



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85373 (13) C2
(51) МПК (2009)

C07K 14/16 (2006.01)

C12N 15/62

A61K 39/21

C12N 15/863

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗЛИТИЙ ПРОТЕЇН РЕГУЛЯТОРНИХ/АКСЕСОРНИХ HIV ПРОТЕЇНІВ

1

2

(21) 20041109408

(22) 14.05.2003

(24) 26.01.2009

(86) PCT/EP03/05039, 14.05.2003

(31) PA 2002 00754

(32) 16.05.2002

(33) DK

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) ХАУЛІ ПОЛ, GB/AU, ЛЕЙПЕР СОНЬЯ, DE/DE,
ФЕЛДЕР ЄВА, DE/DE

(73) БАВАРІАН НОРДІК А/С

(56) WO 0206303 A, 24.01.2002

WO 0192470 A, 06.12.2001

ТАНТИНЕН М ЕТ АЛ: "DNA vaccination in mice using HIV-1 nef, rev and tat genes in self-replicating pBN-vector" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 15-16, 28 February 2001 (2001-02-28), pages 2039-2047, XP004316944 ISSN: 0264-410X

АУУАУУУ ВЕЛПАУДІ ЕТ АЛ: "Immunogenicity of a novel DNA vaccine cassette expressing multiple human immunodeficiency virus (HIV-1) accessory genes." AIDS (HAGERSTOWN), vol. 14, no. 1, 7 January 2000 (2000-01-07), pages 1-9, XP009014789 ISSN: 0269-9370

(57) 1. Злитий протеїн, який містить амінокислотну послідовність принаймні чотирьох HIV протеїнів, вибраних з Vif, Vpr, Vpu, Vpx, Rev, Tat і Nef, або похідні амінокислотної послідовності одного або кількох із зазначених протеїнів, де злитий протеїн не містить специфічні послідовності, розщеплювані клітинними протеазами, які можуть запустити генерацію HIV протеїнів, що мають природні N- та C-кінці, між амінокислотними послідовностями HIV протеїнів, що утворюють злитий протеїн, та де похідною амінокислотної послідовності HIV протеїну є амінокислотна послідовність, що показує гомологію принаймні 50 %, коли відповідну частину амінокислотної послідовності у злитому протеїні порівнюють з амінокислотною послідовністю відповідного HIV протеїну в HIV-1 ізоляті HXB2R (вхідний номер генетичного банку X03455).
2. Злитий протеїн за п. 1, який відрізняється тим, що гомологія становить принаймні 80 %.

3. Злитий протеїн, який містить амінокислотну послідовність принаймні чотирьох HIV протеїнів, вибраних з Vif, Vpr, Vpu, Vpx, Rev, Tat і Nef, або похідні амінокислотної послідовності одного або кількох із зазначених протеїнів, де злитий протеїн не містить специфічні послідовності, розщеплювані клітинними протеазами, які можуть запустити генерацію HIV протеїнів, що мають природні N- та C-кінці, між амінокислотними послідовностями HIV протеїнів, що утворюють злитий протеїн, та де похідною індивідуального HIV протеїну, що є частиною злитого протеїну, є амінокислотна послідовність, де не більше за 10 амінокислотних послідовностей видалені, вставлені або замінені для одержання HIV протеїну із зменшеною активністю або взагалі без будь-якої активності.

4. Злитий протеїн за будь-яким з пп. 1-3, який відрізняється тим, що HIV протеїни вибирають з Vif, Vpr, Vpx, Vpu, Rev та Tat.

5. Злитий протеїн за будь-яким з пп. 1-4, що містить амінокислотну послідовність HIV протеїнів Vif, Vpr, Vpu, Rev та Tat або похідні амінокислотної послідовності одного або кількох з цих протеїнів.

6. Злитий протеїн за будь-яким з пп. 1-5, який відрізняється тим, що амінокислотні послідовності принаймні двох із HIV протеїнів злиті одна з одною без додаткових амінокислот.

7. Злитий протеїн за будь-яким з пп. 1-6, який відрізняється тим, що амінокислотні послідовності принаймні двох з HIV протеїнів розділені принаймні однією додатковою амінокислотою.

8. Злитий протеїн за будь-яким з пп. 1-7, який відрізняється тим, що амінокислотна послідовність принаймні одного з HIV протеїнів злита з партнером, який не є HIV протеїном, вибраним з Vif, Vpr, Vpx, Vpu, Rev, Tat і Nef.

9. Нуклеїнова кислота, яка кодує злитий протеїн за будь-яким з пп. 1-8.

10. Нуклеїнова кислота за п. 9, яка відрізняється тим, що являє собою ДНК.

11. Нуклеїнова кислота за п. 10, яка відрізняється тим, що експресія злитого протеїну з ДНК контролюється регуляторними елементами, вибраними з

(13) C2

(11) 85373

(19) UA

еукаріотичного, прокаріотичного та вірусного промоторів.

12. Нуклеїнова кислота за п. 11, яка **відрізняється** тим, що вірусний промотор є поксвірусним промотором.

13. Нуклеїнова кислота за будь-яким з пп. 9-12, яка **відрізняється** тим, що нуклеїнова кислота додатково містить послідовність, кодуєчу принаймні один додатковий HIV протеїн, вибраний з Gag, Pol і Env.

14. Нуклеїнова кислота за п. 13, яка **відрізняється** тим, що нуклеїнова кислота містить послідовність, кодуєчу Gag, Pol і Env HIV протеїни.

15. Вектор, який містить нуклеїнову кислоту за будь-яким з пп. 9-14.

16. Вектор за п. 15, який **відрізняється** тим, що є вірусним вектором.

17. Вектор за п. 16, який **відрізняється** тим, що вірусний вектор є поксвірусним вектором, зокрема вектором вірусу коров'ячої віспи.

18. Вектор за п. 17, який **відрізняється** тим, що вектором вірусу коров'ячої віспи є модифікований Анкара вірус коров'ячої віспи (MVA).

19. Вектор за п. 18, який **відрізняється** тим, що MVA вибраний з MVA-575, депонованого в European Collection of Animal Cell Cultures (Європейська Колекція Культур клітин Тварин) під депозитним номером ECACC V00120707, та MVA-BN, депонованого в ECACC під номером V00083008.

20. Спосіб одержання протеїну за будь-яким з пп. 1-8, який включає такі стадії:

- трансфекцію клітини-хазяїна нуклеїною кислотою за будь-яким з пп. 9-14 або вектором за п. 15 або

- інфікування клітини-хазяїна вірусним вектором за будь-яким з пп. 16-19,

- експресію злитого протеїну у трансфікованій клітині-хазяїні або в інфікованій клітині-хазяїні, та

- відновлення злитого протеїну.

21. Клітина-хазяїн, трансфікована нуклеїною кислотою за будь-яким з пп. 9-14 або вектором за п. 15, або інфікована вірусним вектором за будь-яким з пп. 16-19.

22. Злитий протеїн за будь-яким з пп. 1-8, нуклеїнова кислота за будь-яким з пп. 9-14 або вектор за будь-яким з пп. 15-19 як ліки.

23. Злитий протеїн за будь-яким з пп. 1-8, нуклеїнова кислота за будь-яким з пп. 9-14 або вектор за будь-яким з пп. 15-19 як вакцина.

24. Вакцина, яка містить злитий протеїн за будь-яким з пп. 1-8, нуклеїнову кислоту за будь-яким з пп. 9-14 або вектор за будь-яким з пп. 15-19.

25. Застосування злитого протеїну за будь-яким з пп. 1-8, нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 9-14 або вектора за будь-яким з пп. 15-19 для приготування вакцини.

Винахід стосується злитих протеїнів, які містять амінокислотну послідовність принаймні чотирьох HIV протеїнів, вибраних з Vif, Vpr, Vpu, Vpx, Rev, Tat та Nef, або похідні амінокислотної послідовності одного або більше зазначених протеїнів, де злитий протеїн не перетворений до індивідуальних HIV протеїнів, які мають природні N і C кінці. Також винахід стосується нуклеїнових кислот, що кодуєть зазначені протеїни, векторів, що містять зазначені нуклеїнові кислоти, і способів одержання зазначених протеїнів. Злитий протеїн, нуклеїнові кислоти і вектори придатні для застосування як вакцини для принаймні часткової профілактики проти інфікування HIV.

Вірус імунodefіциту людини (HIV) - це агент, що спричиняє Синдром Набутого Імунodefіциту (СНІД). Подібно до всіх ретровірусів геном вірусу кодує Gag, Pol та Env протеїни. Крім того, вірусний геном також кодує регуляторні протеїни, наприклад, Rev та Tat, так само як і аксесорні протеїни, наприклад, Vpr, Vpx, Vpu, Vif і Nef.

Не дивлячись на зусилля охорони здоров'я контролювати розповсюдження СНІДУ, кількість нових епідемічних заражень, все ще зростає. В кінці 2000 року Світова Організація Здоров'я оцінила глобальну епідемію в 36,1 мільйона інфікованих індивідумів, що на 50% більше, ніж було передбачено на підставі даних попереднього десятиріччя (WHO&UNAIDS. UNAIDS, 2000). В 2000 році кількість нових HIV-1 інфікованих в світі оцінено в 5,3 мільйона.

Зважаючи на стійке розповсюдження епідемії, все ще є необхідність у виділенні ефективної вакцини для клінічних цілей. На сьогодні цілий ряд різних стратегій виділення вакцини HIV-1, як наприклад, нові вектори або стимуляторні (адьювантні) системи, був розроблений і оцінений в різних передклінічних дослідженнях, так само як і в клінічних випробуваннях. Перший кандидат у вакцину, за яким проводилась третя фаза клінічних випробувань, базується на gp 120 протеїну в оболонці з галуна [Francis et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 1998; 14 (Suppl 3) (5): S325-31]. Хоча насправді вакцина не проявила себе успішно у більш ранніх випробуваннях фази II, але випробування фази III були запуснені.

Зусиллями багатьох наступних років профілактична вакцина базується на антигенах оболонки, останнім часом зусилля сфокусовані на застосуванні регуляторних білків, таких, як наприклад Tat, Nef та Rev як кандидатів у вакцинні антигени. Застосування цих регуляторних антигенів в терапевтичних дослідженнях проводяться декілька років [Miller et al., Nature Medicine 1997,3, 389-94, Calarota et al., Lancet 1998, 351, 1320-5, Ayyavoo et al., AIDS, 2000,14, 1-9]. Нещодавні вивчення у невеликих передклінічних випробуваннях застосування цих антигенів в профілактичній вакцинні є обіцяючими. Застосування Tat та Rev, або тільки Tat, як кандидатів у профілактичні вакцини продемонструвало контроль за SIVmac [Osterhaus et al., Vaccine 1999, 17, 2713-4]. Крім того, встановлено, що

CTL, направлений на ранні регуляторні вірусні протеїни, є важливим для виділення інфікованих клітин до продукування ними високого рівня зрілих віріонів [van Baalen et al., J. Gen. Virol 1997, 78, 1913-8; Addo et al., PNAS, 2001, 98, 1781-6].

Хоча регуляторні/аксесорні HIV протеїни індують ефективну імунну відповідь, більшість з них, якщо не всі, мають серйозні побічні ефекти, які дотепер обмежують їх використання як вакцин: було продемонстровано, що Nef, Tat та Vpr приймають участь в нижньому регулюванні експресії CD4+ та/або MHC класу I [Howcroft et al., Science, 1993, 260, 1320-2; Schwartz et al., Nature Med. 1996, 2, 338-42; Swann et al., Virology, 2001, 282, 267-77; Janvier et al., J. Virol., 2001, 75, 3971-6; Weissmann et al., PNAS 1998, 95, 11601-6]. Відомо, що Tat здійснює сильну імунну супресію in vivo (Cohen et al., PNAS, 1999, 96, 10842-10847). Імуносупресивні ефекти також були описані для Vpr [Auyavoo et al., Nature Med., 1997, 3: 1117-1123]. Було описано, що Vpr та Vpx виявляють відмінні цитостатичні та цитотоксичні ефекти в клітинах дріжджів [Zhang et al., Virology, 1997, 230, 103-12]. Тому здається, що більшість з асесорних/регуляторних HIV протеїнів, якщо не всі, мають функціональні властивості, які є небажаними при одержанні вакцини.

Спроби зменшити небезпечні впливи HIV протеїнів розкриті у WO 02/06303. Зокрема WO 02/06303 розкриває злитий протеїн, який включає амінокислотні послідовності HIV Vif, Vpr і Nef, в якому складові протеїни суміжні з іншим складовим протеїном або відокремлені нескладовими протеїнами, такими, як наприклад амінокислотні послідовності, які складають протеолітично розщеплювані сайти. Встановлено, що краще використовувати такі злиті протеїни, котрі містять протеолітично розщеплювані сайти між складовими протеїнами. Оскільки складові протеїни розділені протеолітично розщеплюваними сайтами, то продукування нативних HIV протеїнів, як відомо, буде шкідливим. Щоб зменшити будь-які небезпечні впливи НТВ протеїнів, що є наслідком розщеплення злитого протеїну, WO 02/06303 пропонує використовувати ослаблені протеїни. Тому, WO 02/06303 вчить використовувати злитий протеїн, який містить Vif, Vpr і Nef HIV протеїни, в якому розщеплювані сайти вставлені між HIV протеїнами, і в якому HIV протеїни - це ослаблені протеїни. Проте, недоліком ослаблених протеїнів є те, що амінокислотна послідовність ослабленого протеїну відрізняється від амінокислотної послідовності нативного протеїну, так що імунізація ослабленим протеїном може привести до імунної відповіді, яка тільки слабо розпізнає нативний протеїн або яка навіть не розпізнає нативний протеїн взагалі.

Метою даного винаходу є одержання вакцини, яка дозволяє генерувати ефективну імунну відповідь, зокрема ефективну цитотоксичну відповідь Т-клітин проти деякої кількості або усіх регуляторних/аксесорних HIV протеїнів, в якій вакцинні регуляторні/аксесорні НТВ протеїни або продуковані цією вакциною протеїни є менш функціональними ніж нативні індивідуальні регуляторні/аксесорні протеїни, для того щоб зменшити ризик проявлен-

ня небажаних побічних ефектів асесорних/регуляторних протеїнів у вакцині, і в якій менш активні HIV протеїни індують подібну імунну відповідь до відповіді, яку індуюють нативні HIV протеїни.

Ця мета була досягнута одержанням злитого протеїну, що містить амінокислотну послідовність принаймні чотирьох різних HIV протеїнів, вибраних з Vif, Vpr, Vpu, Vpx, Rev, Tat і Nef або похідних амінокислотної послідовності одного або більше зазначених протеїнів, в яких злитий протеїн неперетворюється до індивідуальних HIV протеїнів, які мають природні N і C кінці. Зокрема мета даного винаходу була досягнута завдяки нуклеїновим кислотам та векторам, що кодують зазначені злиті протеїни.

Якщо злитий протеїн продукується в тваринних клітинах, включаючи людські клітини, злитий протеїн не розрізається целюлярними протеазами в такий спосіб, щоб утворилися асесорні/регуляторні протеїни з нативними N- та C-кінцями.

Завдяки тому факту, що HIV протеїн, який є частиною злитого протеїну, має змінену вторинну/третинну структуру порівняно з індивідуальним HIV протеїном, HIV протеїн в злитому протеїні є менш функціональним ніж індивідуальний протеїн, якщо не повністю дисфункціональним. Регуляторний/аксесорний протеїн, який є менш функціональним або навіть не функціональним взагалі, не має небажаних побічних ефектів НТВ протеїну в його нативній структурі. Що стосується імуногенності, не має ніякої суттєвої різниці, коли імуногенність злитого протеїну порівнюється з імуногенністю індивідуальних регуляторних/аксесорних HIV протеїнів, які утворюють злитий протеїн. Зокрема, не має ніякої суттєвої різниці, що стосується відповіді цитотоксичної Т клітини (CTL), оскільки епітопи, які присутні в імунній системі, є ідентичними. Також застосовують ті ж самі міркування, коли злитий протеїн вводять пацієнту.

В контексті даного винаходу термін "HIV" застосовується до будь-якої групи HIV, підтипу (clade), штаму або ізоляту, відомим спеціалісту в даній галузі. Зокрема HIV може бути HIV-1 або HIV-2. HIV-1 був класифікований в дев'яти підтипах (від А до І), тоді як HIV-2 був класифікований в п'яти підтипах (від А до Е), які цілком покриваються контекстом даного винаходу. Переважними підтипами HIV згідно з дійсним винаходом є HIV-1 підтипи А, В і С Проте, винахід не обмежений підтипами, яким віддається перевага.

Послідовності регуляторних HIV протеїнів Vif, Vpr, Vpu, Rev, Tat, Vpx і Nef відомі спеціалісту, обізнаному в даній галузі.

Посилання на різні послідовності, розкриті в базі даних генетичного банку, зокрема на послідовність HIV-I ізоляту HXB2R, який має вхідний номер генетичного банку K03455, наводяться з метою продемонструвати винахід, а не обмежити його зазначеними втіленнями. Під цим вхідним номером генетичного банку вказані послідовності різних генів HIV-1 і протеїнів, кодованих зазначеними генами.

Переважають HIV протеїни, які утворюють злитий протеїн, отримані від того ж самого підтипу. Згідно з альтернативним прикладом здійснення винаходу HIV протеїни, які утворюють злитий протеїн, отримані від двох або більше підтипів. Також можливо, що один або більше HIV протеїнів, які утворюють злитий протеїн, - це HIV-1 протеїни, і що один або більше HIV протеїнів, які утворюють злитий протеїн, - це HIV-2 протеїни.

Амінокислотні послідовності HIV протеїнів, які утворюють злитий протеїн, - це переважно послідовності, які кодуються відомими HIV ізолятами, тобто амінокислотна послідовність HIV протеїнів в злитому протеїні ідентична амінокислотним послідовностям відповідних протеїнів, що кодуються HIV ізолятами природного походження. Крім того, амінокислотна послідовність одного або більше HIV протеїнів в злитому протеїні може бути узагальнюючою типовою послідовністю, тобто послідовністю, що, як така, не може бути знайдена у відомому HIV ізоляті, але яка демонструє оптимальну гомологію - зокрема, що стосується CTL-епітопів - до окремих або всіх відомих HIV ізолятів. Комп'ютерні алгоритми для вираховування узагальнюючих типових послідовностей добре відомі спеціалістам в даній галузі.

В крім того, втіленні злитий протеїн може містити похідні амінокислотних послідовностей одного або більше HIV протеїнів, які є частиною злитого протешу. Термін "похідна амінокислотна послідовність HIV протеїну", що використовується в даному описі винаходу, відноситься до HIV протеїнів, які мають змінену амінокислотну послідовність, порівняно з відповідними HIV протеїнами, що зустрічаються в природі. Змінена амінокислотна послідовність може бути послідовністю, в якій одну або більше амінокислот послідовності HIV протеїну замінено, вставлено або видалено. Більш конкретно, "похідна амінокислотна послідовність HIV протеїну" є амінокислотною послідовністю, що показує гомологію принаймні 50%, більш переважно, принаймні 70%, навіть більш переважно, принаймні 80%, краще всього, принаймні 90%, коли відповідна частина амінокислотної послідовності в злитому протеїні порівняна з амінокислотною послідовністю відповідного HIV протеїну відомого HIV ізоляту. Амінокислотна послідовність розглядається як така, що має вищевказану гомологію, навіть якщо гомологія знайдена для відповідного протеїну тільки одного HIV ізоляту, незалежно від того, що відповідні протеїни в інших ізолятах можуть показувати більш низьку гомологію. Як приклад, якщо похідна Vpr в злитому протеїні показує 95% гомологію до послідовності Vpr одного HIV ізоляту, але тільки 50-70% гомологію до (всіх) інших HIV ізолятів, гомологія вказаного похідного Vpr розцінена як принаймні 90%.

Це було вказано вище, що HIV протеїни в злитому протеїні мають меншу активність або навіть вона відсутня взагалі порівняно з індивідуальними протеїнами, оскільки структура протеїнів в злитому протеїні відрізняється від природної структури біологічно активних протеїнів. Проте, бажаним для зниження ризику може бути те, що HIV протеїни в злитому протеїні біологічно активні. Для цієї мети

особливо переважними "похідними" індивідуальних HIV протеїнів, що є частиною протеїну згідно з винаходом, є похідні амінокислотних послідовностей, в яких декілька амінокислот видалено, вставлено або замінено, більш переважно не більше ніж 10 амінокислот, краще всього не більше ніж 5 амінокислот, для того, щоб отримати HIV протеїн зі зниженою активністю або без активності взагалі. Тести, придатні для того, щоб визначити, чи має HIV протеїн знижену біологічну активність, добре відомі спеціалістам в даній галузі.

Молекулярний механізм Vif протеїну, який є суттєвим для реплікації вірусу *in vivo*, залишається невідомим, але Vif має сильну тенденцію до самоасоціації. Як було показано, ця мультимеризація є важливою для Vif функції у життєвому циклі вірусу [Yang S. et al., *J Biol Chem* 2001; 276: 4889]. Більше того, було показано, що Vif особливим чином зв'язується з вірусним нуклеопротеїновим комплексом і це може бути функціонально суттєво [Khan M.A. et al., *J Virol* 2001; 75 (16): 7252-65]. Тому, vif протеїн зі зниженою активністю демонструє знижену мультимеризацію та/або асоціацію з нуклеопротеїновим комплексом.

Vpr протеїн грає важливу роль у вірусному життєвому циклі. Vpr регулює ядерний імпорт вірусного передінтеграційного комплексу і полегшує інфікування неподільних клітин, як наприклад макрофагів [Agostini et al., *ADDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18 (4): 283-8]. Крім того, він має трансактиваційну активність, опосередковану взаємодією з LTR [Vanitharani R. et al., *Virology* 2001; 289 (2): 334-42]. Тому, Vpr зі зниженою активністю демонструє зниження або навіть відсутність трансактивації та/або взаємодії з вірусним передінтеграційним комплексом.

Vpx, який є надзвичайно гомологічним до Vpr, також є вирішальним для ефективної вірусної реплікації в неподільних клітинах. Vpx упакований у вірусних частинках через взаємодію з р6 доменом gag прекурсора поліпротеїну. Подібно до Vpr, Vpx залучений в процес перенесення передінтеграційного комплексу в ядро [Mahalingam і інші., *J. Virol* 2001; 75 (1): 362-74]. Тому, Vpx зі зниженою активністю має знижену здатність зв'язуватися з передінтеграційним комплексом через gag прекурсор.

Як відомо, Vpr протеїн взаємодіє з цитоплазматичним відростком CD4 і викликає деградацію CD4 [Bour et al., *Virology* 1995; 69 (3): 1510-20]. Таким чином, Vpr зі зниженою активністю має зменшену здатність запустити деградацію CD4.

Релевантна біологічна активність добре охарактеризованого Tat протеїну - це трансактивація транскрипції через взаємодію з елементом трансактиваційної відповіді (TAR). Продемонстрували, що Tat здатний трансактивувати гетерологусні промотори, що відчувають недолік послідовностей HIV, інакше ніж TAR [Han P. et al., *Nucleic Acid Res* 1991; 19 (25): 7225-9]. Тому, Tat протеїн зі зниженими показами активності демонструє зниження трансактивації промоторів через TAR елемент.

Nef протеїн є суттєвим для вірусної реплікації, відповідальною за прогресування хвороби, викликаючи падіння упорядкування зовнішньої поверхні клітин CD4 [Lou T et al., *J Biomed Sci* 1997; 4 (4):

132]. Це падіння упорядкування ініціюється прямою взаємодією між CD4 і Nef [Preusser. et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292 (3): 734-40]. Тому, Nef протеїн зі зниженими показами активності демонструє знижену взаємодію з CD4.

Релевантною функцією Rev є післятранскрипційна трансактивація, ініційована взаємодією з елементом Rev-відповіді (RRE) вірусної РНК [Iwai et al., 1992; *Nucleic Acids Res* 1992; 20 (24): 6465-72]. Тому, Rev зі зниженою активністю показує зменшену взаємодію з RRE.

Злиті протеїни згідно з дійсним винаходом містять амінокислотну послідовність принаймні чотирьох різних HIV протеїнів, вибраних з Vif, Vpr, Vpu, Rev, Vpx, Tat і Nef. Більш переважно, злитий протеїн може містити 5, 6 або всі зазначені HIV протеїни. Розташування HIV протеїнів в злитому протеїні не є суттєвим.

Один або більше із принаймні чотирьох різних HIV протеїнів можуть міститися в злитому протеїні в двох або більше копіях. Тому, як приклад, злитий протеїн згідно з дійсним винаходом може містити Vif, Vpr, Vpu і дві копії Rev. Амінокислотні послідовності двох або більше копій HIV протеїну можуть бути ідентичними. Крім того, амінокислотні послідовності копій можуть бути різними, зокрема, якщо використовуються послідовності, отримані від різних HIV штамів або підтипів (наприклад одна копія Rev HIV-1 і одна копія Rev HIV-2).

Сусідні HIV протеїни в злитому протеїні можуть об'єднуватися без аксесорних амінокислот або об'єднуватися таким чином, що два сусідні HIV протеїни в злитому протеїні розділені, як мінімум, однією аксесорною амінокислотою. В межах контексту даного винаходу також можуть бути їх комбінації. Як приклад, в злитому протеїні згідно з дійсним винаходом, який містить амінокислотну послідовність чотирьох HIV протеїнів, два сусідні HIV протеїни можуть безпосередньо зв'язуватися один з одним, тоді як третій і четвертий HIV протеїни зв'язані через аксесорні амінокислоти. Термін "аксесорна (додаткова) амінокислота" в контексті даного опису винаходу відноситься до амінокислот, що не знайдені в цьому положенні в HIV протеїнах, які зустрічаються в природі.

Тому, злитий протеїн згідно з даним винаходом переважно має наступну основну формулу:

+P1---P2---P3---P4---P5*---P6*---P7*+,

де від P1 до P7 - це різні HIV протеїни, вибрані з Vif, Vpr, Vpx, Vpu, Tat, Rev і Nef, коли злитий протеїн складається принаймні з чотирьох різних зазначених HIV протеїнів, тобто від P1 до P4 і необов'язково один (P5*), два (P5*---P6*) або три (P5*---P6*---P7*) аксесорні зазначені HIV протеїни. Аббревіатура "----" незалежно означає від 0 до n аксесорних амінокислот. Коли "----" означає 0 амінокислот, сусідні HIV протеїни безпосередньо з'єднуються один з одним без аксесорних амінокислот. Коли "----" означає від 1 до n амінокислот, сусідні HIV протеїни розділяються однією або η амінокислотами. Верхній ліміт аксесорних амінокислот, тобто ціле число n, залежить від максимального розміру злитого протеїну, який може продукуватися в клітинах.

Згідно з одним варіантом втілення всі "----" означають, незалежно, від 0 до 20, більш переважно - від 0 до 10, ще краще - від 0 до 5 аксесорних амінокислот.

Згідно з альтернативним прикладом здійснення винаходу принаймні один з "+----" означає амінокислотну послідовність додаткового протеїну або його частину, який не є HIV протеїном, вибраним з Vif, Vpr, Vpx, Vpu, Rev, Tat і Nef. Тому, згідно з цим альтернативним втіленням додатковий протеїн з обох боків оточений регулярними/аксесорними HIV протеїнами. Додатковий протеїн може бути будь-яким протеїном. Більш переважно додатковий протеїн містить додаткові епітопи, які можуть допомагати індукувати кращу імунну відповідь проти HIV. Тому, додатковий протеїн може бути HIV Env, Gag та/або Pol протеїном або їх частинами. В цьому контексті термін "частина" Env, Gag і Pol застосовується до амінокислотної ділянки, отриманої від одного із вказаних протеїнів, яка містить принаймні один епітоп. Більш переважно, термін "частина" застосовується до принаймні 10, навіть більш переважно до принаймні 20, краще всього до принаймні 50 амінокислот, взятих від одного із зазначених протеїнів. Згідно зі спорідненим прикладом здійснення винаходу принаймні один з "----" означає амінокислотну послідовність одного або більше P1-P7 протеїнів, які є частиною злитого протеїну. Тому, в даному випадку злитий протеїн може містити одну або більше копій одного або більше протеїнів, які є частиною злитого протеїну. Як вказано, копії протеїнів можуть або не можуть мати ідентичні амінокислотні послідовності.

У наведеній вище формулі аббревіатура "+" незалежно означає від 0 до n додаткових термінальних амінокислот. Тому, злитий протеїн згідно з дійсним винаходом може або не може містити додаткові амінокислоти на C та/або N-кінцях протеїну. Згідно з одним прикладом здійснення винаходу один з "+" означає амінокислотну послідовність додаткового протеїну або його частину, який не є HIV протеїном, вибраним з Vif, Vpr, Vpx, Vpu, Rev, Tat і Nef. Тому, згідно з цим втіленням злитий протеїн містить на C та/або N-кінцях додатковий протеїн, який не є Vif, Vpr, Vpx, Vpu, Rev, Tat або Nef. Додатковий протеїн може бути будь-яким протеїном. Більш переважно додатковий протеїн містить аксесорні епітопи, які допомагають індукувати кращу імунну відповідь проти HIV.

Додатковий протеїн може бути Env, Gag та/або Pol HIV протеїном або їх частиною. В цьому контексті термін "частина Env, Gag і Pol" застосовується до амінокислотної ділянки, отриманої від одного із вказаних протеїнів, яка містить принаймні один епітоп. Більш переважно термін частина застосовується до принаймні 10, навіть більш переважно до принаймні 20, краще всього до принаймні 50 амінокислот від одного із зазначених протеїнів.

Згідно з альтернативним прикладом здійснення винаходу принаймні один з "+" означає амінокислотну послідовність, завдяки якій стає можливим легко виявляти або очищати злитий протеїн. Тому, принаймні один з "+" може бути таким, як, наприклад, His. Згідно з дійсним винаходом злитий

протеїн не перетворюється до індивідуальних HIV протеїнів, що мають природні N- та С-кінці. Більш переважно, злитий протеїн згідно з дійсним винаходом не перетворюється до індивідуальних HIV протеїнів, що мають природні N- та С-кінці, коли експресується в людських клітинах. Методи для перевірки того, чи злитий протеїн, коли експресується в людських клітинах, перетворюється до індивідуальних HIV протеїнів, що мають природні N- та С-кінці, відомі спеціалісту, обізнаному в даній галузі техніки. В цьому контексті посилення робиться на Ayyavoo et al., AIDS 2000, 14, 1-9, зокрема на експеримент, розкритий на Фіг.2 вказаної публікації. Стисло, спеціаліст в даній галузі техніки може легко здійснити експресію відповідного злилого протеїну в людських клітинах, як наприклад клітинах HeLa; клітини після цього лізують і клітинні лізати потім є об'єктами для Western блотінг-ових експериментів та імунопреципітатних аналізів із специфічними антитілами до індивідуальних HIV протеїнів, які разом утворюють відповідний злитий HIV протеїн. Для злилого протешу згідно з дійсним винаходом не знайдена яка-небудь суттєва кількість HIV протеїнів, розмір яких відповідає розміру індивідуального регуляторного/аксесорного HIV протешу. Для гарантування того, що злитий протеїн згідно з дійсним винаходом не перетворюється до індивідуальних HIV протеїнів, що мають природні N- і С-кінці, злитий протеїн між амінокислотними послідовностями HIV протеїнів, які утворюють цей злитий протеїн, не повинен містити специфічні послідовності, розщеплювані клітинними протеазами, які можуть запустити генерацію HIV протеїнів, що мають природні N- та С-кінці. Тому, амінокислотна послідовність "----" як аббревіатура у вищенаведеній основній формулі не повинна містити послідовності, специфічно розщеплювані клітинними протеазами, які можуть запустити генерацію HIV протеїнів, що мають природні N- та С-кінці. Зокрема злитий протеїн не містить розщеплювану послідовність REKRAVVG (амінокислоти позначені одиноким буквенним кодом) між амінокислотними послідовностями різних HIV протеїнів, які утворюють злитий протеїн. Інші послідовності, розщеплювані клітинними протеазами, відомі спеціалістам, обізнаним в даній галузі техніки. Тому, спеціаліст в даній галузі може легко уникнути включення розщеплюваних клітинними протеазами послідовностей, які можуть привести до індивідуальних HIV протеїнів, що мають природні N- та С-кінці. Прикладом такої послідовності, розщеплюваної цистеїнпротеазою, є Ile/Ieu-X-Thr-X-Gly.

Протеїни згідно з дійсним винаходом не містять специфічно розщеплювані послідовності, які приводять до HIV протеїнів, що мають обидва, нативний N- та С-кінці. Проте, це загалом не виключає присутність розщеплюваних клітинними протеазами ділянок між протеїнами в злитому протеїні, поки ці розщеплювані ділянки не є посередниками генерації HIV протеїнів, що мають як природні N-кінці, так і природні С-кінці. Зокрема, амінокислотна послідовність "----" як аббревіатура у вищенаведеній основній формулі може містити ділянки, розщеплювані протеазами, які залучені в генерацію коротких пептидів, присутніх в МНСІ або

МНСІІ. Згідно з цим прикладом здійснення винаходу результатом реакції розщеплення є короткий пептид довжиною переважно менше ніж 20 амінокислот, N- або С-кінці якого можуть відповідати N- або С-кінцям одного з аксесорних/регуляторних HIV протеїнів. Проте, ці короткі пептиди, коли виробляються протягом процесу індикації антигенів, більше не мають активності HIV протеїну, від якого вони отримані.

Винахід, крім того, стосується нуклеїнових кислот, що кодують вищевизначені злиті протеїни згідно з дійсним винаходом. Нуклеїнові кислоти можуть бути ДНК або РНК. Переважно, нуклеїнова кислота - це ДНК, якщо мається на увазі вставити нуклеїнову кислоту в людські клітини, використовуючи ДНК вектор, такий як плазміда, або вектор, що базується на вірусній ДНК.

Спеціалісту, обізнаному в даній галузі техніки, відомі методи конструювання нуклеїнової кислоти, кодуєщої злитий протеїн згідно з дійсним винаходом. Без зв'язування з наступними методами, спеціаліст в даній галузі може почати з HIV геномного клону, з HIV субгеномного клону або з будь-якого стартового матеріалу, такого як плазміди, які містять кодуєчу послідовність одного або більше регуляторних/аксесорних HIV протеїнів. Якщо кодуєча послідовність регуляторного/аксесорного протеїну знаходиться у формі неперервної рамки зчитування, вказана кодуєча послідовність може бути ізольована шляхом розщеплення нуклеїнової кислоти, яка містить вказану кодуєчу послідовність, придатними рестриктазними ензимами. Тому отримані фрагменти ДНК можуть використовуватися для подальшого клонування. Крім того, кодуєчі аксесорний/регуляторний протеїн послідовності можуть бути одержані, використовуючи методи ланцюгової реакції полімеризації (PCR) з придатними праймерами. Якщо регуляторні/аксесорні протеїни кодуються більше ніж одним екзоном, як у випадку з Tat і Rev, може бути необхідним незалежне клонування різних екзонів з наступним їхнім об'єднуванням при формуванні неперервної рамки зчитування для регуляторного/аксесорного протеїну, або використання технології зворотної транскрипції, як наприклад RT-PCR.

Кодуюча послідовність також може бути забезпечена синтезом гена, тобто формуванням гена з використанням набору комплементарних олігануклеотидів та/або олігануклеотидів, що перекриваються.

Для того, щоб отримати злитий протеїн, нуклеїнова кислота, що кодує вказаний злитий протеїн, переважно містить неперервну рамку зчитування. Тому, усі термінуючі кодони, крім останньої послідовності, яка кодує HIV протеїни або аксесорні протеїни, переважно видозмінюються в кодони, що кодують амінокислоту, або видалені взагалі. Переважно, це може легко досягатися, якщо використовуються специфічні PCR праймери, які ампліфікують кодуєчу послідовність без термінуючого кодону. Іншими словами, згідно з цією альтернативою розміщений в напрямку транскрипції (downstream) праймер не є комплементарним транскрипційному кодону. Таким чином, ампліфікований

фрагмент ДНК не міститиме транскрипційний кодон і може клонуватися в клонууючий вектор. Як альтернатива, також можливе клонування кодувочої послідовності з її термінуючим кодоном в клонууючий вектор, пізніше термінуючий кодон може бути вилучений, наприклад, використовуючи специфічні ендонуклеази або мутагенізацію.

Результатом етапів клонування повинна бути непереривна рамка зчитування, кодує злитий протеїн згідно з даним винаходом.

Регуляторні елементи, необхідні для одержання експресії злитого протеїну, можуть бути будь-якими регуляторними елементами, які спонукають експресію в бажаних експресійних системах. Якщо мається на увазі продукування злитого протеїну в прокаріотичних клітинах, таких як *Escherichia coli*, найкраще використовувати бактерійний або фаговий промотор. Якщо мається на увазі продукування злитого протеїну в еукаріотичних клітинах, найкраще використовувати еукаріотичний або вірусний промотор/енхансер. Якщо мається на увазі експресія злитого протеїну з використанням поксвірусного промотору (дивись нижче) найкраще використовувати поксвірусний промотор, такий як 7.5 промотор або АТІ промотор.

Як вказано вище, злитий протеїн може містити злиті партнери, які не є HIV протеїнами, вибраними з Vif, Vpr, Vpx, Vpu, Tat, Rev і Nef. Тому, злитий протеїн може містити амінокислотну послідовність інших протеїнів або їх частин. Прикладами інших протеїнів є Gag, Pol і Env HIV протеїни. Тому, нуклеїнова кислота згідно з дійсним винаходом може містити також кодуєчі послідовності одного або більше аксесорних протеїнів або їх частин у відкритій рамці зчитування, що кодує принаймні чотири регуляторні/аксесорні HIV протеїни або їх похідні.

В подальшому прикладі здійснення даного винаходу нуклеїнова кислота може, крім того, містити незалежні касети експресії, що кодуєть аксесорні протеїни, які потім можуть допомогти поліпшити імунну відповідь проти HIV. В прикладі здійснення винаходу, якому віддається перевага, нуклеїнова кислота може, крім того, містити касети експресії, які містять кодуєчу послідовність принаймні одного додаткового HIV протеїну, вибраного з Gag, Pol і Env або їх частину. Навіть більш переважно, коли нуклеїнова кислота на додаток до кодуєчої послідовності злитого протеїну може містити кодуєчі послідовності всіх HIV протеїнів: Gag, Pol і Env. Нуклеїнові кислота - це переважно частина вектора. Нуклеїнова кислота може також бути вірусним геномом або частиною цього вірусного вектора, переважно поксвірусного вектора, такого, як наприклад MVA. Тому, можливою є експресія з поксвірусного вектора злитого протеїну, так само як аксесорних HIV протеїнів, наприклад принаймні одного аксесорного HIV протеїну, вибраного з Gag, Pol і Env.

Крім того, винахід стосується векторів, що містять нуклеїнову кислоту згідно з дійсним винаходом. Термін "вектор" застосовується до будь-яких векторів, відомих спеціалісту в даній галузі. Вектор може бути плазмідним вектором, як наприклад

pBR322 або вектором pUC ряду. Більш переважно вектор - це вірусний вектор. В контексті даного винаходу термін "вірусний вектор" або "вектор вірусу" застосовується до інфекційного та/або ослабленого вірусу, який містить вірусний геном. В цьому випадку нуклеїнова кислота даного винаходу є частиною вірусного генома відповідного вірусного вектора та/або складає вірусний геном. Рекомбінантні вектори можуть використовуватися для інфікування клітин і клітинних ліній, зокрема для інфікування живих тварин, включаючи людей. Типові вірусні вектори згідно з дійсним винаходом - це аденовірусні вектори, ретровірусні вектори або вектори на основі аденоасоційованого вірусу 2 (AAV2). Найбільш переважними є поксвірусні вектори. Поксвірусом переважно можуть бути вірус "канарєчної віспи", вірус пташиної віспи або вірус коров'ячої віспи. Більша перевага віддається модифікованому Ankara вірусу коров'ячої віспи (MVA) [Sutter, G. et al. [1994], Vaccine 12: 1032-40]. Типовим штамом MVA є штам MVA 575, який задепонування в European Collection of Animal Cell Cultures (Європейська Колекція Культур клітин Тварин) під депозитним номером ECACC V00120707. Більш переважно - це MVA-BN або його похідна, які описані в заявці PCT/EP01/13628, поданій до Європейського Патентного Відомства 22 листопада 2001р під назвою "Модифікований вірус коров'ячої віспи Ankara". MVA-BN задепонування в European Collection of Animal Cell Cultures під депозитним номером ECACC V00083008. Використання MVA-BN або його похідних вирішило додаткову технічну проблему — забезпечило специфічну безпечну вірусну вакцину проти HIV, оскільки вірусний вектор MVA-BN - це надзвичайно ослаблений вірус, який отриманий від модифікованого Ankara вірусу коров'ячої віспи і який характеризується втратою здібності до репродуктивної реплікації в людських клітинах. MVA-BN є безпечнішим ніж будь-який інший відомий штам вірусу коров'ячої віспи завдяки відсутності реплікації в людських клітинах. Переважний варіант здійснення винаходу стосується як вірусних векторів, які містять ДНК, кодуєчі MVA-BN згідно з дійсним винаходом, так і похідних MVA-BN. Характерні особливості MVA-BN, опис біологічних випробувань, які дозволяють визначити чи MVA - це MVA-BN або його похідна, і методи, що дозволяють отримати MVA-BN або його похідні, розкриті у вищевказаній заявці PCT/EP01/13628, яка наведена тут як посилання.

Тому, згідно з цим варіантом здійснення винаходу переважно стосується рекомбінантних MVA, таких як MVA-BN, які містять у вірусному геномі касету експресії, що кодує злитий протеїн згідно з дійсним винаходом.

Методи вставки нуклеїнової кислоти згідно з дійсним винаходом у вірусний геном і методи одержання рекомбінантних вірусів відомі спеціалісту, обізнаному в даній галузі техніки.

В рекомбінантному вірусі коров'ячої віспи експресія ДНК згідно з дійсним винаходом переважно, але не виключно, здійснюється під транскрипційним контролем поксвірусного промотора, більш переважно - промотора вірусу коров'ячої віспи.

Переважно вставка ДНК згідно з даним винаходом здійснюється в неістотний сайт вірусного геному. В іншому переважному втіленні винаходу гетерологічна послідовність нуклеїнової кислоти вставлена на місце природно видаленого сайту поксвірусного геному (розкрито в РСТ/EP96/02926). Проте походження інсерційного сайту не є суттєвим для даного винаходу, до того часу поки одержується рекомбінантний вірус коров'ячої віспи. Тому, спеціаліст, обізнаний в даній галузі, в подальшому може легко передбачити придатні інсерційні сайти.

Переважним є варіант, коли на додаток до кодуєчої послідовності злитого протеїну згідно з дійсним винаходом, вірусний вектор, зокрема поксвірусний вектор, може містити у вірусному геномі додаткові ретровірусні гени, вибрані з Gag, Pol і Env HIV генів. Більш переважним є варіант, коли на додаток до кодуєчої послідовності злитого протеїну згідно з дійсним винаходом, вірусний вектор, зокрема поксвірусний вектор, може містити всі HIV гени, які кодуєть Gag, Pol і Env. Ці додаткові гени можуть бути вставлені з відповідною нуклеїновою кислотою згідно з дійсним винаходом. Згідно з цим варіантом здійснення винаходу всі HIV гени були розташовані в одному й тому ж інсерційному сайті вірусного геному. В альтернативному варіанті втіленні додаткові гени вставлені в різні місця вірусного геному.

В переважному варіанті втілення дійсний винахід стосується нуклеїнової кислоти, вектора або злитого протеїну згідно з даним винаходом як вакцин для принаймні часткової профілактики інфікування HIV і СНІДУ. "Вакцина" - це сполука, тобто нуклеїнова кислота, злитий протеїн, вектор або вірус, яка індукє специфічну імунну відповідь.

Відповідно до одного із альтернативних варіантів втілення "вакцина" згідно з дійсним винаходом базується на злитому протеїні згідно з дійсним винаходом.

В переважному варіанті втілення нуклеїнова кислота згідно з дійсним винаходом, зокрема ДНК, використовується як вакцина. Спеціалісту в даній галузі відомо, що застосування голої ДНК, яка скрита в еукаріотичні касеті експресії згідно з винаходом, зокрема внутрішньом'язова ін'єкція ДНК, приводить до експресії протешу, кодованого касетою експресії. Протеїн експресується в імунну систему і підвищується специфічна імунна відповідь.

В альтернативному варіанті втілення вакцинація здійснюється за допомогою вектора згідно з дійсним винаходом, зокрема вірусного вектора, більш переважно - поксвірусного вектора, найкраще - вектора вірусу коров'ячої віспи, наприклад вектора MVA.

Для приготування вакцини на основі вірусу коров'ячої віспи, вірус згідно з винаходом перетворюють у фізіологічно прийнятну форму. Це може бути зроблено, базуючись на досвіді приготування поксвірусної вакцини, яка використовується для вакцинації проти віспи [як описано Stickl, H. et al., [1974] Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392]. Наприклад, очищений вірус зберігається при -80°C в титрі 5×10^8 , TCID₅₀/ml в композиції з 10mM Tris, 140mM NaCl при pH 7.4. Наприклад, для приготування дози вакцини 10^2 - 10^8 частин вірусу в 100ml

фосфат-буферної солі (PBS) в присутності 2% пептону і 1% людського альбуміну ліофілізують в ампулі, переважно скляній ампулі. Як альтернатива, доза вакцини може бути одержана сублімаційною сушкою з композиції, яка містить вірус. Ця композиція може містити додаткові компоненти, такі, як наприклад, манітол, декстран, цукор, гліцин, лактоза або полівінілпіролідон, або інші добавки, такі як антиоксиданти або інертний газ, стабілізатори або рекомбінантні протеїни (наприклад, сироватковий людський альбумін), придатні для застосування *in vivo*. Скляну ампулу потім запечатують і вона може зберігатися при між 4°C і кімнатною температурою протягом декількох місяців. Проте, до тих пір, доки не виникне потреба, ампулу переважно зберігають при температурах нижчих за -20°C . Для вакцинації ліофілізат може бути розчинений в 0,1-0,5 мілілітрах водного розчину, переважно фізіологічного розчину або Tris буферу, і застосовуватись або системно, або локально, тобто парентерально, внутрішньом'язово або застосовуватись будь-який іншим шляхом, відомим фахівцю. Спосіб застосування, доза і кількість введення можуть бути оптимізовані обізнаним спеціалістом у відомий спосіб. Для поксвірусних векторів найбільша перевага віддається підшкірному або внутрішньом'язовому застосуванню.

Якщо вакцина - це MVA-BN вектор або його похідна, яка містить ДНК згідно з дійсним винаходом, конкретне втілення даного винаходу стосується застосування вакцини в терапевтично ефективних кількостях в першому щепленні (примірювання "priming inoculation") і в другому щепленні (бустінг-щеплення).

Якщо вакцина - це MVA-BN вектор або його похідна, яка містить ДНК згідно з дійсним винаходом, специфічне втілення даного винаходу стосується набору для вакцинації, який містить вектор вірусу MVA-BN згідно з дійсним винаходом для першої вакцинації (примірювання) в першій пляшці/контейнері і для другої вакцинації (бустінг-щеплення) - в другій пляшці/контейнері.

Таким чином, винахід стосується вакцини, яка містить нуклеїнову кислоту, вектор або злитий протеїн згідно з дійсним винаходом, і використання вказаної нуклеїнової кислоти, вектора або протеїну для приготування вакцини.

Згідно з подальшим прикладом здійснення винахід стосується способу захисту тварин, включаючи людину, проти HIV інфекції шляхом введення вказаним тваринам, які цього потребують, включаючи людину, злитого протешу згідно з дійсним винаходом, нуклеїнової кислоти згідно з дійсним винаходом або вектора згідно з дійсним винаходом.

Крім того, винахід стосується способу одержання протеїну згідно з дійсним винаходом, який включає наступні стадії:

(i) трансфекція клітини-хазяїна нуклеїновою кислотою або вектором згідно з дійсним винаходом або

(ii) інфікування клітини-хазяїна вірусним вектором згідно з дійсним винаходом,

(iii) експресія злитого протеїну у трансфікованій в стадії (i) клітині-хазяїні або у інфікованій в стадії (ii) клітині хазяїні, та

(iv) відновлення злитого протеїну.

Винахід, крім того стосується нативної клітини, трансфікованої нуклеїновою кислотою або вектором згідно з дійсним винаходом або інфікованої вірусним вектором згідно з дійсним винаходом.

Згідно з альтернативним втіленням винаходу злитий протеїн може містити принаймні три різні HIV протеїни, вибрані з Vif, Vpr, Vpu, Rev, Vpx і Tat. Переважно злитий протеїн може містити 4, 5 або всі зазначені HIV протеїни. Типовий злитий протеїн згідно з цим втіленням містить амінокислотну послідовність HIV протеїнів Vpr, Vif, Vpu або похідні амінокислотної послідовності одного або більше зазначених протеїнів. Як вказано вище, порядок чергування HIV протеїнів в злитому протеїні не є суттєвим. Всі переважні приклади здійснення винаходу, як визначено вище, також використовуються для альтернативних втілень.

Фіг.1: Схематичне уявлення відновлення структури подвійної спіралі олігануклеотидів при гібридизації (гібридизація)

На малюнку показана гібридизація чотирьох олігануклеотидів. Вони є одноланцюговими і гібридизуються комплементарними кінцями. Розриви заповнені полімеразами, які проявляють активність щодо виправлення помилок при копіюванні матриці (Pfx полімераза).

Фіг.2: Схематичне уявлення гібридизації чотирьох генів.

Vif ген показує часткове перекривання послідовності з vpr фрагментом, vpr кодуючий фрагмент показує часткове перекривання послідовності з rev геном (сірий). PCR фрагменти денатуровані і перекриті комплементарні кінці гібридизуються. Утворені розриви заповнюються, використовуючи Pfx полімеразу. Vif-vpr фрагмент зливається з перекритою послідовністю vpr-rev фрагмента і вони знову використовуються для злиття.

Фіг.3: Стратегія клонування послідовності, яка кодує злитий протеїн згідно з дійсним винаходом, в рекомбінантний вектор для вставки чужерідних генів в MVA геном. Кодуюча ділянка поліпротеїну, утвореного злиттям vif, vpr, vpu і rev, була ампліфікована праймерами, які містять ClaI і ApaI рестрикційний сайт. Цей PCR продукт був клонований в pBNX65 вектор, розрізаний ClaI/ApaI, який містить поксвірусний АТІ промотор. Tat кодуюча ділянка була ампліфікована за допомогою PCR з праймерами, які містять Acc651 рестрикційний сайт, та зшита з Acc651 лінеаризованої pBNX65+vif-rev. Одержана касета експресії (АТІ промотор + послідовність, що кодує злитий протеїн згідно з дійсним винаходом) була ізольована PacI рестрикцією та вставлена в рекомбінантний вектор для вставки чужерідних генів в 14L міжгенну ділянку MVA геному (pBNX39). pBNX39 містить послідовність, гомологічну з фланкуючою послідовністю інсерційного сайту MVA геному (F1 14L і F2 14L). Для селекції рекомбінантних вірусів після гомологічної рекомбінації MVA геному та pBNX39, вектор додатково містить gpt ген E.coli (ген фосфорибозилтрансферази). Після очищення рекомбінантних ві-

русів, селекційна касета видаляється шляхом гомологічної рекомбінації між Flank 1 і повторною послідовністю flank 1 (Flrpt).

Фіг.4: Схематичне уявлення MVA генома

MVA містить лінійний геном, який показує характерні фрагменти після рестрикції з Hind III (A-O). Не функціональна ділянка між 14L і 15L генами локалізована в I фрагменті. Вставка чужерідних генів, використовуючи pBNX39, відбувається в положенні 56767-56768.

Приклади

Утворення ДНК, яка кодує Vif-Vpr-Vpu-Rev-Tat HIV злитий протеїн. Одиничні гени HIV геному були приготовані за допомогою геномної ДНК, використовуючи стандартні PCR протоколи, або синтезовані за допомогою методу, який базується на гібридизації олігануклеотидів через часткове перекриття послідовностей і заповнені утворених одиничних ланцюгових розривів.

Для олігануклеотидів, що базуються на приготуванні кодуючої ділянки гену, яка буде вставлена в нуклеїнову кислоту, яка кодує злитий протеїн згідно з винаходом, були сконструйовані 40mer олігануклеотиди з перекриттям 15bp (пар нуклеотидів). Послідовність олігануклеотидів базується на геномній карті HIV-1 ізоляту HXB2R, який був отриманий зі штаму IIIb. Олігануклеотиди, використовували в реакції гібридизації або в ланцюговій реакції полімеризації (PCR) для виділення потрібної послідовності, були сконструйовані таким чином, що в результаті кодуючої ділянки термінуючі кодони для терміналі трансляції були видалені. Tat ген був синтезований, використовуючи олігонуклеотиди, які містять термінуючий кодон, оскільки цей ген повинен вставлятися в останню позицію нуклеїнової кислоти, яка кодує злитий протеїн згідно з дійсним винаходом, і таким чином, повинен містити термінуючий триплет для правильного завершення трансляції поліпротеїну.

Для реакції гібридизації олігануклеотидів були виконані 10 циклів двостадійної (Gibco-BRL) реакції (денатурація при 95°C і гібридизація/випрямлення при 68°C). Протягом цієї реакції частково перекриті олігануклеотиди стають гібридизованими і розриви заповнюються виправляючими помилки копіювання Pfx полімеразами (proofreading polymerase) (Фіг.1).

Для синтезу vif кодуючої ділянки перший кодуючий ген в нуклеотидній послідовності, яка кодує злитий протеїн, був одержаний шляхом PCR, використовуючи HIV геномну кДНК. PCR виконували в такий спосіб, що vif кодуюча ділянка була злита з першими 15 парами нуклеотидів (bp) наступного vpr гена для субсеквентної гібридизації vif і vpr. Vpr кодуюча ділянка, яка охоплює 5559-5847 bp HIV геному HXB2R, була одержана шляхом гібридизації 10 олігануклеотидів. Утворені розриви були заповнені і для ампліфікації після субсеквентної PCR продукт, який містив vpr кодуючу ділянку, був злитий з фланкуючими ділянками vif і vpu, який був вставлений після vpr кодуючої ділянки.

Vpu кодуюча ділянка була ампліфікована шляхом ланцюгової реакції полімеризації PCR вище тієї ж кДНК, яка використовується для синтезу vif, і

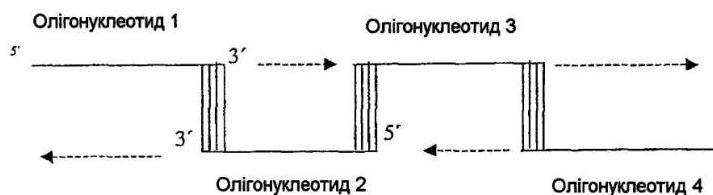
одержаний продукт містив фланкуючі ділянки для злиття з *vpr* і *rev*.

Rev кодуюча ділянка була синтезована шляхом гібридизації 14 олігонуклеотидів, які охоплюють ділянку 5970-6045 і 8379-8650 bp HTV геному HXB2R, і 15 bp перекриваються для гібридизації з *vpr* та *tat*.

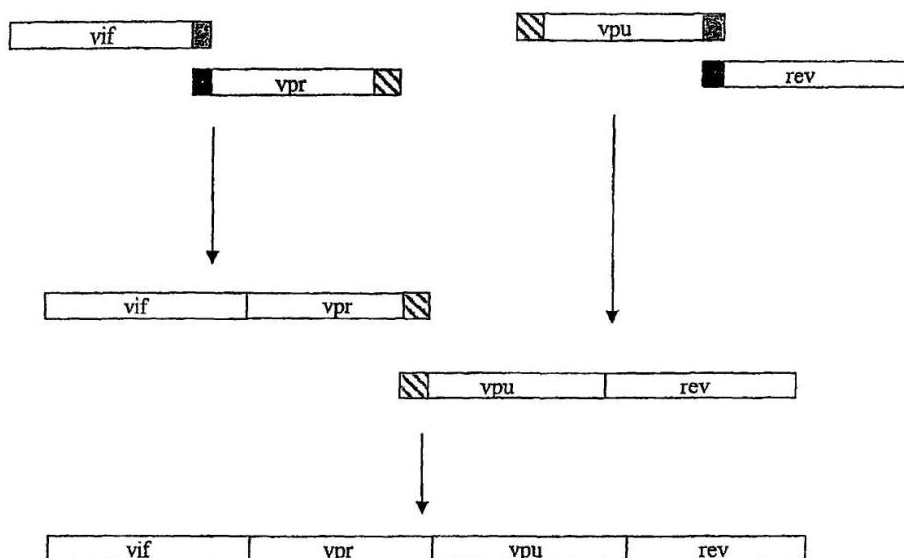
Tat кодуюча ділянка була створена шляхом використання 10 олігонуклеотидів, які охоплюють 5831-6045 і 8379-8466 bp HIV геному HXB2R.

Vif і *vpr* кодуюча ділянка, так само як і *vpr* та *rev* кодуюча ділянка, була одержана гібридизацією двох фрагментів шляхом їх перекривання в двох-етапній Pfx полімеразній реакції (Фіг.2). Після до-

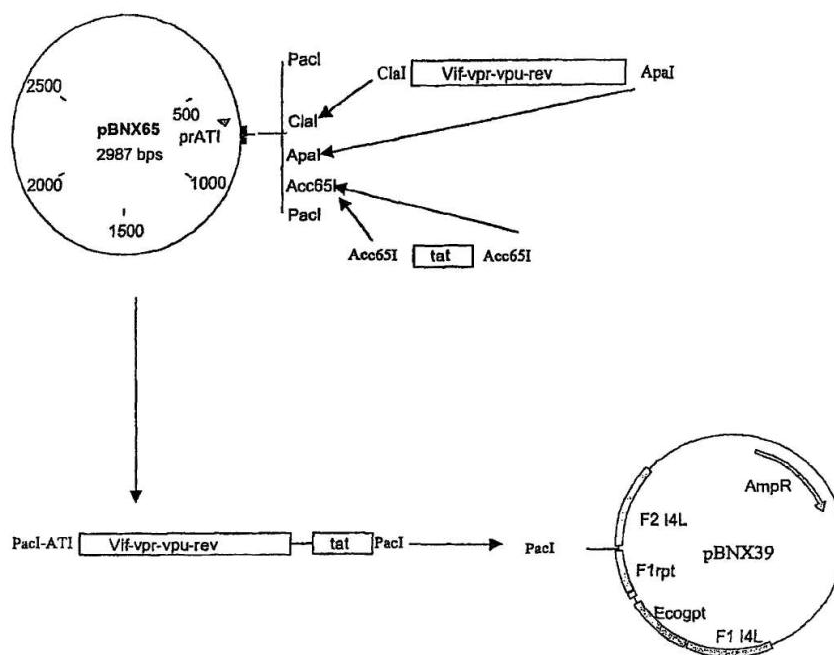
даткової PCR ампліфікації злитих продуктів фрагменти були очищені та зшиті один з одним шляхом перекривання *vpr* і *vpr* (Фіг.2). Після PCR ампліфікації одержаного продукту (кодуючі послідовності для *vif-vpr-vpr-rev*) *tat* кодуюча ділянка була злита шляхом клонування фрагменту *vif-vpr-vpr-rev* і *tat* в сусідні клонуючі сайти у pBluescriptKS + векторі, який містить поксвірусни АТІ промотор (Фіг.3, pBNX65). Завершена касета експресії потім була ізольована шляхом Расі рестрикції та вставлена в pBNX39 (Фіг. 3). pBNX39 містить послідовності, гомологічні з MVA геномом, який дозволяє здійснювати вставку в некодуючу ділянку (14L) генома (Фіг.4) шляхом гомологічної рекомбінації.



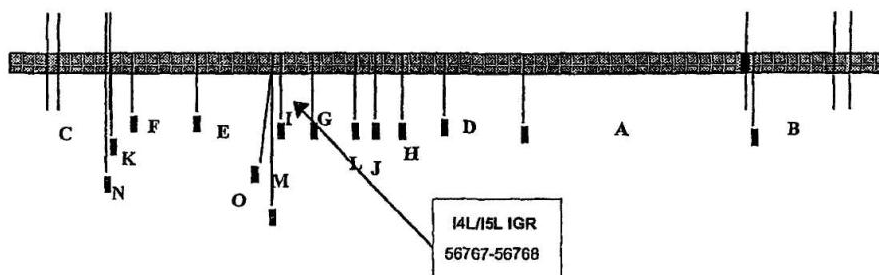
ФІГ. 1



ФІГ. 2



ФІГ. 3



ФІГ. 4