 45
 Leu Thr Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr
 50 55 60
 Lys Thr Arg Gly Lys Leu Cys Pro Asn Cys Leu Asn Cys Thr Asp Leu
 65 70 75 80
 Asp Val Ala Leu Gly Arg Pro Met Cys Val Gly Thr Thr Pro Ser Ala
 85 90 95
 Lys Ala Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe
 100 105 110
 Pro Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu
 115 120 125
 Arg Gly Tyr Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr Gln Asn Val Ile Asn Ala
 130 135 140
 Glu Arg Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys
 145 150 155 160
 Pro Asn Val Thr Ser Arg Asp Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala
 165 170 175
 Val Pro Arg Asp Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu Thr Val Glu Val
 180 185 190
 Pro Tyr Ile Cys Thr Lys Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly Phe
 195 200 205
 His Ser Asp Asn Lys Ile Gln Met Lys Asn Leu Tyr Gly Asp Ser Asn
 210 215 220
 Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr Val
 225 230 235 240
 Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asn Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu Pro
 245 250 255
 Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln Lys Pro Gly Lys
 260 265 270
 Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Val Leu Leu Pro Gln Lys Val
 275 280 285
 Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro Leu
 290 295 300
 Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn Lys
 305 310 315 320
 Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn Cys
 325 330 335
 Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys Tyr
 340 345 350
 Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile
 355 360 365
 Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile Ala Gly Trp His
 370 375 380
 Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val Ala Ala Asp Leu
 385 390 395 400
 Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys Asn Leu Asn Ser
 405 410 415
 Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu Ser Gly Ala Met
 420 425 430
 Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu Lys Val Asp Asp
 435 440 445
 Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu
 450 455 460
 Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His Leu Leu Ala Leu
 465 470 475 480
 Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala Val Asp Ile Gly
 485 490 495

 Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln Thr Cys Leu Asp
 500 505 510
 Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe Ser Leu Pro Thr
 515 520 525
 Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn Asp Asp Gly Leu
 530 535 540
 Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala Ala Ser Ser Leu
 545 550 555 560

DUOMENYS APIE SEQ ID No: 12:

(i)SEKOS CHARACTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 1811 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) STĪLŲ SKAIČIUS: vienasiūle

(D) TOPOLOGJA: linijine

(ii) MOLEKULÈS TIPAS: DNR (genomine)

(iii) HIPOTETINÈ: NE

(iv) ANTISENSINE: NE

(vi)PRADINIS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: gripo virusas

(B) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: B/Nyderlandai/13/94 rHA

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: polihedrino mRNR lyderis (dalinis)

(B) BUVTMO VIETA: 1 iki 18

(ix) YPATUMAS

A) VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis AcNPV 61K baltymo signalinę seką

B)BUVIMO VIETA: 19 iki 72

ix) YPATUMAS

A)VARDAS/RAKTAS: Smaī restrikcijas saitas

B)BUVIMO VIETA: 76 iki 81

ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis subrendusį rHA

B)BUVIMO VIETA: 73 iki 1785

(x) YPATUMAS

A) VARDAS/RAKTAS: KpnI restrikcijas saitas

B)BUVTMO VIETA: 1789 iki 1794

x) YPATUMAS

A) VARDAS/RAKTAS: Bgl II restrikcijas saitas

3)BUVIMO VIETA: 1795 iki 1800

x) YPATUMAS

0) VARDAS/RAKTAS: universalus transliacijos terminacijos signalas

3)BUVIMO VIETA: 1801 iki 1811

ki) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 12

TAAAAAAACC	TATAAATAAT	GCCCTTGTAC	AAATTGTTAA	ACGTTTGTG	GTTGGTCGCC	60
GTTTCTAACG	CGATTCCCGG	GGATCGAATC	TGCACTGGGA	TAACATCTTC	AAAATCACCT	120
CATGTAGTCA	AAACAGCTAC	TCAAGGGGAG	GTCAATGTGA	CTGGTGTGAT	ACCACTGACG	180
ACAACACCAA	CAAAATCTCA	TTTTGCAAAT	CTCAAAGGAA	CAAAGACCAG	AGGGAAACTA	240
TGCCCCAACT	GTCTCAACTG	CACAGATCTG	GATGTGGCCT	TGGGCAGACC	AATGTGTGTG	300
GGGATCACAC	CTTCGGCAA	AGCTTCAATA	CTCCACGAAG	TCAGACCTGT	TACATCCGGG	360
TGCTTTCCTA	TAATGCATGA	CAGAACAAAA	ATCAGACAGC	TACCCAATCT	TCTCAGAGGA	420
TATGAAAACA	TCAGACTATC	AACCCAAAAC	GTTATCAACG	CAGAAAAGGC	ACCAGGAGGA	480
CCCTACAGAC	TTGGAACCTC	AGGATCTTGC	CCTAACGTTA	CCAGTAGAAC	CGGATTCTTC	540
GCAACAATGG	CTTGGGCTGT	CCCAAGGGAC	AACAAAACAG	CAACGAATCC	ACTAACAGTA	600
GAAGTACCAT	ACATTTGTAC	GAAAGGAGAA	GACCAAATTA	CTGTTTGGGG	GTTCCATTCT	660
GATAACAAAA	CCCAAATGAA	AAACCTCTAT	GGAGACTCAA	ATCCTCAAAA	G TTCACCTCA	720
TCTGCCAATG	GAGTAACCAC	ACATTATGTT	TCTCAGATTG	GTGGCTTCCC	AGATCAAACA	780

GAAGACGGAG GACTACCACA AAGCGGCAGA ATTGTTGTTG ATTACATGGT GCAAAAACCT	840
GGGAAAACAG GAACAATTGT CTATCAAAGA GGTATTTTGT TGCCTCAAAA GGTGTGGTGC	900
GCAAGTGGCA GGAGCAAGGT AATAAAGGG TCCTTGCCCTT TAATTGGTGA AGCAGATTGC	960
CTTCACGAAA AATACGGTGG ATTAAACAAA AGCAAGCCTT ACTACACAGG AGAACATGCA	1020
AAAGCCATAG GAAATTGCCC AATATGGGTG AAAACACCTT TGAAGCTTGC CAATGGAACC	1080
AGATATAGAC CTCCTGCAAA ACTATTAAAG GAAAGGGGTT TCTTCGGAGC TATTGCTGGT	1140
TTCTTAGAAG GAGGATGGGA AGGAATGATT GCAGGTTGGC ACGGATACAC ATCTCACGGG	1200
GCACATGGAG TGGCAGTGGC AGCAGACCTT AAGAGTACGC AAGAAGCCAT AAACAAGATA	1260
ACAAAAAATC TCAATTCTTT GAGTGAGCTA GAAGTAAAGA ACCTTCAAAG ACTAAGTGGT	1320
GCCATGGATG AACTCCACAA CGAAATACTC GAGCTGGATG AGAAAGTGGA TGATCTCAGA	1380
GCTGACACAA TAAGCTCGCA AATAGAGCTT GCAGTCTTAC TTTCCAACGA AGGAATAATA	1440
AACAGTGAAG ATGAGCATCT ATTGGCACTT GAGAGAAAAC TAAAGAAAAT GCTGGGTCCC	1500
TCTGCTGTAG ACATAGGGAA TGGATGCTTC GAAACAAAAC ACAAGTGCAA CCAGACCTGC	1560
TTAGACAGGA TAGCTGCTGG CACCTTTAAT GCAGGAGAAT TTTCTCTTCC CACTTTTGAT	1620
TCACTGAATA TTACTGCTGC ATCTTTAAAT GATGATGGAT TGGATAATCA TACTATACTG	1680
CTCTACTACT CAACTGCTGC TTCTAGTTTG GCTGTAACAT TGATGATAGC TATTTTATT	1740
GTTTATATGG TCTCCAGAGA CAATGTTTCT TGTTCCATCT GTCTGTGAGG TACCAGATCT	1800
TAATTAATTA A	1811

DUOMENYS APIE SEQ ID No: 13:

(i)SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 589 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienaslūlė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(iii) HIPOTETINĖ: NE

(iv) ANTISENSINĖ: NE

(v) FRAGMENTO TIPAS: N-terminalinis

(vi) PRADINIS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: gripo virusas

(B) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: B/Nyderlandai/13/94 rHA

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: AcNPV 61K baltymo signalinė seka

(B)BUVIMO VIETA: 1 iki 18

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: subrendęs rHA

(B)BUVIMO VIETA: 19 iki 571

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 13:

Met	Pro	Leu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Val	Leu	Trp	Leu	Val	Ala	Val	Ser
1				5					10					15	
Asn	Ala	Ile	Pro	Gly	Asp	Arg	Ile	Cys	Thr	Gly	Ile	Thr	Ser	Ser	Lys
			20					25					30		
Ser	Pro	His	Val	Val	Lys	Thr	Ala	Thr	Gln	Gly	Glu	Val	Asn	Val	Thr
		35				40					45				
Gly	Val	Ile	Pro	Leu	Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Lys	Ser	His	Phe	Ala	Asn
	50				55						60				
Leu	Lys	Gly	Thr	Lys	Thr	Arg	Gly	Lys	Leu	Cys	Pro	Asn	Cys	Leu	Asn
65				70					75					80	

Cys Thr Asp Leu Asp Val Ala Leu Gly Arg Pro Met Cys Val Gly Ile
 85 90 95
 Thr Pro Ser Ala Lys Ala Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr
 100 105 110
 Ser Gly Cys Phe Pro Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu
 115 120 125
 Pro Asn Leu Leu Arg Gly Tyr Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr Gln Asn
 130 135 140
 Val Ile Asn Ala Glu Lys Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Ser Cys Pro Asn Val Thr Ser Arg Thr Gly Phe Phe Ala Thr
 165 170 175
 Met Ala Trp Ala Val Pro Arg Asp Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu
 180 185 190
 Thr Val Glu Val Pro Tyr Ile Cys Thr Lys Gly Glu Asp Gln Ile Thr
 195 200 205
 Val Trp Gly Phe His Ser Asp Asn Lys Thr Gln Met Lys Asn Leu Tyr
 210 215 220
 Gly Asp Ser Asn Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr
 225 230 235 240
 Thr His Tyr Val Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asp Gln Thr Glu Asp
 245 250 255
 Gly Gly Leu Pro Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln
 260 265 270
 Lys Pro Gly Lys Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Ile Leu Leu
 275 280 285
 Pro Gln Lys Val Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly
 290 295 300
 Ser Leu Pro Leu Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly
 305 310 315 320
 Gly Leu Asn Lys Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala
 325 330 335
 Ile Gly Asn Cys Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn
 340 345 350
 Gly Thr Arg Tyr Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe
 355 360 365
 Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile
 370 375 380
 Ala Gly Trp His Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val
 385 390 395 400
 Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys
 405 410 415
 Asn Leu Asn Ser Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu
 420 425 430
 Ser Gly Ala Met Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu
 435 440 445
 Lys Val Asp Asp Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu
 450 455 460
 Ala Val Leu Leu Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His
 465 470 475 480
 Leu Leu Ala Leu Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala
 485 490 495
 Val Asp Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln
 500 505 510
 Thr Cys Leu Asp Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe
 515 520 525
 Ser Leu Pro Thr Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn
 530 535 540
 Asp Asp Gly Leu Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala
 545 550 555 560
 Ala Ser Ser Leu Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr
 565 570 575
 Met Val Ser Arg Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
 580 585

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i)SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 1757 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasiuole

(D) TOPOLOGJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(iii) HIPOTETINĖ: NE

(iv) ANTISENSINĖ: NE

(vi)PRADINIS ŠALTINIS:

(A)ORGANIZMAS: gripo virusas

(B) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: A/Šandongas/9/93 rHA

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: polihedrino mRNR lyderis (dalinis)

(B)BUVIMO VIETA: 1 iki 18

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis AcNPV 61K baltymo signalą

(B)BUVIMO VIETA: 19 iki 72

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: SmaI restrikcijos saitas

(B)BUVIMO VIETA: 76 iki 81

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis subrendusį rHA

(B)BUVIMO VIETA: 73 iki 1728

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: KpnI restrikcijos saitas

(B)BUVIMO VIETA: 1735 iki 1740

((ix) YPATUMAS

VARDAS/RAKTAS: BglII restriction site

BUVIMO VIETA: 1741 to 1746

(ix) YPATUMAS

A)VARDAS/RAKTAS: universalus transliacijos terminacijos signalas

(B)BUVIMO VIETA: 1747 iki 1757

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 14:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC	60
GTTTCTAACG CGATTCCCGG GCAAGACCTT CCAGGAAATG ACAACAGCAC AGCAACGCTG	120
TGCCTGGGAC ATCATGCAGT GCCAAACGGA ACGCTAGTGA AAACAATCAC GAATGATCAA	180
ATTGAAGTGA CTAATGCTAC TGAGTTGGTT CAGAGTTCCT CAACAGGTAG AATATGCGGC	240
AGTCCTCACC GAATCCTTGA TGGAAAAAAC TGCACACTGA TAGATGCTCT ATTGGGAGAC	300
CCTCATTTGTG ATGGCTTCCA AAATAAGGAA TGGGACCTTT TTGTTGAACG CAGCAAAGCT	360
TACAGCAACT GTTACCCTTA TGATGTGCCG GATTATGCCT CCCTTAGGTC ACTAGTTGCC	420
TCATCAGGCA CCCTGGAGTT TATCAATGAA GACTTCAATT GGACTGGAGT CGCTCAGGAT	480
GGGGGAAGCT ATGCTTGCAA AAGAGGATCT GTTAACAGTT TCTTTAGTAG ATTGAATTGG	540
TTGCACAAAT TAGAATACAA ATATCCAGCG CTGAACGTGA CTATGCCAAA CAATGGCAAA	600
TTTGACAAAT TGTACATTTG GGGGGTTCAC CACCCGAGCA CGGACAGTGA CCAAACCAGC	660
CTATATGTTT GAGCATCAGG GAGAGTCACA GTCTCTACCA AAAGAAGCCA ACAAACCTGA	720
ACCCCGAATA TCGGGTCTAG ACCCTGGGTA AGGGGTCAGT CCAGTAGAAT AAGCATCTAT	780
TGGACAATAG TAAAACCGGG AGACATACTT TTGATTGATA GCACAGGGAA TCTAATTGCT	840
CCTCGGGGTT ACTTCAAAAT ACGAAATGGG AAAAGCTCAA TAATGAGGTC AGATGCACCC	900
ATTGGCAACT GCAGTTCTGA ATGCATCACT CCAAATGGAA GCATTCCCAA TGACAAACCT	960

TTTCAAAATG TAAACAGAAT CACATATGGG GCCTGCCCCA GATATGTTAA GCAAAACACT 1020
 CTGAAATTGG CAACAGGGAT GCGGAATGTA CCAGAGAAAC AACTAGAGG CATATTCGGC 1080
 GCAATCGCAG GTTTCATAGA AAATGGTTGG GAGGGAATGG TAGACGGTTG GTACGGTTTC 1140
 AGGCATCAAA ATTCTGAGGG CACAGGACAA GCAGCAGATC TTAAAAGCAC TCAAGCAGCA 1200
 ATCGACCAAA TCAACGGGAA ACTGAATAGG TTAATCGAGA AAACGAACGA GAAATTCAT 1260
 CAAATCGAAA AAGAATTCTC AGAAGTAGAA GGGAGAATTC AGGACCTCGA GAAATATGTT 1320
 GAAGACACTA AAATAGATCT CTGGTCTTAC AACGCGGAGC TTCTTGTTGC CCTGGAGAAC 1380
 CAACATACAA TTGATCTAAC TGAATCAGAA ATGAACAAAC TGTTTGAAAA AACAAGGAAG 1440
 CAACTGAGGG AAAATGCTGA GGACATGGGC AATGGTTGCT TCAAAATATA CCACAAATGT 1500
 GACAATGCCT GCATAGGGTC AATCAGAAAT GGAACCTATG ACCATGATGT ATACAGAGAC 1560
 GAAGCATTA AACAACGGTT CCAGATCAAA GGTGTTGAGC TGAAGTCAGG ATACAAAGAT 1620
 TGGATCCTAT GGATTCCTT TGCCATATCA TGCTTTTTCG TTTGTGTTGT TTTGCTGGGG 1680
 TTCATCATGT GGGCCTGCCA AAAAGGCAAC ATTAGGTGCA ACATTTGCAT TTGAGGTACC 1740
 AGATCTTAAT TAATTAA 1757

DUOMENYS APIE SEQ ID No: 15:

(i)SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 571 aminorūgštis

(B) TIPAS: aminorūgštis

(C) SIŪLU SKAIČIUS: vienasidulė

(D) TOPOLOGJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(iii) HIPOTETINĖ: NE

(iv) ANTISENSINĖ: NE

(v) FRAGMENTO TIPAS: N-terminalinis

(vi)PRADINIS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: gripo virusas

(B) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: A/Šandong/9/93 rHA

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: AcNPV 61K baltymo signalinė seka

(B)BUVIMO VIETA: 1 iki 18

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: subrendęs rHA

(B)BUVIMO VIETA: 19 iki 553

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 15:

Met	Pro	Leu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Val	Leu	Trp	Leu	Val	Ala	Val	Ser
1				5					10					15	
Asn	Ala	Ile	Pro	Gly	Gln	Asp	Leu	Pro	Gly	Asn	Asp	Asn	Ser	Thr	Ala
			20					25					30		
Thr	Leu	Cys	Leu	Gly	His	His	Ala	Val	Pro	Asn	Gly	Thr	Leu	Val	Lys
		35					40					45			
Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	Ile	Glu	Val	Thr	Asn	Ala	Thr	Glu	Leu	Val
	50				55						60				
Gln	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Arg	Ile	Cys	Gly	Ser	Pro	His	Arg	Ile	Leu
	65				70					75				80	
Asp	Gly	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro	His
			85					90					95		
Cys	Asp	Gly	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	Trp	Asp	Leu	Phe	Val	Glu	Arg	Ser
			100					105					110		
Lys	Ala	Tyr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser
		115					120					125			
Leu	Arg	Ser	Leu	Val	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu
	130					135					140				

Asp Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asp Gly Gly Ser Tyr Ala Cys
 145 150 155 160
 Lys Arg Gly Ser Val Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His
 165 170 175
 Lys Leu Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn
 180 185 190
 Gly Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr
 195 200 205
 Asp Ser Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Val Arg Ala Ser Gly Arg Val Thr
 210 215 220
 Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Thr Pro Asn Ile Gly Ser
 225 230 235 240
 Arg Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr
 245 250 255
 Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asp Ser Thr Gly Asn Leu
 260 265 270
 Ile Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Ser Ile
 275 280 285
 Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Gly Asn Cys Ser Ser Glu Cys Ile Thr
 290 295 300
 Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg
 305 310 315 320
 Ile Thr Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys
 325 330 335
 Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile
 340 345 350
 Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val
 355 360 365
 Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln
 370 375 380
 Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly
 385 390 395 400
 Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile
 405 410 415
 Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys
 420 425 430
 Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu
 435 440 445
 Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu
 450 455 460
 Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala
 465 470 475 480
 Glu Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn
 485 490 495
 Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr
 500 505 510
 Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu
 515 520 525
 Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser
 530 535 540
 Cys Phe Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys
 545 550 555 560
 Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
 565 570

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 16:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 1814 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasiuolė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(iii) HIPOTETINĖ: NE

(iv) ANTISENSINĖ: NE

(vi) PRADINIS ŠALTINIS:

(B) ORGANIZMAS: gripo virusas

(C) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: B/Šanchajus/4/94 rHA

- (ix) YPATUMAS
 (A)VARDAS/RAKTAS: polihedrino mRNR lyderis (dalinis)
 (B)BUVIMO VIETA: 1 iki 18
 (ix) YPATUMAS
 (A)VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis AcNPV 61K baltymo signalą
 (B)BUVIMO VIETA: 19 iki 72
 (ix) YPATUMAS
 (A)VARDAS/RAKTAS: SmaI restrikcijos saitas
 (B)BUVIMO VIETA: 76 iki 81
 (ix) YPATUMAS
 (A)VARDAS/RAKTAS: KpnI restrikcijos saitas
 (B)BUVIMO VIETA: 82 iki 87
 (ix) YPATUMAS
 (A)VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis subrendusį rHA
 (B)BUVIMO VIETA: 73 iki 1794
 (ix) YPATUMAS
 (A)VARDAS/RAKTAS: universalus transliacijos terminacijos signalas
 (B)BUVIMO VIETA: 1804 iki 1814
 (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 16:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC	60
GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGGTACCGAT CGAATCTGCA CTGGGATAAC ATCTTCAAAC	120
TCACCTCATG TGGTCAAAAC AGCTACTCAA GGGGAGGTCA ATGTGACTGG TGTGATACCA	180
CTGACAACAA CACCAACAAA ATCTCATTTT GCAAATCTCA AAGGAACAAA GACCAGAGGG	240
AAACTATGCC CAAACTGTCT CAACTGCACA GATCTGGATG TGGCCTTGGG CAGACCAATG	300
TGTGTGGGGA CCACACCTTC GGCAAAAGCT TCAATACTCC ACGAAGTCAG ACCTGTTACA	360
TCCGGGTGCT TTCCTATAAT GCACGACAGA ACAAAAATCA GACAGCTACC CAATCTTCTC	420
AGAGGATATG AAAATATCAG ATTATCAACC CAAAACGTTA TCAACGCAGA AAAGGCACCA	480
GGAGGACCCT ACAGACTTGG AACCTCAGGA TCTTGCCCTA ACGCTACCAG TAGAAGCGGA	540
TTTTTCGCAA CAATGGCTTG GGCTGTCCCA AGGGACAACA ACAAACAGC AACGAATCCA	600
CTAACAGTAG AAGTACCATA CATTTCACAA AAAGGAGAAG ACCAAATTAC TGTTTGGGGG	660
TTCCATTCTG ATAACAAACC CCAAATGAAA AACCTCTATG GAGACTCAA TCCTCAAAG	720
TTCACCTCAT CTGCTAATGG AGTAACCACA CATTATGTTT CTCAGATTGG CGGCTTCCCA	780
GATCAAACAG AAGACGGAGG GCTACCACAA AGCGGCAGAA TTGTTGTTGA TTACATGGTG	840
CAAAAACCTG GGAAGACAGG AACAATTGTC TATCAGAGAG GTGTTTTGTT GCCTCAAAG	900
GTGTGGTGCG CTAGTGGCAG GAGCAAAGTA ATAAAAGGGT CCTTGCCTTT AATTGGTGAA	960
GCAGATTGCC TTCACGAAAA ATACGGTGGA TTAAACAAAA GCAAGCCTTA CTACACAGGA	1020
GAACATGCAA AAGCCATAGG AAATTGCCCA ATATGGGTGA AAACACCTTT GAAGCTTGCC	1080
AATGGAACCA AATATAGACC TCCTGCAAAA CTATTAAAGG AAAGGGGTTT CTTCGGAGCT	1140
ATTGCTGGTT TCTTAGAAGG AGGATGGGAA GGAATGATTG CAGGTTGGCA CGGATACACA	1200
TCTCACGGAG CACATGGAGT GGCAGTGGCA GCAGACCTTA AGAGTACGCA AGAAGCCATA	1260
AACAAGATAA CAAAAATCT CAATTCTTTG AGTGAGCTAG AAGTAAAGAA TCTTCAAAGG	1320
CTAAGTGGTG CCATGGATGA ACTCCACAAC GAAATACTCG AGCTGGATGA GAAAGTGGAT	1380

GATCTCAGAG CTGACACAAT AAGCTCGCAA ATAGAACTTG CAGTCTTGCT TTCCAACGAA 1440
 GGAATAATAA ACAGTGAAGA TGAGCATCTA TTGGCACTTG AGAGAAAACCT AAAGAAAATG 1500
 CTGGGTCCCT CTGCTGTAGA CATAGGAAAT GGATGCTTCG AAACCAAACA CAAGTGCAAC 1560
 CAGACCTGCT TAGACAGGAT AGCTGCTGGC ACCTTTAATG CGGGAGAATT TTCTCTTCCC 1620
 ACTTTTGATT CACTGAATAT TACTGCTGCA TCTTTAAATG ATGATGGATT GGATAACCAT 1680
 ACTATACTGC TCTACTACTC AACTGCTGCT TCTAGTTTGG CGGTAACATT GATGATAGCT 1740
 ATTTTATTG TTTATATGGT CTCCAGAGAC AATGTTTCTT GCTCCATCTG TCTGTGAGGA 1800
 TCTTAATTAA TTAA 1814

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 17:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 592 aminorūgštis

(B) TIPAS: aminorūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasitūlė

(D) TOPOLOGJA: linijinė

(vi) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(vii) HIPOTETINĖ: NE

(viii) ANTISENSINĖ: NE

(ix) FRAGMENTO TIPAS: N-terminalinis

(vi) PRADINIS ŠALTINIS:

(D) ORGANIZMAS: gripo virusas

(B) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: B/Šanchajus/4/94 rHA

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: AcNPV 61K baltymo signalinis peptidas

(B) BUVIMO VIETA: 1 iki 18

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: subrendęs rHA

(B) BUVIMO VIETA: 19 iki 574

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 17:

Met	Pro	Leu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Val	Leu	Trp	Leu	Val	Ala	Val	Ser
1				5					10					15	
Asn	Ala	Ile	Pro	Gly	Gly	Thr	Asp	Arg	Ile	Cys	Thr	Gly	Ile	Thr	Ser
			20					25					30		
Ser	Asn	Ser	Pro	His	Val	Val	Lys	Thr	Ala	Thr	Gln	Gly	Glu	Val	Asn
		35					40					45			
Val	Thr	Gly	Val	Ile	Pro	Leu	Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Lys	Ser	His	Phe
	50					55					60				
Ala	Asn	Leu	Lys	Gly	Thr	Lys	Thr	Arg	Gly	Lys	Leu	Cys	Pro	Asn	Cys
65					70				75					80	
Leu	Asn	Cys	Thr	Asp	Leu	Asp	Val	Ala	Leu	Gly	Arg	Pro	Met	Cys	Val
			85					90					95		
Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Ala	Lys	Ala	Ser	Ile	Leu	His	Glu	Val	Arg	Pro
			100					105				110			
Val	Thr	Ser	Gly	Cys	Phe	Pro	Ile	Met	His	Asp	Arg	Thr	Lys	Ile	Arg
		115					120					125			
Gln	Leu	Pro	Asn	Leu	Leu	Arg	Gly	Tyr	Glu	Asn	Ile	Arg	Leu	Ser	Thr
	130					135					140				
Gln	Asn	Val	Ile	Asn	Ala	Glu	Lys	Ala	Pro	Gly	Gly	Pro	Tyr	Arg	Leu
145					150				155					160	
Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Cys	Pro	Asn	Ala	Thr	Ser	Arg	Ser	Gly	Phe	Phe
			165					170					175		
Ala	Thr	Met	Ala	Trp	Ala	Val	Pro	Arg	Asp	Asn	Asn	Lys	Thr	Ala	Thr
		180					185					190			
Asn	Pro	Leu	Thr	Val	Glu	Val	Pro	Tyr	Ile	Cys	Thr	Lys	Gly	Glu	Asp
	195						200					205			
Gln	Ile	Thr	Val	Trp	Gly	Phe	His	Ser	Asp	Asn	Lys	Pro	Gln	Met	Lys
	210					215					220				
Asn	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ser	Asn	Pro	Gln	Lys	Phe	Thr	Ser	Ser	Ala	Asn
225					230					235				240	

Gly Val Thr Thr His Tyr Val Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asp Gln
 245 250 255
 Thr Glu Asp Gly Leu Pro Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr
 260 265 270
 Met Val Gln Lys Pro Gly Lys Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly
 275 280 285
 Val Leu Leu Pro Gln Lys Val Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val
 290 295 300
 Ile Lys Gly Ser Leu Pro Leu Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu
 305 310 315 320
 Lys Tyr Gly Gly Leu Asn Lys Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His
 325 330 335
 Ala Lys Ala Ile Gly Asn Cys Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys
 340 345 350
 Leu Ala Asn Gly Thr Lys Tyr Arg Pro Pro Ala Lys Leu Lys Glu
 355 360 365
 Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu
 370 375 380
 Gly Met Ile Ala Gly Trp His Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly
 385 390 395 400
 Val Ala Val Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys
 405 410 415
 Ile Thr Lys Asn Leu Asn Ser Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu
 420 425 430
 Gln Arg Leu Ser Gly Ala Met Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu
 435 440 445
 Leu Asp Glu Lys Val Asp Asp Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln
 450 455 460
 Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu
 465 470 475 480
 Asp Glu His Leu Leu Ala Leu Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly
 485 490 495
 Pro Ser Ala Val Asp Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys
 500 505 510
 Cys Asn Gln Thr Cys Leu Asp Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala
 515 520 525
 Gly Glu Phe Ser Leu Pro Thr Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala
 530 535 540
 Ser Leu Asn Asp Asp Gly Leu Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr
 545 550 555 560
 Ser Thr Ala Ala Ser Ser Leu Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe
 565 570 575
 Ile Val Tyr Met Val Ser Arg Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
 580 585 590

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 18:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 1802 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasitūlė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(iii) HIPOTETINĖ: NE

(iv) ANTISENSINĖ: NE

(vi) PRADINIS ŠALTINIS:

(E) ORGANIZMAS: gripo virusas

(F) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: B/Harbinas/7/94 rHA

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: polihedrino mRNR lyderis (dalinis)

(B) BUVIMO VIETA: 1 iki 18

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis HA baltymo signalinį peptidą

(B) BUVIMO VIETA: 19 iki 69

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: Smal restrikcijos saitas

(B) BUVIMO VIETA: 22 iki 27

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis subrendusį rHA

(B)BUVIMO VIETA: 70 iki 1776

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: KpnI restrikcijos saitas

(B)BUVIMO VIETA: 1780 iki 1785

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: BglII restrikcijos saitas

(B)BUVIMO VIETA: 1786 iki 1791

(ix) YPATUMAS

A)VARDAS/RAKTAS: universalus transliacijos terminacijos signalas

(B)BUVIMO VIETA: 1792 iki 1802

(x) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 18:

TAAAAAAACC TATAATAAT GCCCGGAAG GCAATAATTG TACTACTCAT GGTAGTAACA	60
TCCAACGCAG ATCGAATCTG CACTGGGATA ACATCTTCAA ACTCACCTCA TGTGGTCAAA	120
ACAGCTACTC AAGGGGAAGT CAATGTGACT GGTGTGATAC CACTGACAAC AACACCAACA	180
AAATCTCATT TTGCAAATCT AAAAGGAACA AAGACCAGAG GGAAACTATG CCCAAACTGT	240
CTCAACTGCA CAGATCTGGA TGTGGCCTTG GGCAGACCAA TGTGTGTGGG GACCACACCT	300
TCGGCAAAAG CTTCAATACT CCACGAAGTC AGACCTGTTA CATCCGGGTG CTTTCCTATA	360
ATGCACGACA GAACAAAAT CAGACAGCTA CCCAATCTTC TCAGAGGATA TGAAAATATC	420
AGATTATCAA CCCAAAACGT TATCAATGCA GAAAAGCAC CAGGAGGACC CTACAGACTT	480
GGAACCTCAG GATCTTGCCC TAACGCTACC AGTAGAAGCG GATTTTTTGC AACAAATGGCT	540
TGGGCTGTCC CAAGGGACGA CAACAAAACA GCAACGAATC CACTAACAGT AGAAGTACCA	600
TACGTTTGTA CAGAAGGAGA AGACCAAATT ACTGTTTGGG GGTTCATTTC TGATAACAAA	660
GCCCAAATGA AAAACCTCTA TGGAGACTCA AATCCTCAAA AGTTCACCTC ATCTGCTAAT	720
GGAGTAACCA CACATTATGT TTCTCAGATT GGCGGCTTCC CAGATCAAAC AGAAGACGGA	780
GGGCTACCAC AAAGCGGCAG AATTGTTGTT GATTACATGG TGCAAAAACC TGGGAAAACA	840
GGAACAATTG TCTATCAAAG AGGTGTTTTG TTGCCTCAAA AGGTGTGGTG CGCGAGTGGC	900
AGGAGCAAAG TAATAAAAGG GTCCTTGCCT TTAATTGGTG AAGCAGATTG CCTTCACGAA	960
AAATACGGTG GATTAAACAA AAGCAAGCCT TACTACACAG GAGAACATGC AAAAGCCATA	1020
GGAAATTGCC CAATATGGGT GAAAACACCT TTGAAGCTTG CCAATGGAAC CAAATATAGA	1080
CCTCCTGCAA AACTATTAAA GGAAAGGGT TTCTTCGGAG CTATTGCTGG TTTCTTAGAA	1140
GGAGGATGGG AAGGAATGAT TGCAGGTTGG CACGGATACA CATCTCÁCGG AGCACATGGA	1200
GTGGCAGTGG CAGCAGACCT TAAGAGTACG CAAGAAGCCA TAAACAAGAT AACAAAAAAT	1260
CTCAATTCTT TGAGTGAGCT AGAAGTAAAG AATCTTCAAA GACTAAGTGG TGCCATGGAT	1320
GAAGTCCATA ACGAAATACT CGAGCTGGAT GAGAAAGTGG ATGATCTCAG AGCTGACACT	1380
ATAAGCTCGC AAATAGAACT TGCAGTCTTG CTTTCCAACG AAGGAATAAT AACAGTGAA	1440
GATGAGCATC TATTGGCACT TGAGAGAAAA CTAAAGAAAA TGCTGGGTCC CTCTGCTGTA	1500
GACATAGGGA ATGGATGCTT CGAAACCAAA CACAAGTGCA ACCAGACCTG CTTAGACAGG	1560
ATAGCTGCTG GCACCTTTAA TGCAGGAGAA TTTTCTCTCC CCACTTTTGA TTCACTGAAT	1620

ATTACTGCTG CATCTTTAAA TGATGATGGA TTGGATAATC ATACTATACT GCTCTACTAC 1680
TCAACTGCTG CTTCTAGTTT GGCTGTAACA TTGATGATAG CTATTTTAT TGTTTATATG 1740
GTCTCCAGAG ACAATGTTTC ATGCTCCATC TGTCTGTGAG GTACCAGATC TTAATTAATT 1800
AA 1802

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 19:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 586 aminorūgštis

(B) TIPAS: aminorūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienaslūlė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(xii) HIPOTETINĖ: NE

(xiii) ANTISENSINĖ: NE

(xiv) FRAGMENTO TIPAS: N-terminalinis

(vi) PRADINIS ŠALTINIS:

(G) ORGANIZMAS: gripo virusas

(B) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: B/Harbinas/7/94 rHA

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: HA signalinis peptidas

(B) BUVIMO VIETA: 1 iki 17

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: subrendęs rHA

(B) BUVIMO VIETA: 18 iki 569

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 19:

Met	Pro	Gly	Lys	Ala	Ile	Ile	Val	Leu	Leu	Met	Val	Val	Thr	Ser	Asn	
1				5					10					15		
Ala	Asp	Arg	Ile	Cys	Thr	Gly	Ile	Thr	Ser	Ser	Asn	Ser	Pro	His	Val	
			20					25					30			
Val	Lys	Thr	Ala	Thr	Gln	Gly	Glu	Val	Asn	Val	Thr	Gly	Val	Ile	Pro	
			35				40					45				
Leu	Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Lys	Ser	His	Phe	Ala	Asn	Leu	Lys	Gly	Thr	
			50			55					60					
Lys	Thr	Arg	Gly	Lys	Leu	Cys	Pro	Asn	Cys	Leu	Asn	Cys	Thr	Asp	Leu	
65				70						75					80	
Asp	Val	Ala	Leu	Gly	Arg	Pro	Met	Cys	Val	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Ala	
			85					90						95		
Lys	Ala	Ser	Ile	Leu	His	Glu	Val	Arg	Pro	Val	Thr	Ser	Gly	Cys	Phe	
			100					105					110			
Pro	Ile	Met	His	Asp	Arg	Thr	Lys	Ile	Arg	Gln	Leu	Pro	Asn	Leu	Leu	
			115				120					125				
Arg	Gly	Tyr	Glu	Asn	Ile	Arg	Leu	Ser	Thr	Gln	Asn	Val	Ile	Asn	Ala	
			130				135					140				
Glu	Lys	Ala	Pro	Gly	Gly	Pro	Tyr	Arg	Leu	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Cys	
145				150						155					160	
Pro	Asn	Ala	Thr	Ser	Arg	Ser	Gly	Phe	Phe	Ala	Thr	Met	Ala	Trp	Ala	
			165					170						175		
Val	Pro	Arg	Asp	Asn	Lys	Thr	Ala	Thr	Asn	Pro	Leu	Thr	Val	Glu		
			180				185						190			
Val	Pro	Tyr	Val	Cys	Thr	Glu	Gly	Glu	Asp	Gln	Ile	Thr	Val	Trp	Gly	
			195				200					205				
Phe	His	Ser	Asp	Asn	Lys	Ala	Gln	Met	Lys	Asn	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ser	
			210			215					220					
Asn	Pro	Gln	Lys	Phe	Thr	Ser	Ser	Ala	Asn	Gly	Val	Thr	Thr	His	Tyr	
225				230						235					240	
Val	Ser	Gln	Ile	Gly	Gly	Phe	Pro	Asp	Gln	Thr	Glu	Asp	Gly	Gly	Leu	
			245					250						255		
Pro	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Val	Val	Asp	Tyr	Met	Val	Gln	Lys	Pro	Gly	
			260				265						270			
Lys	Thr	Gly	Thr	Ile	Val	Tyr	Gln	Arg	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Gln	Lys	
			275				280					285				
Val	Trp	Cys	Ala	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys	Val	Ile	Lys	Gly	Ser	Leu	Pro	
	290					295					300					

```

Leu Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn
305                               310                315                320
Lys Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn
                               325                330                335
Cys Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys
                               340                345                350
Tyr Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala
                               355                360                365
Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile Ala Gly Trp
370                               375                380
His Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val Ala Ala Asp
385                               390                395                400
Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys Asn Leu Asn
                               405                410                415
Ser Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu Ser Gly Ala
                               420                425                430
Met Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu Lys Val Asp
                               435                440                445
Asp Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu Ala Val Leu
450                               455                460
Leu Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His Leu Leu Ala
465                               470                475                480
Leu Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala Val Asp Ile
                               485                490                495
Gly Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln Thr Cys Leu
                               500                505                510
Asp Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe Ser Leu Pro
515                               520                525
Thr Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn Asp Asp Gly
530                               535                540
Leu Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala Ala Ser Ser
545                               550                555                560
Leu Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr Met Val Ser
                               565                570                575
Arg Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
                               580                585

```

DUOMENYS APIE SEQ ID No: 20:

(i)SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 1757 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasitūle

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(v) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(vi) HIPOTETINĖ: NE

(vii) ANTISENSINĖ: NE

(vi)PRADINIS ŠALTINIS:

(A)ORGANIZMAS: gripo virusas

(B) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: A/Johanesburgas/33/94 rHA

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: polihedrino mRNR lyderis (dalinis)

(B)BUVIMO VIETA: 1 iki 18

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis AcNPV 61K baltymo signalinį peptidą

(B)BUVIMO VIETA: 19 iki 72

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: SmaI restrikcijos saitas

(B)BUVIMO VIETA: 76 iki 81

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: rajonas, koduojantis subrendusį rHA

(B)BUVIMO VIETA: 73 iki 1731

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: KpnI restrikcijos saitas

(B)BUVIMO VIETA: 1735 iki 1740

(ix) YPATUMAS

(A)VARDAS/RAKTAS: BglII restrikcijos saitas

(B)BUVIMO VIETA: 1741 iki 1747

(ix) YPATUMAS

A) VARDAS/RAKTAS: universalus transliacijos terminacijos signalas

(B)BUVIMO VIETA: 1747 iki 1757

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 20:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC	60
GTTTCTAACG CGATTCCCGG GCAGGACCTT CCAGGAAATG ACAACAGCAC AGCAACGCTG	120
TGCCTGGGAC ACCATGCAGT GCCAAACGGA ACGCTAGTGA AAACAATCAC GAATGATCAA	180
ATTGAAGTGA CTAATGCTAC TGAGCTGGTT CAGAGTTCCC CAACAGGTAG AATATGCGAC	240
AGTCCTCACC GAATCCTTGA TGGAAAGAAC TGCACACTGA TAGATGCTCT ATTGGGAGAC	300
CCTCATTGTG ATGGCTTCCA AAATAAGGAA TGGGACCTTT TTGTTGAACG CAGCAAAGCT	360
TACAGCAACT GTTACCCTTA TGATGTGCCG GATTATGCCT CCCTTAGGTC ACTAGTTGCC	420
TCATCAGGCA CCCTGGAGTT TATCAACGAA AACTTCAATT GGACTGGAGT CGCTCAGGAT	480
GGGAAAAGCT ATGCTTGCAA AAGGGGATCT GTTAACAGTT TCTTTAGTAG ATTGAATTGG	540
TTGCACAAAT TAGAATACAA ATATCCAGCG CTGAACGTGA CTATGCCAAA CAATGGCAAA	600
TTTGACAAAT TGTACATTG GGGGGTTCAC CACCCGAGCA CGGACAGTGA CCAAACCAGC	660
CTATATGTCC GAGCATCAGG GAGAGTCACA GTCTCTACCA AAAGAAGCCA ACAAACTGTA	720
ATCCCGGATA TCGGGTATAG ACCATGGGTA AGGGGTCAGT CCAGTAGAAT AGGCATCTAT	780
TGGACAATAG TAAAACCGGG AGACATACTT TTGATTAATA GCACAGGGAA TCTAATTGCT	840
CCTCGGGGTT ACTTCAAAAT ACGAAATGGG AAAAGCTCAA TAATGAGGTC AGATGCACCC	900
ATTGGCAACT GCAGTTCTGA ATGCATCACT CCAAATGGAA GCATTCCCAA TGACAAACCT	960
TTTCAAAATG TAAACAGGAT CACATATGGG GCCTGCCCCA GATATGTTAA GCAAAACACT	1020
CTGAAATTGG CAACAGGGAT GCGGAATGTA CCAGAGAAAC AACTAGAGG CATATTCGGC	1080
GCAATCGCAG GTTTCATAGA AAATGGTTGG GAGGGAATGG TAGACGGTTG GTACGGTTTC	1140
AGGCATCAAA ATTCTGAGGG CACAGGACAA GCTGCAGATC TTAAAAGCAC TCAAGCAGCA	1200
ATCGACCAAA TCAACGGGAA ACTGAATAGG TTAGTCGAGA AAACGAACGA GAAATTCCAT	1260
CAAATCGAAA AAGAATTCTC AGAAGTAGAA GGGAGAATTC AGGACCTCGA GAAATATGTT	1320
GAAGACACTA AAATAGATCT CTGGTCTTAC AATGCGGAGC TTCTTGTTGC TCTGGAGAAC	1380
CAACATACAA TTGATCTAAC TGACTCAGAA ATGAACAAAC TGTTTGAAAG AACAAGGAAG	1440
CAACTGAGGG AAAATGCTGA GGACATGGGC AATGGTTGTT TCAAAATATA CCACAAATGT	1500
GACAATGCCT GCATAGGGTC AATCAGAAAT GGAACCTATG ACCATGATGT ATACAGAGAC	1560
GAAGCATTAA ACAACCGGTT CCAGATCAAA GGTGTTGAGC TGAAGTCAGG ATACAAAGAT	1620
TGGATTCTAT GGATTTCTTT TGCCATATCA TGCTTTTTC TTTGTGTTGT TTTGCTTGGG	1680
TTCATCATGT GGGCCTGCCA AAAAGGCAAC ATTAGGTGCA ACATTTGCAT TTGAGGTACC	1740
AGATCTTAAT TAATTAA	1757

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 21:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 571 aminorūgštis

(B) TIPAS: aminorūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasidulė

(D) TOPOLOGJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(iii) HIPOTETINĖ: NE

(iv) ANTISENSINĖ: NE

(v) FRAGMENTO TIPAS: N-terminalinis

(vi) PRADINIS ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: gripo virusas

(B) INDIVIDUALUS IZOLIATAS: A/Johanesburgas/33/94 rHA

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: AcNPV 61K baltymo signalinė seka

(B) BUVIMO VIETA: 1 iki 18

(ix) YPATUMAS

(A) VARDAS/RAKTAS: subrendęs rHA

(B) BUVIMO VIETA: 19 iki 569

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 21:

Met	Pro	Leu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Val	Leu	Trp	Leu	Val	Ala	Val	Ser	1	5	10	15
Asn	Ala	Ile	Pro	Gly	Gln	Asp	Leu	Pro	Gly	Asn	Asp	Asn	Ser	Thr	Ala	20	25	30	35
Thr	Leu	Cys	Leu	Gly	His	His	Ala	Val	Pro	Asn	Gly	Thr	Leu	Val	Lys	40	45	50	55
Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	Ile	Glu	Val	Thr	Asn	Ala	Thr	Glu	Leu	Val	60	65	70	75
Gln	Ser	Ser	Pro	Thr	Gly	Arg	Ile	Cys	Asp	Ser	Pro	His	Arg	Ile	Leu	80	85	90	95
Asp	Gly	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro	His	100	105	110	115
Cys	Asp	Gly	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	Trp	Asp	Leu	Phe	Val	Glu	Arg	Ser	120	125	130	135
Lys	Ala	Tyr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser	140	145	150	155
Leu	Arg	Ser	Leu	Val	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu	160	165	170	175
Asn	Phe	Asn	Trp	Thr	Gly	Val	Ala	Gln	Asp	Gly	Lys	Ser	Tyr	Ala	Cys	180	185	190	195
Lys	Arg	Gly	Ser	Val	Asn	Ser	Phe	Phe	Ser	Arg	Leu	Asn	Trp	Leu	His	200	205	210	215
Lys	Leu	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Ala	Leu	Asn	Val	Thr	Met	Pro	Asn	Asn	220	225	230	235
Gly	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Val	His	His	Pro	Ser	Thr	240	245	250	255
Asp	Ser	Asp	Gln	Thr	Ser	Leu	Tyr	Val	Arg	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Thr	260	265	270	275
Val	Ser	Thr	Lys	Arg	Ser	Gln	Gln	Thr	Val	Ile	Pro	Asp	Ile	Gly	Tyr	280	285	290	295
Arg	Pro	Trp	Val	Arg	Gly	Gln	Ser	Ser	Arg	Ile	Gly	Ile	Tyr	Trp	Thr	300	305	310	315
Ile	Val	Lys	Pro	Gly	Asp	Ile	Leu	Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Gly	Asn	Leu	320	325	330	335
Ile	Ala	Pro	Arg	Gly	Tyr	Phe	Lys	Ile	Arg	Asn	Gly	Lys	Ser	Ser	Ile	340	345	350	355
Met	Arg	Ser	Asp	Ala	Pro	Ile	Gly	Asn	Cys	Ser	Ser	Glu	Cys	Ile	Thr	360	365	370	375
Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	Pro	Asn	Asp	Lys	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	Asn	Arg	380	385	390	395
Ile	Thr	Tyr	Gly	Ala	Cys	Pro	Arg	Tyr	Val	Lys	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	400	405	410	415
Leu	Ala	Thr	Gly	Met	Arg	Asn	Val	Pro	Glu	Lys	Gln	Thr	Arg	Gly	Ile	420	425	430	435
Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Val	440	445	450	455

Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Arg	His	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Thr	Gly	Gln
370						375					380				
Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	Gln	Ala	Ala	Ile	Asp	Gln	Ile	Asn	Gly
385					390					395				400	
Lys	Leu	Asn	Arg	Leu	Val	Glu	Lys	Thr	Asn	Glu	Lys	Phe	His	Gln	Ile
			405						410					415	
Glu	Lys	Glu	Phe	Ser	Glu	Val	Glu	Gly	Arg	Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Lys
			420					425					430		
Tyr	Val	Glu	Asp	Thr	Lys	Ile	Asp	Leu	Trp	Ser	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu
	435					440					445				
Leu	Val	Ala	Leu	Glu	Asn	Gln	His	Thr	Ile	Asp	Leu	Thr	Asp	Ser	Glu
	450				455						460				
Met	Asn	Lys	Leu	Phe	Glu	Arg	Thr	Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala
465				470					475					480	
Glu	Asp	Met	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Lys	Ile	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn
			485					490						495	
Ala	Cys	Ile	Gly	Ser	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	His	Asp	Val	Tyr
			500					505					510		
Arg	Asp	Glu	Ala	Leu	Asn	Asn	Arg	Phe	Gln	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Leu
	515					520						525			
Lys	Ser	Gly	Tyr	Lys	Asp	Trp	Ile	Leu	Trp	Ile	Ser	Phe	Ala	Ile	Ser
	530				535						540				
Cys	Phe	Leu	Leu	Cys	Val	Val	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Met	Trp	Ala	Cys
545				550					555						560
Gln	Lys	Gly	Asn	Ile	Arg	Cys	Asn	Ile	Cys	Ile					
			565					570							

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 22:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 39 bazės

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasitūlė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 22:

TGGTTGGTCG CCGTTTCTAA CGCGATTCCC GGGGGTACC

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 23:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 13 aminorūgščių

(B) TIPAS: aminorūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasitūlė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: peptidas

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 23:

Trp Leu Val Ala Val Ser Asn Ala Ile Pro Gly Gly Thr

1 5 10

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 24:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 43 bazių poros

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasitūlė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 24:

TGGTTAGTCG CCTGTCCTG CAGGCCAGAG AGGCCTTGGT ACC

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 25:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 18 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasitūlė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 25:

GTCGCCGTGT

18

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 26:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 18 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasialė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 26:

TAATTGGCCA GAGAGGCC

18

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 27:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 39 bazės

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasialė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 27:

GGGGGATCCG GTACCAGCAA AAGCAGGGA TAATTCTAT

39

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 28:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 38 bazės

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasialė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 28:

GGGGGTACCC CCGGGGACTT TCCAGGAAAT GACAACAG

38

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 29:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 44 bazės

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasialė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 29:

CCCGGTACCG AATCATCCTA GAAACAAGGG TGTTTTAAT TAAT

44

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 30:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 47 bazės

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasialė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 30:

GGGGAATTCG GTACCCCGG GAAGGCAATA ATTGTACTAC TCATGGT

47

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 31:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 36 bazės
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasialė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 31:

GGTACCCCCG GGGATCGAAT CTGCACTGGG ATAACA 36

(2) DUOMENYS APIE SEQ ID No: 32:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

- (A) ILGIS: 50 bazių
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) SIŪLŲ SKAIČIUS: vienasialė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 32:

GGGGAATTCG GATCCGGTAC CTCACAGACA GATGGARCAA GAAACATTGT 50

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Rekombinantinis gripo viruso HA0 hemagliutinino baltymas, ekspresuotas bakuloviruso ekspresijos sistemos pagalba vabzdžių ląstelių kultūroje.
2. Baltymas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad bakuloviruso signalinis peptidas prijungtas tiesiogiai prie HA0 baltymo be įsiterpiančių sekų.
3. Baltymas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi vaistiniu požiūriu tinkamą nešiklį ir yra paruoštas naudoti kaip vakcina.
4. Baltymas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi adjuvantą ir vaistiniu požiūriu tinkamą nešiklį ir yra paruoštas naudoti kaip vakcina.
5. Baltymas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad vaistiniu požiūriu tinkamas nešiklis yra polimerinė pateikimo sistema.
6. Baltymas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gripo virusas yra atrinktas iš grupės, sudarytos iš gripo viruso A ir B kamienų.
7. Baltymas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gripo virusas infekuoja žmones.
8. Baltymas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi antrąjį baltymą, kuris yra sulietas su hemagliutininu.
9. Baltymas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra atrinktas iš grupės, sudarytos iš hepatito B viruso baltymų, ŽIV baltymų, karcinoembrioninio antigeno ir neuraminidazės.
10. Vektorius, naudojamas rekombinantinio gripo viruso HA0 hemagliutinino baltymo gamybai, susidedantis iš šių 5' - >3' sekų: bakuloviruso polihebrino promotoriaus, ATG translacijos startinio kodono, signalinio peptido, sekų, koduojančių gripo viruso kamieno subrendusį hemagliutininą, translacijos terminacijos kodono ir polihebrino RNR poliadenilavimo signalo.

11. Vektorius pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo signalinis peptidas yra bakuloviruso baltymas, kurio molekulinė masė apie 61K ir aminorūgščių sekų rinkinys yra tarp pirmųjų 18 aminorūgščių, nurodytų Sekų Sąrašė ID No. 7.
12. Vektorius pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi signalinį peptidą, kuris yra gripo viruso hemagliutinino baltymo promotorius.
13. Vektorius pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo seka, koduojanti signalinį peptidą ir hemagliutininą, nekoduoja jokių įsiterpiančių aminorūgščių.
14. Vektorius pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi seką, koduojančią antrąjį baltymą, kuris yra ekspresuojamas kaip sulietas su hemagliutininu baltymas.
15. Vektorius pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra transfekuotas į kultivuojamas vabzdžių ląsteles.
16. Rekombinantinio gripo viruso hemagliutinino baltymo gavimo būdas, s u s i d e d a n t i s iš vabzdžių ląstelių kultūros užkrėtimo panaudojant vektorių, turintį šias 5' -> 3' sekas: bakuloviruso polihedrino promotoriaus, ATG translacijos startinio kodono, signalinio peptido, sekų, koduojančių gripo viruso kamieno, atrinkto iš grupės, sudarytos iš gripo viruso A ir B kamienų, hemagliutininą, translacijos terminacijos kodono ir polihedrino RNR poliadenilavimo signalo, ir ląstelių auginimo maitinančioje terpėje.
17. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad galima išskirti HA0 gripo viruso hemagliutinino baltymą iki mažiausiai 95% grynumo.
18. Būdas pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad baltymą gauna išskiriant hemagliutininą iš nemembraninių baltymų šarminiame pH, plaunant su membrana susijusius baltymus tam, kad būtų eliuotas hemagliutininas, išskiriant hemagliutininą iš kitų baltymų, pririšant juos prie anijonų kaitos celiuliozės keičiant druskos koncentraciją.

19. Vektoriaus, turinčio šias 5' -> 3' sekas: bakuloviruso polihedrinio promotoriaus, ATG translacijos startinio kodono, signalinio peptido, sekų, koduojančių gripo viruso kamieno, atrinkto iš grupės, sudarytos iš gripo viruso A ir B kamienų, hemagliutininą, translacijos terminacijos kodono ir polihedrinio RNR poliadenilimo signalo, gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad virusas surenkamas iš ląstelių kultūros terpės ir išskiriama arba gripo viruso A kamienų virusinė RNR, arba B kamienų mRNR; sintezuojama cDNR naudojant arba universalų pradmenį (5' - AGCAAAAGCAGG-3' (SEQ ID No. 1), kuomet dirbama su gripo viruso A kamienų virusine RNR, arba atsitiktinius pradmenis, kuomet dirbama su gripo viruso B kamienų mRNR, ir kuomet 5' ir 3' pradmenys turi tokius restrikcijos enzimų saitus galuose, kurie nerandami hemagliutininų genų viduje; amplifikuojami A arba B gripo viruso pradmenys ir gripo viruso cDNR sumaišant su hemagliutininio geno segmentais, tam, kad būtų gauti dvisiūliai DNR fragmentai, turintys sekas, koduojančias pilną subrendusį hemagliutininą; identifikuojamas hemagliutininio genų signalinis peptidas ir tuomet amplifikuojami hemagliutininio genai be signalinio peptido; ir klonuojami hemagliutininio genai be signalinio peptido vektoriuje, turinčiame savo sudėtyje AcNPV polihedrinio promotorių.
20. Būdas pagal 19 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad hemagliutininio genus klonuoja vektoriuje, panaudojant PCR tokiu būdu, kad vektorius koduotų signalinį peptidą, sujungtą tiesiogiai su hemagliutininu be įsiterpiančių aminorūgščių.
21. Būdas pagal 19 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad vektorių transfekuoja į vabzdžių ląsteles ir atrenka ląsteles, ekspresuojančias hemagliutininą.
22. Rekombinantinio HA0 hemagliutininio baltymas, ekspresuotas bakuloviruso ekspresijos sistemos pagalba vabzdžių ląstelių kultūroje, skirtas panaudoti vakcinacijai nuo gripo.

23. Baltymas pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudoja baltymą polimerinėje pateikimo sistemoje.
24. Baltymas pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gripo virusą atrenka iš grupės, sudarytos iš gripo viruso A ir B kamienų.
25. Baltymas pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gyvūną pasirenka iš grupės, kuriai priklauso žinduolių ir paukščių rūšys.
26. Baltymas pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gyvūnas yra žmogus.

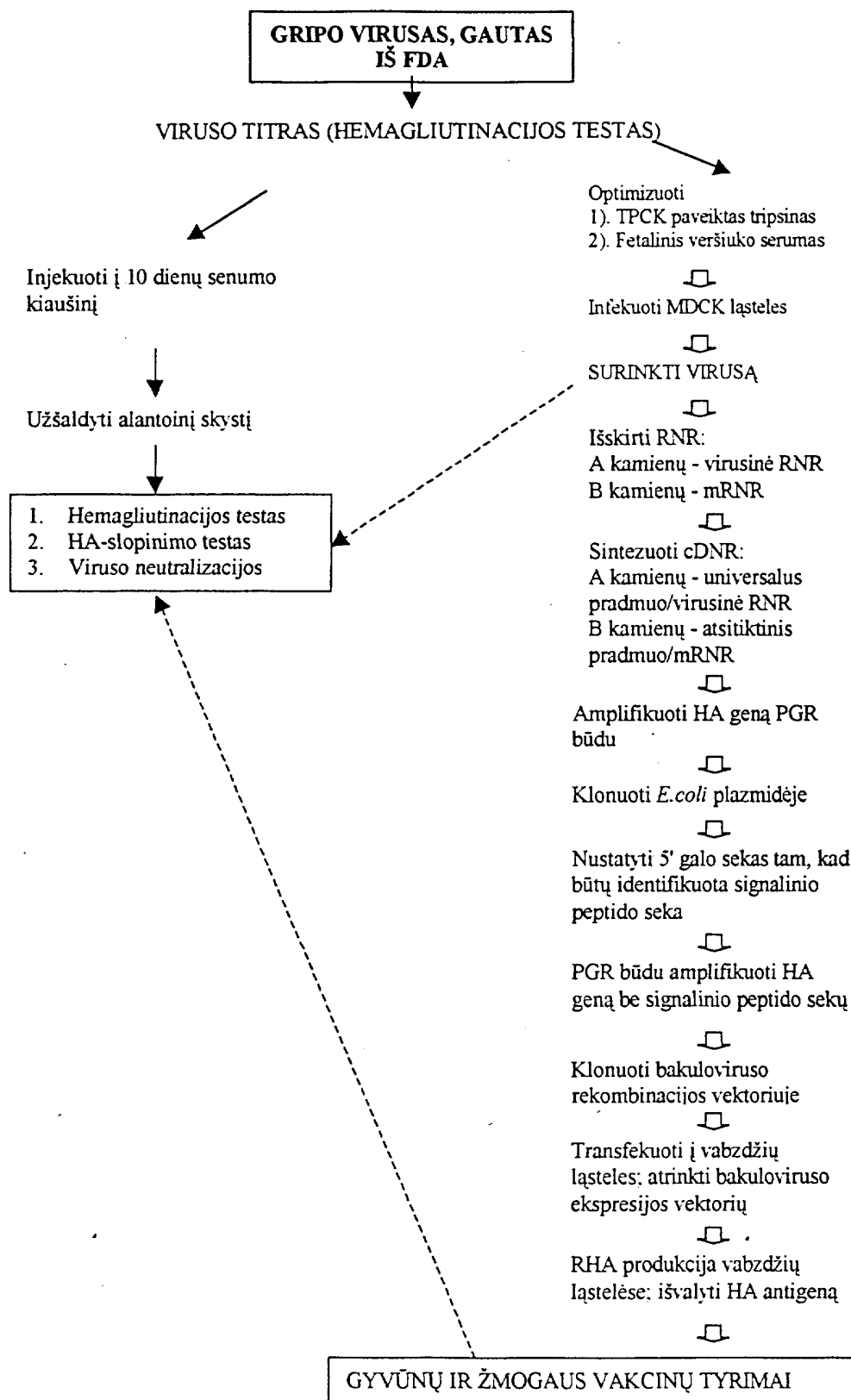
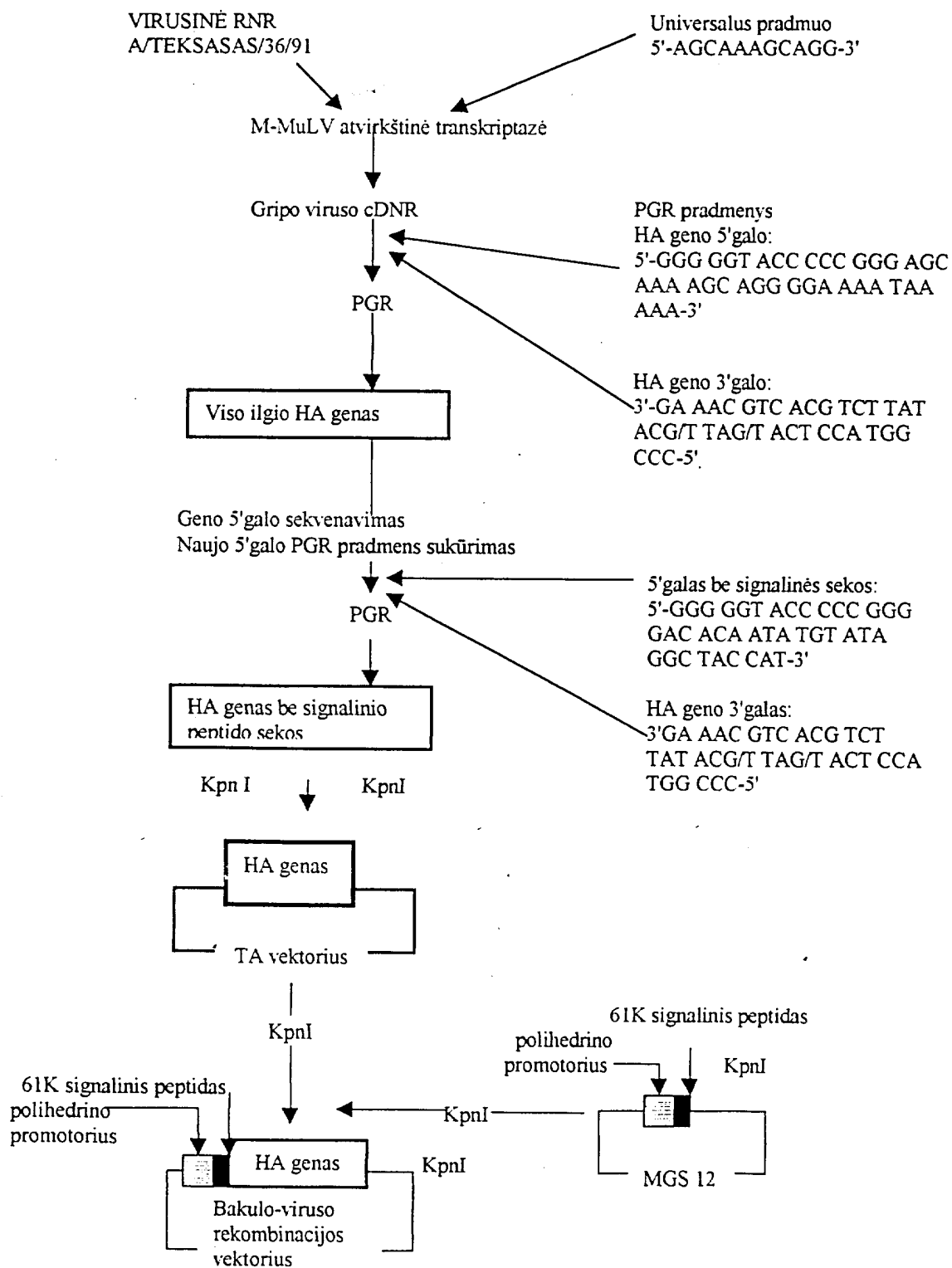


Fig. 1

Fig. 2

GRIPO VIRUSAS A/TEKSASAS/36/91



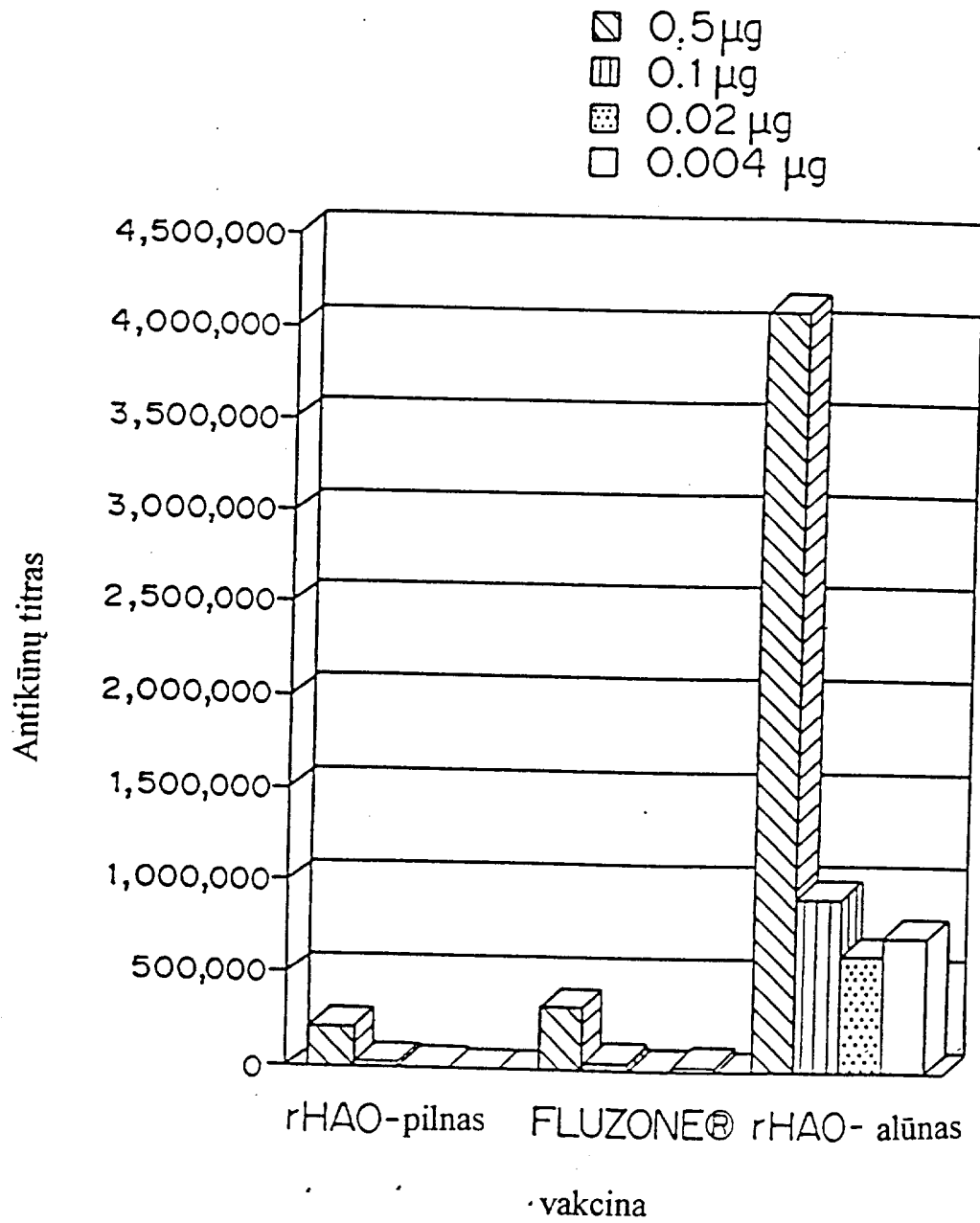


FIG. 3

4/5

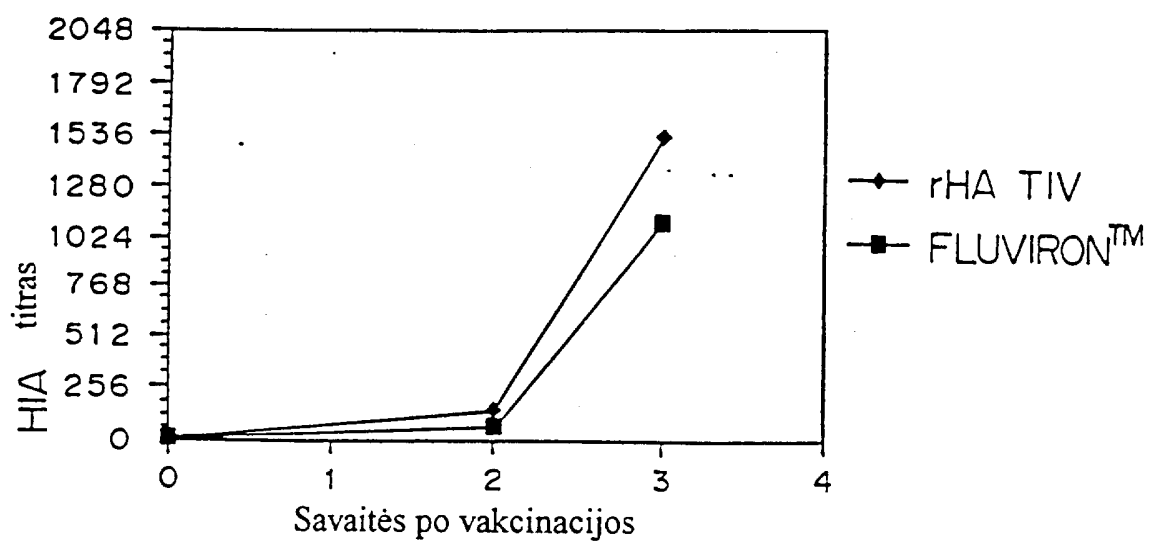


FIG. 4a

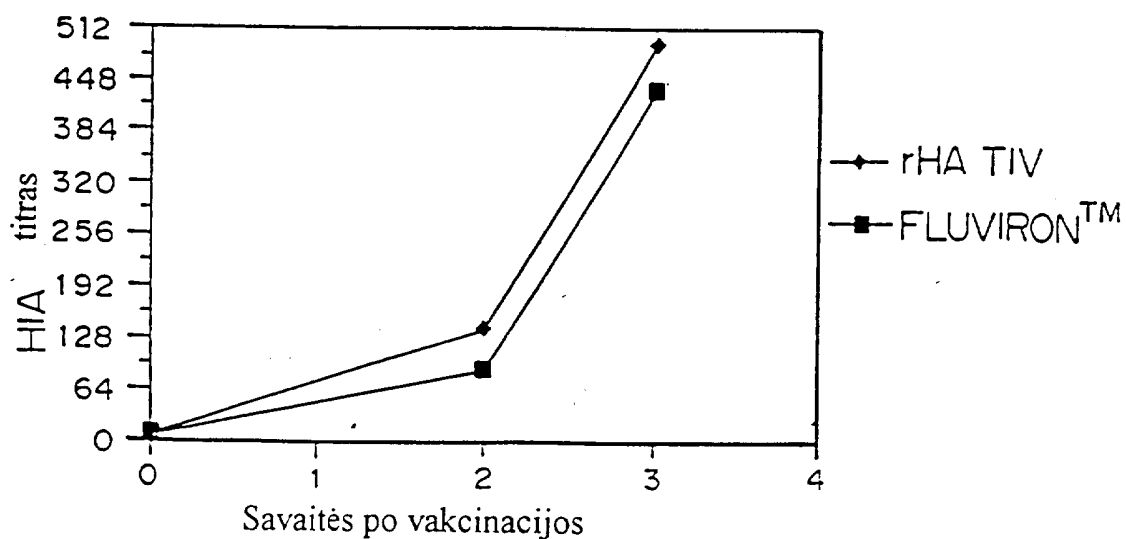


FIG. 4b

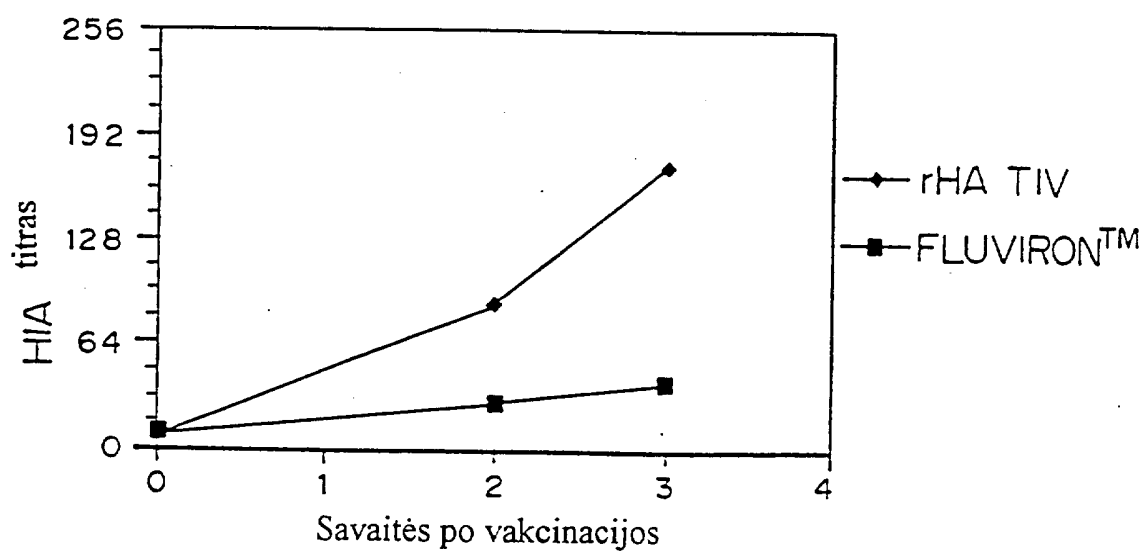


FIG. 4c