

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-503252

(P2004-503252A)

(43) 公表日 平成16年2月5日(2004.2.5)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-510723 (P2002-510723)	(71) 出願人	391015708
(86) (22) 出願日	平成13年6月7日 (2001.6.7)		ブリistol-マイヤーズ スクイブ カン
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月9日 (2002.12.9)		パニー
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/018438		B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B
(87) 国際公開番号	W02001/096610		B C O M P A N Y
(87) 国際公開日	平成13年12月20日 (2001.12.20)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 1
(31) 優先権主張番号	60/210, 626		5 4 ニューヨーク パーク アベニュー
(32) 優先日	平成12年6月9日 (2000.6.9)		3 4 5
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062144
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) , AU, CA, JP		弁理士 青山 稜
		(74) 代理人	100086405
			弁理士 河宮 治
		(74) 代理人	100068526
			弁理士 田村 恭生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIV-1 リポーターウイルスおよび抗ウイルス性化合物をアッセイするうえでのその使用

(57) 【要約】

本発明は、複製コンピテントな HIV-1 リポーターウイルスを生成する、HIV-1 プロウイルス構築物に関する。本発明はまた、抗ウイルス性化合物の高処理量スクリーニングにおけるこれら HIV-1 リポーターウイルスの使用にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複製コンピテントな HIV - 1 ウイルスをコードするベクターであって、ウイルスの複製に必須でない領域がリポーター遺伝子によって置換されている HIV - 1 ゲノムを含むことを特徴とするベクター。

【請求項 2】

該リポーター遺伝子が、レニラルシフェラーゼリポーター遺伝子、SEAPリポーター遺伝子、CAT 遺伝子、およびグリーン蛍光タンパク質遺伝子よりなる群から選ばれる、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 3】

該リポーター遺伝子がレニラルシフェラーゼリポーター遺伝子および SEAPリポーター遺伝子よりなる群から選ばれる、請求項 2 に記載のベクター。

【請求項 4】

ウイルスの複製に必須でない領域が nef 遺伝子または nef 遺伝子のフラグメントをコードする、請求項 1、2 または 3 に記載のベクター。

【請求項 5】

ウイルスの複製に必須でない領域が vpr 遺伝子または vpr 遺伝子のフラグメントをコードする、請求項 1、2 または 3 に記載のベクター。

【請求項 6】

該 HIV - 1 ゲノムが pNL4 - 3 プロウイルスクロンのゲノムである、請求項 1、2 または 3 に記載のベクター。

【請求項 7】

該 HIV - 1 ゲノムが pYU - 2 プロウイルスクロンのゲノムである、請求項 1、2 または 3 に記載のベクター。

【請求項 8】

該 HIV - 1 ゲノムが p89 . 6 プロウイルスクロンのゲノムである、請求項 1、2 または 3 に記載のベクター。

【請求項 9】

該 HIV - 1 ゲノムが HIV - 1 Lai プロウイルスクロンのゲノムである、請求項 1、2 または 3 に記載のベクター。

【請求項 10】

請求項 1、2 または 3 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 11】

HIV - 1 に対する抗ウイルス活性を示す化合物のスクリーニング法であって、
 (a) 請求項 1、2 または 3 に記載のベクターで感染したまたは感染させるべき哺乳動物細胞に被験化合物を加え、ついで
 (b) 該被験化合物に暴露した細胞でのリポーター遺伝子の活性をコントロールの細胞での発現レベルと比較することを含み、その際、リポーター遺伝子の発現レベルの低減が該被験化合物が HIV - 1 の複製を抑制したことを示すことを特徴とする方法。

【請求項 12】

該哺乳動物細胞が MT - 2 # 18 細胞である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

複製コンピテントな HIV - 1 ウイルスをコードするベクターであって、ウイルスの複製に必須でない領域が機能的なレニラルシフェラーゼ酵素をコードする核酸配列によって置換されている HIV - 1 ゲノムを含むことを特徴とするベクター。

【請求項 14】

該レニラルシフェラーゼ遺伝子が、機能的なレニラルシフェラーゼ酵素という結果となるアラニンへのシステイン置換を含む、請求項 13 に記載のベクター。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

ウイルスの複製に必須でない領域が *n e f* 遺伝子または *n e f* 遺伝子のフラグメントをコードする、請求項 13 に記載のベクター。

【請求項 16】

ウイルスの複製に必須でない領域が *v p r* 遺伝子または *v p r* 遺伝子のフラグメントをコードする、請求項 13 に記載のベクター。

【請求項 17】

該 HIV - 1 ゲノムが p N L 4 - 3 プロウイルスクローンのゲノムである、請求項 13 に記載のベクター。

【請求項 18】

該 HIV - 1 ゲノムが p Y U - 2 プロウイルスクローンのゲノムである、請求項 13 に記載のベクター。 10

【請求項 19】

該 HIV - 1 ゲノムが p 8 9 . 6 プロウイルスクローンのゲノムである、請求項 13 に記載のベクター。

【請求項 20】

該 HIV - 1 ゲノムが HIV - 1 L a i プロウイルスクローンのゲノムである、請求項 13 に記載のベクター。

【請求項 21】

請求項 13 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 22】

H I V - 1 に対する抗ウイルス活性を示す化合物のスクリーニング法であって、
 (a) 請求項 13 に記載のベクターで感染したまたは感染させるべき哺乳動物細胞に被験化合物を加え、ついで
 (b) 該被験化合物に暴露した細胞でのリポーター遺伝子の活性をコントロールの細胞での発現レベルと比較することを含み、その際、リポーター遺伝子の発現レベルの低減が該被験化合物が H I V - 1 の複製を抑制したことを示すことを特徴とする方法。 20

【請求項 23】

該哺乳動物細胞が M T - 2 # 1 8 細胞である、請求項 13 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、リポーター遺伝子、好ましくはレニラ (*r e n i l l a*) ルシフェラーゼが分泌胎盤アルカリホスファターゼ (*s e c r e t e d p l a c e n t a l a l k a l i n e p h o s p h a t a s e*) (*S E A P*) のいずれかのリポーター遺伝子をコードする、複製コンピテントな (*r e p l i c a t i o n c o m p e t e n t*) HIV - 1 プロウイルス構築物に関する。本発明はさらに、HIV - 1 の複製を抑制する化合物の高処理量スクリーニングにおけるこれらプロウイルス構築物ビリオンの使用に関する。 30

【0002】

(背景技術)

1 型ヒト免疫不全ウイルス (H I V - 1) の細胞培養中での複製は、一般に、ウイルスの逆転写酵素 (R T) 活性の産生を定量するか、細胞培養液中の成熟ウイルスカプシドタンパク質 (すなわち、p 2 4) を定量するか、または逆転写酵素によって指令された複製連鎖反応 (R T - P C R) によるウイルス RNA コピー数を定量することによって測定される。あるいは、H I V - 1 複製は、X T T や M T T などの色素還元 (*d y e r e d u c t i o n*) 法を用いて感染細胞に対するウイルスによって誘発された細胞変性効果 (*c p e*) を定量することによって間接的に測定することができる (ワイスロウ (*W e i s l o w*) ら、1989)。 40

【0003】

H I V - 1 R T アッセイまたは p 2 4 アッセイの場合、これら方法の厄介な性質はこれ 50

ら方法を高処理量の抗ウイルスアッセイに適用するのを排除している。一方、X T Tなどの色素還元法によるH I V複製の分析は単一工程のプロセスであり、それゆえ高処理量が可能である。しかしながら、色素還元法はしばしば培養液中の大部分の細胞が感染し死滅した後に行われるので、一層有効性の少ないH I V - 1インヒビターの同定の感度の低減という結果となる。さらに、色素還元法は有意の細胞変性効果に依存しているため、シンシウム非誘導性のH I V - 1株のように培養細胞株中で攻撃的な(a g g r e s s i v e)複製動力学を示さないH I V株の複製を正確に測定するのに用いることはできない。

【0004】

(発明の開示)

(発明が解決しようとする技術的課題)

H I V - 1リポーターウイルスの生成は、H I V - 1複製の測定の従来法に代わる方法を提供する。リポーター遺伝子としてルシフェラーゼをコードする単サイクル感染性H I V - 1リポーターウイルスが記載されている(チェン(Chen)ら、1994)。これらウイルスは、ウイルスの侵入、逆転写、組込み、および遺伝子発現を含むH I V - 1複製サイクルのほぼ最初の半分の簡単かつ迅速な分析を可能にする。しかしながら、感染細胞でのH I V遺伝子発現の後の工程、たとえばピリオンの成熟に必要なウイルス前駆体ポリペプチドのH I Vプロテアーゼ媒体プロセッシングなどは、これらウイルスを用いては容易に測定できない。

【0005】

H I Vの完全な複製サイクルを分析し、細胞集団中のH I V - 1の伝播を追跡するには、複製コンピテントなリポーターウイルスが必要である。H I V - 1の複製の分析に用いることのできる幾つかの複製コンピテントなH I V - 1リポーターウイルスが作製されている(ターウィリガー(Terwilliger)ら、1989;マリム(Malim)ら、1992;ヘ(He)およびランダウ(Landau)、1995;プラネレ(Planelles)ら、1995;チェン(Chen)ら、1996;ページ(Page)ら、1997;ジャミエソン(Jamieson)およびザック(Zack)、1998)。しかしながら、これらリポーターウイルスがコードするリポーター遺伝子産物は簡単かつ迅速なアッセイによって測定できないため、これらリポーターウイルスは高容量の抗ウイルスアッセイには有用ではない。たとえば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)リポーター遺伝子は厄介な酵素アッセイによって制限された範囲の感度でしか測定することができない。同様に、マーカー遺伝子をコードするリポーターウイルスは、H I V感染細胞を同定するために蛍光活性化セルソーティングを必要とする。

【0006】

(その解決方法)

本発明は、複製コンピテントなH I V - 1リポーターウイルスを生成する、H I V - 1プロウイルスに関する。これらプロウイルスは、ウイルス複製に必須でない領域がリポーター遺伝子、好ましくはレニラルシフェラーゼ、レニラルシフェラーゼ遺伝子の誘導体または分泌胎盤アルカリホスファターゼ(SEAP)リポーター遺伝子によって置換されたH I V - 1ゲノムをコードしている。レニラルシフェラーゼ遺伝子の誘導体としては、機能的なレニラルシフェラーゼ酵素という結果となる野生型レニラルシフェラーゼ配列中でのアミノ酸またはヌクレオチド置換(すなわち、c y s - a l a置換)が挙げられる(リウ(Liu)ら、(1999))。リポーター遺伝子の発現は真正の(bona fide)ウイルス複製に依存しており、簡単かつ迅速なアッセイを用いて検出することができる。

【0007】

本発明の複製コンピテントなH I V - 1プロウイルスは、あらゆるH I V - 1ウイルス株からのいかなる複製コンピテントなH I V - 1プロウイルスクローンを用いても構築することができる。一つの態様において、複製コンピテントなH I V - 1プロウイルスは、H I V - 1プロウイルスクローンpNL4-3のn e f遺伝子をレニラルシフェラーゼリポーター遺伝子で置換することによって構築される。得られたプロウイルスは、ウイルス感

10

20

30

40

50

染のためのコレセプターとしてCXCR4を利用するT細胞親和性の(T-tropic)ウイルスを生成する。使用できるリポーター遺伝子の他の例としては、SEAP遺伝子、CAT遺伝子またはグリーン蛍光タンパク質遺伝子(GFP)が挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0008】

他の態様において、複製コンピテントなHIV-1プロウイルスの構築は、HIV-1プロウイルスクローンpNL4-3のnef遺伝子をレニラルシフェラーゼリポーター遺伝子で置換し、さらにpNL4-3のエンベロップ遺伝子をHIV-1プロウイルスJRFLのエンベロップ遺伝子で置換することによって行う。得られたプロウイルスは、ウイルス感染のためのコレセプターとしてCCR5を利用するマクロファージ親和性の(macrophage-tropic)ウイルスを生成する。 10

【0009】

さらに他の態様において、複製コンピテントなHIV-1プロウイルスは、HIV-1プロウイルスクローンpNL4-3のnef遺伝子をSEAPリポーター遺伝子で置換し、さらにpNL4-3のエンベロップ遺伝子をHIV-1プロウイルスクローンJRFLのエンベロップ遺伝子で置換することによって生成する。得られたプロウイルス(「JRFLNSEAP」と称する)は、ウイルス感染のためのコレセプターとしてCCR5を利用するマクロファージ親和性のウイルスを生成する。

【0010】

本発明のHIV-1プロウイルスを生成するのに用いることのできるエンベロップ遺伝子の他の例としては、CCまたはCXCKeモカインレセプターのいずれかに対して親和性(tropism)を示すHIV-1エンベロップまたは真核生物細胞の感染を開始することのできるHIV-1単離物エンベロップが挙げられるが、これらに限られるものではない。 20

本発明はまた、HIV-1の複製を抑制する化合物の高処理量インビトロスクリーニングにおける本発明のHIV-1複製コンピテントリポーターウイルスの使用にも関する。

【0011】

本発明は複製コンピテントなHIV-1プロウイルスに関する。これらの複製コンピテントなHIV-1プロウイルスは、ウイルスの複製に必須でないHIV-1ウイルスゲノムの領域をリポーター遺伝子、好ましくはレニラルシフェラーゼ遺伝子、レニラルシフェラーゼ遺伝子の誘導体または分泌胎盤アルカリホスファターゼ(SEAP)リポーター遺伝子で置換することによって生成される。レニラルシフェラーゼ遺伝子の誘導体としては、機能的なレニラルシフェラーゼ酵素という結果となる野生型レニラルシフェラーゼ配列中のアミノ酸またはヌクレオチド置換(すなわち、cys-ala置換)が挙げられる(リウ(Liu)ら、(1999))。リポーター遺伝子の発現は真正のウイルス複製に依存しており、それゆえウイルス複製の定量法として用いることができる。リポーター遺伝子の発現は、簡単かつ迅速なアッセイを用いて検出することができる。 30

【0012】

本発明の複製コンピテントなHIV-1プロウイルスを構築するため、衰弱しない(non-debilitating)リポーター遺伝子、たとえばレニラルシフェラーゼリポーター遺伝子を、HIV-1ウイルスの複製を妨害しない限りにおいて該ウイルスゲノム中のどこにでも挿入することができる。好ましくは、ウイルスの複製に必須でないHIV-1ゲノムの領域を置換することによって該ウイルスゲノム中にリポーター遺伝子を挿入する。そのような領域としては、nef遺伝子、vpr遺伝子、およびnef遺伝子やvpr遺伝子のフラグメントが挙げられるが、これらに限られるものではない。nefおよびvpr遺伝子のフラグメントは、一般に1~300ヌクレオチドの長さである。 40

【0013】

本発明の複製コンピテントなHIV-1プロウイルスは、あらゆるHIV-1ウイルス株からのいかなる複製コンピテントなHIV-1プロウイルスクローンを用いても構築することができる。そのようなクローンの例としては、pNL4-3(アダチ(Adachi) 50

）ら、1986）、pYU-2（ライ（Lai）、1991）、p89.6（コルマン（Collman）ら、1992）およびHIV-1 Lai（ウエイン-ホブソン（Wain-Hobson）ら、1985）が挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0014】

一つの態様において、複製コンピテントなHIV-1プロウイルスはHIV-1プロウイルスクローンpNL4-3のnef遺伝子をレニラルシフェラーゼリポーター遺伝子で置換することによって生成される。得られたプロウイルス（「NL4RLuc」と称する）は、ウイルス感染のためのコレセプターとしてCXCR4を利用するT細胞親和性のウイルスを生成する。

【0015】

他の態様において、複製コンピテントなHIV-1プロウイルスは、HIV-1プロウイルスクローンpNL4-3のnef遺伝子をレニラルシフェラーゼリポーター遺伝子で置換し、さらにpNL4-3のエンベロップ遺伝子をHIV-1プロウイルスクローンJRFLのエンベロップ遺伝子で置換することによって生成される。得られたプロウイルス（「JRFNRLuc」と称する）は、ウイルス感染のためのコレセプターとしてCCR5を利用するマクロファージ親和性のウイルスを生成する。

【0016】

さらに他の態様において、複製コンピテントなHIV-1プロウイルスは、HIV-1プロウイルスクローンpNL4-3のnef遺伝子をSEAPリポーター遺伝子で置換し、さらにpNL4-3のエンベロップ遺伝子をHIV-1プロウイルスクローンJRFLのエンベロップ遺伝子で置換することによって生成される。得られたプロウイルス（「JRFNSEAP」と称する）は、ウイルス感染のためのコレセプターとしてCCR5を利用するマクロファージ親和性のウイルスを生成する。

【0017】

本発明のHIV-1ウイルスに感染した細胞中でのレニラルシフェラーゼリポーター遺伝子、レニラルシフェラーゼ遺伝子の誘導体またはSEAPリポーター遺伝子の発現は細胞培養中での真正のウイルス複製に依存しており、当該技術分野で知られた方法を用いて検出することができる。一つの態様において、レニラルシフェラーゼ活性の測定は、該プロウイルスに感染した細胞にレニラルシフェラーゼ基質であるコエレンテラミン（coelenteramine）（Promega Corp.、マジソン、ウイスコンシン）を加えることによって行う。レニラルシフェラーゼはコエレンテラミンをコエレンテラミド（coelenteramide）に変換し、同時にCO₂および光を産生するので、レニラルシフェラーゼ活性は光の放射によって検出され、光の放射はシンチレーションカウンターまたはルミノメーターを用いて定量することができる。

【0018】

他の態様において、SEAP活性の測定は、感染細胞培養からの上澄み液にSEAP基質であるCSPD（Tropix PE Applied Systems、ベッドフォード、マサチューセッツ）、ルミネセンスエンハンサー、および内生の非胎盤アルカリホスファターゼ活性を阻害する緩衝液系を加えることによって行う。SEAPによる基質の脱リン酸後に準安定なフェノレートアニオン中間体が生成し、該中間体は分解して光を放射する。光の放射はシンチレーションカウンターまたはルミノメーターを用いて測定することができる。

【0019】

レニラルシフェラーゼ活性またはSEAP活性を測定するため、当該技術分野で知られたレニラルシフェラーゼまたはSEAPの他の基質を使用できることが理解される。

細胞培養中での本発明のHIV-1ウイルスの複製は簡単かつ迅速なアッセイを用いて容易に測定することができるので、本発明はまたHIV-1複製を抑制する化合物の高容量スクリーニングにおけるこれらHIV-1ウイルスの使用にも関する。

【0020】

一つの態様において、スクリーニング法は、本発明の複製コンピテントなプロウイルスの

10

20

30

40

50

ウイルスストックに感染した細胞に被験化合物を加え、ついで2～7日、好ましくは6日間のインキュベーション後にレニラルシフェラーゼまたはSEAP活性を測定することを含む。他の態様において、ウイルスのストックを感染させるべき細胞とともに被験化合物に加えてもよい。

抗ウイルス性の化合物のスクリーニングに用いるのに適した細胞または細胞株としては、MT-2細胞、MT-2#18細胞、PM-1、CEMSSおよびジャーカット(Jurkat)細胞が挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0021】

被験化合物で処理した細胞でのレニラルシフェラーゼまたはSEAP活性のレベルを感染コントロール細胞のレベルと比較する。コントロール細胞でのレベルと比較して被験化合物で処理した細胞でのレニラルシフェラーゼまたはSEAP活性レベルの低減は、該被験化合物がHIV-1ウイルスの複製を抑制する能力を有していることを示している。好ましくは、抑制は50～90%、さらに好ましくは90%以上である。

10

【0022】

本発明のHIV-1ウイルスのウイルスストックは当業者によく知られた方法により生成することができる。一つの態様において、ウイルスストックは、本発明のプロウイルスクローンを細胞培養中にトランスフェクションし、ついでトランスフェクションした細胞の上澄み液を回収することによって調製される。トランスフェクションは、リン酸カルシウム、エレクトロポレーションまたはリポソーム媒体トランスフェクションなどの当該技術分野で知られた方法を用いて行うことができる。トランスフェクションに用いる細胞の例としては、HEK293細胞、ジャーカット細胞およびCEM細胞が挙げられるが、これらに限られるものではない。

20

被験化合物で処理した細胞でのレニラルシフェラーゼまたはSEAP活性レベルの変化を測定することにより、被験化合物がウイルスの複製を抑制するうえでの有効性並びに有効性の程度を決定することができる。

【0023】

つぎに本発明を実施例により記載するが、これら実施例は本発明を説明するためのものであって本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

実施例

材料および方法

30

細胞株および細胞培養条件

NIH AIDSリサーチ・アンド・レファレンス・リジェント・プログラム(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)(ベセスダ、メリーランド)から得たCD4+ヒト悪性T細胞株であるMT-2細胞株を、10%ウシ胎仔血清(FBS、Life Technologies)を含有するロスウェル・パーク・メモリアル・インスティテュート(Roswell Park Memorial Institute)(RPMI)1640培地(Life Technologies、ゲイサースバーグ、メリーランド)中で増殖させた。この細胞株は本来、CD4およびCXCR4を発現するが、形質転換してマクロファージ親和性のHIV-1コレセプターであるヒトCCR5を発現するようにした。形質転換した細胞株をそのクローン集団の番号によりMT-2#18と名付け、その親細胞株MT-2と同様に0.5mg/mlのジェネティシン(Life Technologies、ゲイサースバーグ、メリーランド)を加えて培養した。MT-2#18細胞は、T細胞親和性のウイルスに対してはCXCR4コレセプターの使用を介して、またはマクロファージ親和性のウイルスに対してはCCR5コレセプターの使用を介して、HIV-1感染を許容する。

40

【0024】

HEK293-Tは、SV-40ラージT抗原で形質転換したヒト胚性腎細胞株である。HEK293-T細胞を、10%ウシ胎仔血清を含有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(Life Technologies、ゲイサースバーグ、メリーランド)中で増殖させた。

50

【0025】

リポーターウイルスの構築

HIV-1プロウイルスクローン pNL4-3 (アダチ (Adachi) ら、1986) を用いてプロウイルスを構築した。NL4R1ucプロウイルスクローン (図1) を構築するため、pNL4-3中のエンベロープコード配列の直ぐ3'側に唯一のXbaIエンドヌクレアーゼ制限部位を導入した。導入したXbaI部位とNef中のBglIIエンドヌクレアーゼ制限部位との間の191塩基対のセグメントを欠失させ、唯一のXhoIエンドヌクレアーゼ制限部位で置換した。ついで、導入したXbaIおよびXhoI部位を用いて947塩基対のレニラルシフェラーゼリポーター遺伝子 (RLuc) (マシューズ (Matthews) ら、およびローレンツ (Lorenz) ら) を改変pNL4-3中に挿入した。得られた構築物NL4R1ucはpNL4-3構築物よりも756塩基対だけ長かった。

10

【0026】

プロウイルスクローン JRFNRLuc (図2) を構築するため、NL4R1ucのエンベロープコード領域 (約3,100塩基対) をエンベロープコード配列の直ぐ5'側に位置するEcoRI部位および上記唯一のXbaI部位により除去した。この断片をHIV-1 JRFNLのエンベロープコード領域 (約3,700塩基対) (オブライエン (O'Brien) ら、1990) で置換した。JRFNLクローンのエンベロープコード領域は、この領域のPCR増幅およびEcoRIおよびXbaI部位での組換えクローニングにより調製した。JRFNRLuc cDNAクローン (図3) の構築は、JRFNRLuc中のレニラルシフェラーゼ遺伝子 (947塩基対) をホタルルシフェラーゼ遺伝子 (1,706塩基対) で置換することにより行った。プロウイルスクローン JRFNSEAPの構築は、XbaIおよびXhoI部位を用いてJRFNRLuc中のレニラルシフェラーゼ遺伝子をSEAPコード遺伝子 (1,557塩基対) で置換することにより行った (図4)。

20

【0027】

ウイルスストックの調製

LipofectAMINE plus (Life Technologies、ゲイサーズバーグ、メリーランド) を用い、製造業社の指示に従ってHEK293細胞をNL4R1uc、JRFNRLuc、JRFNRLucまたはJRFNSEAPプロウイルスクローンでトランスフェクションした。各トランスフェクションに約 3×10^7 細胞を用いた。トランスフェクションの72時間後にトランスフェクションした細胞の上澄み液を回収し、低速遠心分離により清澄化し、 -70°C で貯蔵した。感染性のウイルスを解凍し、MT-2#18細胞を用いて力価測定した。

30

【0028】

細胞の感染およびp24アッセイ

MT-2#18細胞をペレット化し、0.01の感染多重度 (MOI) にてウイルスストックで37 $^{\circ}\text{C}$ で2時間感染させた。ウイルスを除去し、最終濃度 $10,000$ 細胞/ $100\mu\text{L}$ で再浮遊する前に細胞を $1 \times \text{PBS}$ で2回洗浄した。感染性アッセイおよび薬剤感受性アッセイを96ウエル組織培養プレートで行い、動力学試験をT-25フラスコで行った。細胞の上澄み液を第0日目、第2日目、第3日目、第5日目または第6日目に回収し、継代したウイルスを第2日目または第3日目に回収した。ゼプトメトリックス・レトロテック (Zeptometrix Retrotek) 製品 (Zeptometrix Incorporated、バッファロー、ニューヨーク) を用い、製造業社のプロトコールに従ってカプシドタンパク質p24の活性を分析した。

40

【0029】

高処理量スクリーニングアッセイ

MT-2#18細胞の大容量培養液を調製し、10%ウシ胎仔血清を加えたRPMI培地中で 0.5×10^6 細胞/ml未満の濃度で保持した。被験化合物を96ウエル組織培養処理した透明底ブラックプレート (Corning Incorporated、コーニ

50

ング、ニューヨーク)に20 μ lの脱イオン水および5%ジメチルスルホキシド中で3mMの濃度にてプレティングした。MT-2#18細胞を低速遠心分離によりペレット化し、新たな培地に再浮遊させた。この新たな培地および細胞にリポーターウイルスを加えて約0.01のMOIおよび160 μ l中に 1×10^4 の細胞濃度とした。ついで、20 μ l/ウエルの2x完全改変イーグル培地を脱イオン水の容量を補正するために加えた。ついで、この混合物180 μ lを各被験化合物のウエルおよびコントロールのウエルに加える。37で5~6日間インキュベーション後、12チャンネルマニホールドを用いてウエルから培地を吸引した。

【0030】

レニラルシフェラーゼ活性の測定は、プロメガ・デュアル・ルシフェラーゼ・リポーター・キット(Promega Dual Luciferase Reporter kit)(Promega Corp.、マジソン、ウイスコンシン)を用いて行った。マルチドロップ装置(Multidrop instrument)(Lab systems、フランクリン、マサチューセッツ)を用い、プレートの各ウエル中の露出した細胞に基質を10のバッチにて直接加えた。基質添加後、プレートを直ちに密封し、ウォラック・マイクロベータ(Wallac Microbeta)1450(Perkin-Elmer Wallac Incorporated、ゲイサーズバーグ、メリーランド)をルミネセンスモードで用いてウエル当たり5秒読み取った。

10

【0031】

分泌胎盤アルカリホスファターゼ(SEAP)活性の測定は、CSPDと呼ばれる1,2ジオキセタンアルカリホスファターゼ基質(Tropix PE Applied Biosystems、ベッドフォード、マサチューセッツ)を用いて行った。アッセイには、65にて5~30分間、好ましくは30分間のインキュベーション、ついでL-ホモアルギニンを加えて5~20分間、好ましくは20分間のインキュベーションを含む2つのインキュベーション工程が含まれる。光の放射はシンチレーションカウンターまたはルミノメーターを用いて測定することができる。

20

【0032】

実施例 1

レニラルシフェラーゼリポーターウイルスの複製

よく特徴付けられたCXCR4親和性のHIV-1プロウイルスクローンであるpNL4-3構築物をHIV-1プロウイルスの構築のためのプロウイルスcDNA骨格として用いた。レニラルシフェラーゼ遺伝子をコードする3つのプロウイルスクローン、NL4R1uc、JRFNR1uc、およびJRFNFLucを構築した。NL4R1ucクローンは、HIV-1ゲノム中のnef遺伝子をレニラルシフェラーゼリポーター遺伝子で置換することによって構築した。NL4R1ucの子孫ピリオンは、CXCR-4をウイルス感染のためのコレセプターとして利用する。JRFNR1ucクローンは、NL4R1ucクローンのエンベロープ領域をHIV-1株JRFNLのエンベロープ領域で置換することによって構築した。JRFNFLucクローンは、JRFNR1ucクローンのレニラルシフェラーゼリポーター遺伝子をホタルルシフェラーゼ遺伝子で置換することによって構築した。JRFNR1ucおよびJRFNFLucの子孫ピリオンは、CCR5をウイルス感染のためのコレセプターとして利用する。

30

40

【0033】

これらクローンに由来するウイルスがインビトロで複製する能力を試験した。感染5日後、NL4R1ucに感染したMT-2#18細胞でのレニラルシフェラーゼ活性は非感染細胞で観察されるものと比較して1000倍以上であった(図5)。同様に、JRFNR1ucに感染したMT-2#18細胞でのレニラルシフェラーゼ活性は非感染細胞で観察されるものと比較して800倍以上であった(図6)。いずれのウイルスに感染した細胞でのレニラルシフェラーゼ活性の動力学もp24(成熟ピリオン中に存在するカプシドタンパク質)の産生と相関関係があった(図5および6)。このことは、検出されたレニラルシフェラーゼ活性がHIV-1のウイルス複製の結果であることを示唆している。NL

50

4 R 1 u c および J R F N R 1 u c ウイルスによる p 2 4 産生のレベルが野生型 p N L 4 - 3 の子孫ウイルスのレベルと実質的に同等であるとの知見は、レニラルシフェラーゼ遺伝子による n e f 遺伝子の置換が H I V - 1 のウイルス複製に対して有害な作用をもたらさないことを証明している (図 1 2) 。

【 0 0 3 4 】

細胞培養の N L 4 R 1 u c および J R F N R L u c 感染の後に生成する H I V - 1 ウイルスが細胞培養において新たな感染の繰り返しを開始できるか否かを決定するため、M T - 2 # 1 8 細胞を N L 4 R 1 u c または J R F N R L u c 上澄み液に感染させ、p 2 4 活性およびレニラルシフェラーゼ活性を測定した。図 7 に示すように、T 細胞株を 6 日間感染させた後に生成される N L 4 R 1 u c ウイルスはリポーター遺伝子を新たな M T - 2 # 1 8 細胞に形質導入することができた。同様に、T 細胞株を 6 日間感染させた後に生成される J R F N R L u c ビリオンはリポーター遺伝子を新たな M T - 2 # 1 8 細胞に形質導入することができた (図 8) 。これら結果は、N L 4 R 1 u c および J R F N R L u c ウイルスが感染細胞培養から伝播して新たな細胞培養において多数の複製の繰り返しを開始できること、それゆえ複製コンピテントであることを証明している。

【 0 0 3 5 】

H I V - 1 プロテアーゼインヒビターのアンブレナビル (A m p r e n a v i r) (G l a x o W e l l c o m e 、リサーチ・トライアングル・パーク、ノースカロライナ) および非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビターのエファビレンツ (E f a v i r e n z) (D u p o n t P h a r m a c e u t i c a l s 、ウイルミントン、デラウエア) を用い、N L 4 R 1 u c および J R F N R L u c ウイルスの複製特性を調べた。アンブレナビルおよびエファビレンツは H I V - 1 感染の介入のために臨床的に用いられているものである。逆転写酵素インヒビターであるエファビレンツは H I V - 1 複製サイクルの初期で作用するのに対し、プロテアーゼインヒビターであるアンブレナビルは H I V - 1 複製サイクルの後期で作用する。

【 0 0 3 6 】

表 1 に示すように、N L 4 R 1 u c および J R F N R L u c による M T - 2 # 1 8 細胞の感染はエファビレンツ並びにアンブレナビルによって抑制された。アンブレナビルは N L 4 R 1 u c および J R F N R L u c の複製をそれぞれ 1 9 . 4 n M および 6 . 9 n M の 5 0 有効濃度 (E C 5 0) 値で抑制し、エファビレンツは N L 4 R 1 u c および J R F N R L u c の複製をそれぞれ 0 . 3 6 n M および 0 . 1 2 n M の E C 5 0 で抑制した。H I V - 1 プロテアーゼインヒビターであるアンブレナビルは複製サイクルの後期にビリオンの成熟に際して作用し、単一サイクルの感染は抑制しない。それゆえ、これら結果はさらに、観察されたレニラルシフェラーゼリポーター遺伝子活性が N L 4 R 1 u c または J R F N R L u c の真正の複製の結果であることを証明している。

【 0 0 3 7 】

表 1

アンブレナビルおよびエファビレンツによるウイルス複製の抑制

プロウイルス	エファビレンツ E C 5 0	アンブレナビル E C 5 0
N L 4 R L u c	0.36 nM	19.4 nM
J R F N R L u c	0.12 nM	6.9 nM
J R F N F L u c	0.18 nM	> 10,000 nM
J R F N S E A P	0.10 nM	21.5 nM

10

20

30

40

50

【0038】

ついで、NL4R1ucおよびJRFNRLucウイルスの複製能をJRFNFLucウイルスの複製能と比較した。JRFNFLucはJRFNRLucとレニラルシフェラーゼ遺伝子の代わりにホタルシフェラーゼ遺伝子をコードしている点で異なる。JRFNFLucの構築は以前に報告されたのと同様の仕方で行った(チェン(Chen)ら、1994)。JRFNFLucによるT細胞株の感染は、NL4R1ucおよびJRFNRLucウイルスと全く同様にして行った。

【0039】

図9に示すように、JRFNFLucによる細胞の感染は、感染3日後に非感染細胞で観察されるものと比較して200倍以上のホタルシフェラーゼ活性の産生という結果となった。しかしながら、この活性レベルはこの時点以後に増大することはなく、p24活性も6日間の感染期間を通じてバックグラウンドレベルを超えることはなかった。これら結果は、成熟ウイルスコア粒子が生成されなかったことを示している。6日間感染後のJRFNFLuc上澄み液を非感染MT-2#18細胞に継代したところ、接種7日後までホタルシフェラーゼ活性もp24産生も検出できなかった(データは示していない)。これら結果は、これら上澄み液が新たな複製の繰り返しを開始できるウイルスを含んでいなかったことを示唆している。

【0040】

最後に、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビターであるエファビレンツはJRFNFLucを0.18nMの50有効濃度(EC50)値で抑制したが、HIV-1プロテアーゼインヒビターであるアンブレナビルは複製コンピテントなJRFNRLucの1000倍以上に相当する濃度の10μMでも該ウイルスを抑制できなかった(表1)。このウイルスが後期HIV-1複製サイクルインヒビターによって抑制することができないとの知見は、このウイルスが複製できないことのさらなる証拠である。以上を総合すると、これらデータは、JRFNFLucウイルスが感染の単一の繰り返しを行うことができるのみであり、複製コンピテントではないのに対し、NL4R1ucおよびJRFNRLucは感染の多数の繰り返しを行うことができ、真正に複製コンピテントなプロウイルスであることを強く示唆している。

【0041】

実施例2

SEAPリポーターウイルスの複製

JRFNRLuc中のレニラルシフェラーゼ遺伝子をSEAPをコードする遺伝子で置換することによりJRFNSEAPプロウイルス構築物を生成した。このプロウイルスクローンによって生成したウイルスがインビトロで複製する能力を試験した。感染6日後、JRFNSEAPに感染したMT-2#18細胞でのSEAP活性は非感染細胞で観察される活性の150倍以上であった。このウイルスに感染した細胞でのSEAP活性の動力学はp24活性と相関関係があった(図10)。このことは、検出されたSEAP活性がHIV-1のウイルス複製の結果であることを示唆している。JRFNSEAPウイルスによるp24産生のレベルが野生型pNL4-3の子孫ウイルスのレベルと実質的に同等であるとの知見は、SEAP遺伝子によるnef遺伝子の置換がHIV-1のウイルス複製に対して有害な作用をもたらさないことを証明している(図12)。

【0042】

ついで、細胞培養の感染後に生成するJRFNSEAPウイルスが細胞培養において新たな感染の繰り返しを開始できるか否かを決定するための試験を行った。図11に示すように、T細胞株を6日間感染させた後に生成されるJRFNSEAPウイルスはリポーター遺伝子を新たなMT-2#18細胞に形質導入することができた。これら結果は、JRFNSEAPウイルスが感染細胞培養から伝播して新たな細胞培養において多数の複製の繰り返しを開始できること、それゆえ複製コンピテントであることを証明している。

【0043】

上記HIV-1プロテアーゼインヒビターであるアンブレナビルおよび非ヌクレオシド逆

10

20

30

40

50

転写酵素インヒビターであるエファビレンツを用い、JRFNSEAPウイルスの複製特性を調べた。表1に示すように、JRFNSEAPによるMT-2#18細胞の感染はエファビレンツ並びにアンプレナビルによって抑制された。アンプレナビルはJRFNSEAPの複製を21.5nMの50有効濃度(EC50)値で抑制し、エファビレンツはJRFNSEAPの複製を0.10nMのEC50で抑制した。HIV-1プロテアーゼインヒビターであるアンプレナビルは複製サイクルの後期にビリオンの成熟に際して作用し、単一サイクルの感染は抑制しない。それゆえ、この知見は、観察されたSEAPリポーター遺伝子活性が真正のウイルス複製の結果であることをさらに証明している。

【0044】

参照文献

10

1. チェン(Chen)ら、1994, J. Virol. 68: 654 - 660
2. ターウィリガー(Terwilliger)ら、1989, PNAS 86: 3857 - 3861
3. マリム(Malim)ら、1992, J. Exp. Med. 176: 1197 - 1201
4. ヘ(He)およびランダウ(Landau)、1995, J. Virol. 69: 4587 - 4592
5. プラネレ(Planelles)ら、1995, Gene Therapy 2: 369 - 376
6. チェン(Chen)ら、1996, J. Virol. 70: 6044 - 6053
7. ページ(Page)ら、1997, Aids Research and Human Retro. 13: 1077 - 1081
8. ジャミエソン(Jamieson)およびザック(Zack)、1998, J. Virol. 72: 6520 - 6526
9. ワイスロウ(Weislow)ら、1989, J. of Nat. Cancer Inst. 81: 577 - 586

20

【0045】

10. アダチ(Adachi)ら、1986, J. Virol. 59: 284 - 291
11. オブライエン(O'Brien)ら、1990, Nature 348: 69 - 73
12. マシューズ(Matthews)ら、1977, Biochemistry 16: 85
13. エディンガー(Edinger)ら、1998, J. Virol. 72: 7934 - 7940
14. ウェイン-ホブソン(Wain-Hobson)ら、1985, Cell 40: 9 - 17
15. リ(Li)ら、1991, J. Virol. 65: 3973 - 3985
16. コルマン(Collman)ら、1992, J. Virol. 66: 7517 - 7521
17. ローレンツ(Lorenz)ら、1991, P.N.A.S. USA 88: 4438
18. リウ(Liu)ら、1999, Gene 237: 153 - 159

30

40

【0046】

本明細書に引用した全ての特許、特許出願、公開文献、参照マニュアル、出典および要約の内容は、本発明が関連する技術分野の技術の状態を一層完全に記載するためにその全体が参照のため引用される。

上記に記載した組成物および方法には本発明の範囲から逸脱しない限り種々の変更を施すことが可能なので、上記記載に含まれ、添付の図面に示され、または請求の範囲で定められる事項は全て例示のものとして解釈されるのであって限定的な意味でないことが意図さ

50

れる。

【図面の簡単な説明】

【図1】NL4RLucプロウイルス構築物の模式図である。

【図2】JRFNRLucプロウイルス構築物の模式図である。

【図3】JRFNFLucプロウイルス構築物の模式図である。

【図4】JRFNSEAPプロウイルス構築物の模式図である。

【図5】HIV-1プロウイルスpNL4RLucによって生成したHIV-1ウイルスの複製の動力学を示す。第0日目、第2日目および第5日目に測定したレニラルシフェラーゼ活性および成熟ウイルスカプシドタンパク質p24レベルを示す。

【図6】HIV-1プロウイルスJRFNRLucによって生成したHIV-1ウイルスの複製の動力学を示す。第0日目、第3日目および第6日目に測定したレニラルシフェラーゼ活性および成熟ウイルスカプシドタンパク質p24レベルを示す。 10

【図7】MT-2#18細胞のpNL4RLuc感染後に生成したHIV-1ウイルスはMT-2#18細胞において新たな感染の繰り返しを開始することができたことを示す。

【図8】MT-2#18細胞のJRFNRLuc感染後に生成したHIV-1ウイルスはMT-2#18細胞において新たな感染の繰り返しを開始することができたことを示す。

【図9】HIV-1プロウイルスJRFNFLucによって生成したHIV-1ウイルスの複製の動力学を示す。

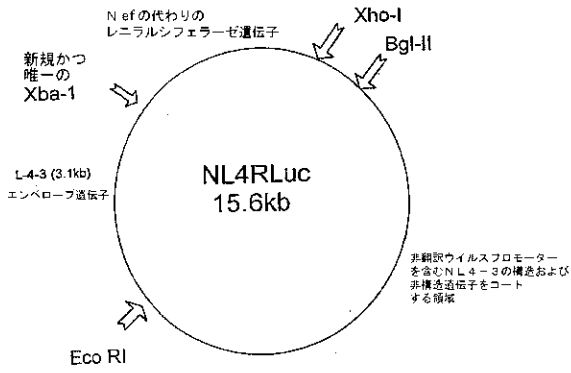
【図10】HIV-1プロウイルスJRFNSEAPによって生成したHIV-1ウイルスの複製の動力学を示す。第0日目、第3日目および第6日目に測定したSEAP活性および成熟ウイルスカプシドタンパク質p24レベルを示す。 20

【図11】MT-2#18細胞のJRFNSEAP感染後に生成したHIV-1ウイルスはMT-2#18細胞において新たな感染の繰り返しを開始することができたことを示す。

【図12】種々のHIV-1リポーターウイルスおよびpNL4-3ウイルスのp24活性を示す。

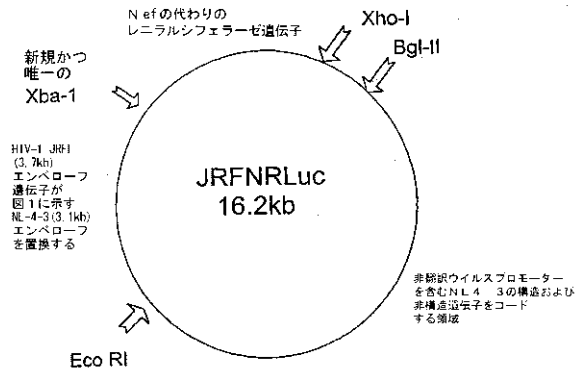
【 図 1 】

Figure 1



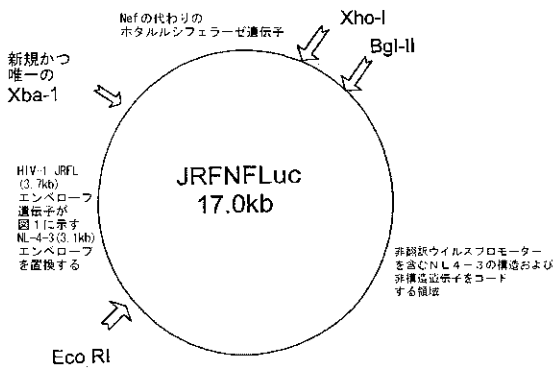
【 図 2 】

Figure 2



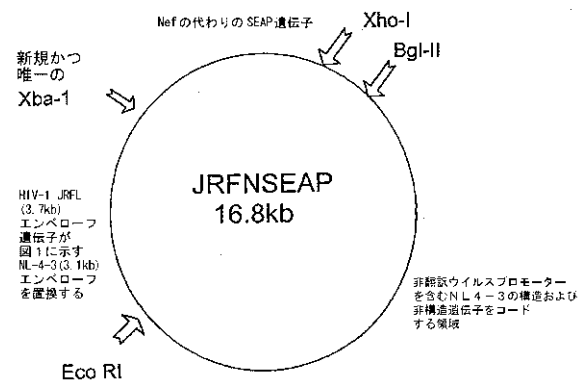
【 図 3 】

Figure 3

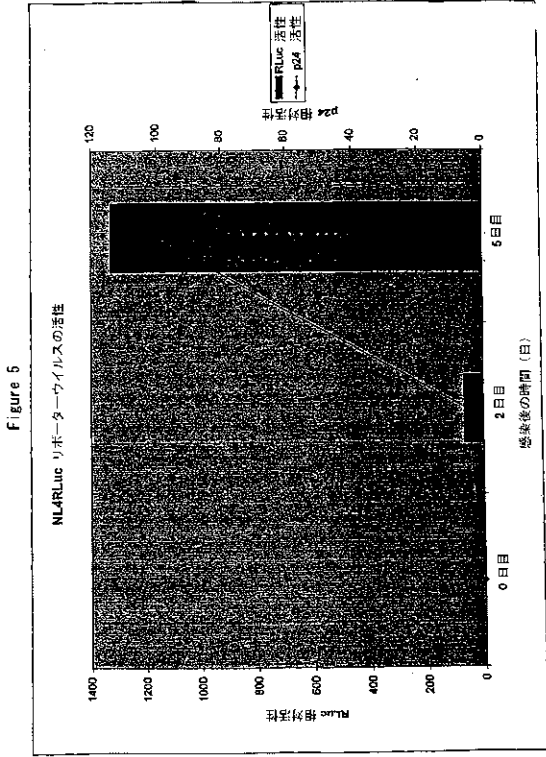


【 図 4 】

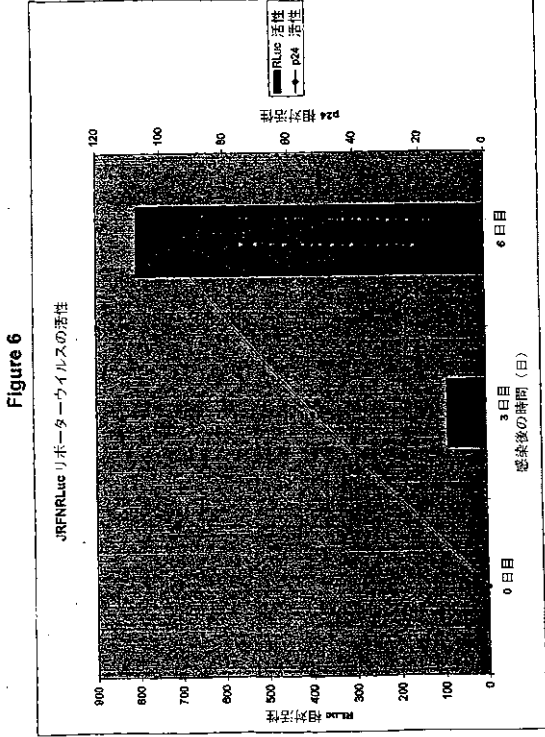
Figure 4



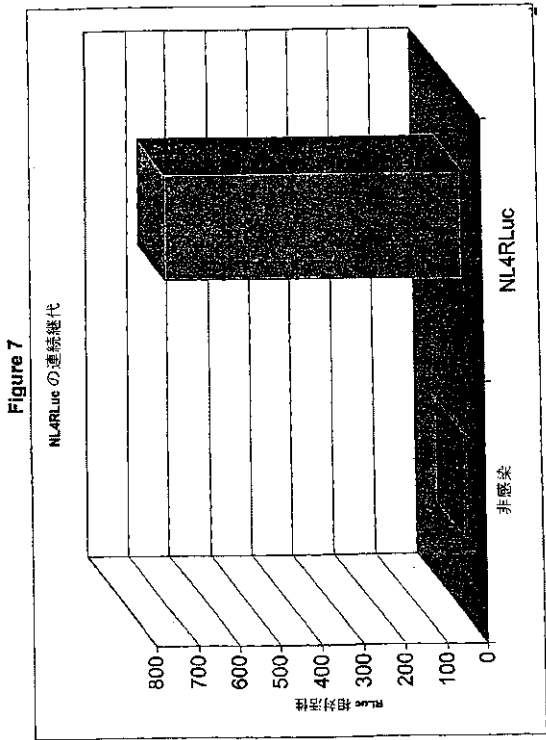
【 図 5 】



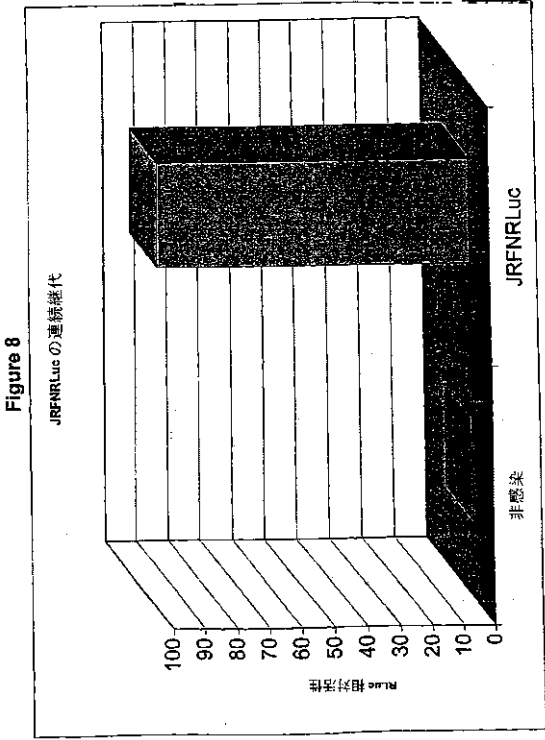
【 図 6 】



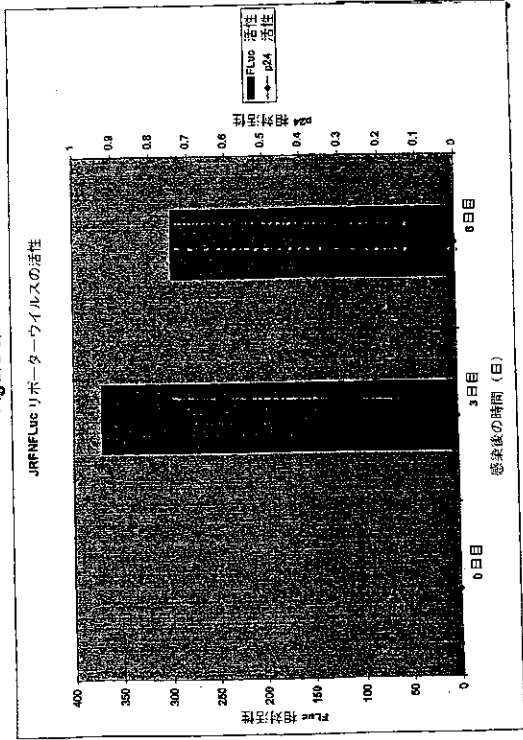
【 図 7 】



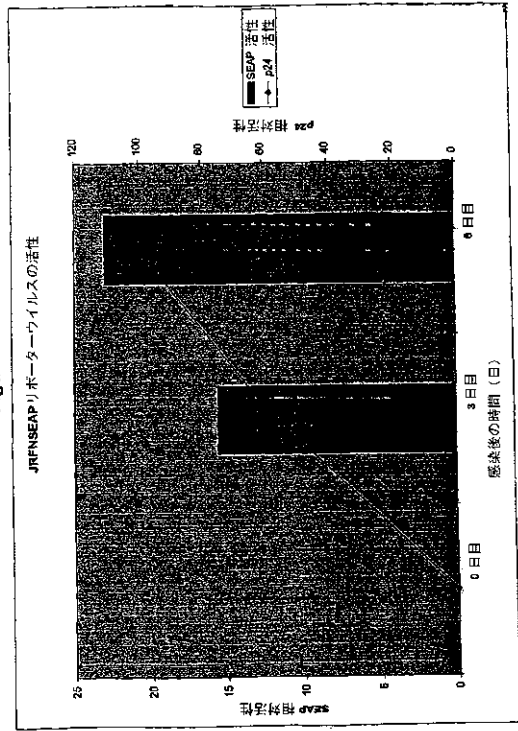
【 図 8 】



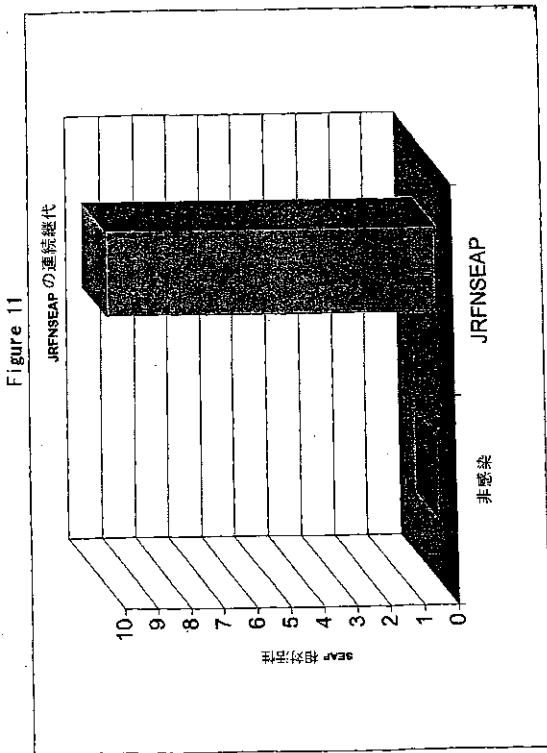
【 図 9 】



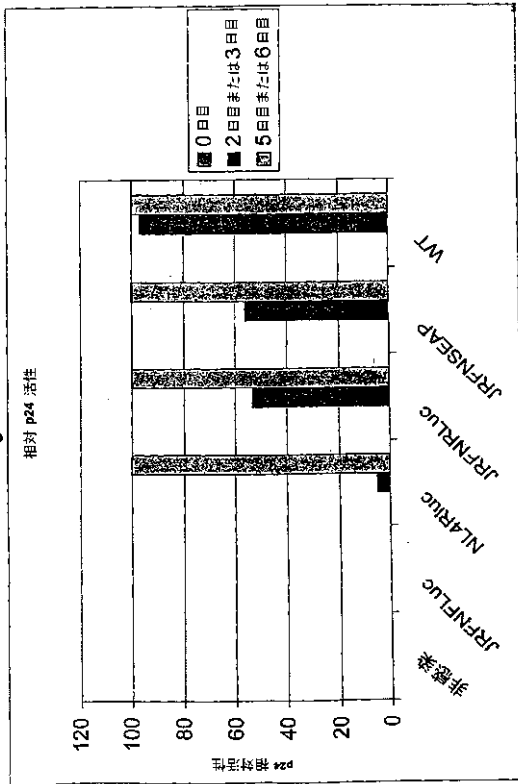
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96610 A1

(51) International Patent Classification: C12Q 1/70, 1/68, C12N 15/86, G01N 33/30 (74) Agent: MOROZ, Eugene, Morgan & Finnegan, L.L.P., 345 Park Avenue, New York, NY 10154 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/18438 (81) Designated States (national): AU, CA, JP.

(22) International Filing Date: 7 June 2001 (07.06.2001) (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/210,626 9 June 2000 (09.06.2000) US

Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(71) Applicant: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US], Route 206 and Provincetown Road, Princeton, NJ 08540 (US). For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(72) Inventors: BLAIR, Wade, 1022 Cima Drive, San Marcos, CA 92069 (US); SPICER, Timothy, E. 15 Lantern Lane, Wethersfield, CT 06109 (US).



WO 01/96610 A1

(54) Title: HIV-1 REPORTER VIRUSES AND THEIR USE IN ASSAYING ANTI-VIRAL COMPOUNDS

(57) Abstract: The present invention relates to HIV-1 proviral constructs, which produce replication competent HIV-1 reporter viruses. The invention also relates to the use of these HIV-1 reporter viruses in high throughput screening of anti-viral compounds.

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-1-

TITLE OF THE INVENTIONHIV-1 REPORTER VIRUSES AND THEIR USE
IN ASSAYING ANTI-VIRAL COMPOUNDSFIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to replication competent HIV-1 proviral constructs that encode a reporter gene, preferably either the renilla luciferase or the secreted placental alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene. The invention further relates to the use of these proviral construct virions in high throughput screening of compounds that inhibit HIV-1 replication.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Replication of the type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1) in cell culture is commonly measured by quantitating the production of viral reverse transcriptase (RT) activity, quantitating mature viral capsid proteins (i.e., p24) in the cell supernatant, or by quantitating viral RNA copy number by reverse transcriptase directed polymerase chain reaction methods (RT-PCR). Alternatively, HIV-1 replication can be measured indirectly by quantitating viral induced cytopathic effect (cpe) on the infected cells using dye reduction methods such as XTT and MTT (Weislow et al, 1989). In the case of HIV-1 RT or p24 assays, the cumbersome nature of the methods exclude these type of analyses for high throughput anti-viral assays. Analysis of HIV replication by dye reduction methods such as XTT, on the other hand, involves a single step process and thus allows for higher throughput. However, as dye reduction methods are often performed after the majority of cells in the culture have been infected and

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-2-

killed, they may result in a reduction in sensitivity in the identification of less efficacious HIV-1 inhibitors. In addition, as dye reduction methods rely on significant cytopathic effect, they can not be used to accurately measure the replication of HIV strains that do not exhibit aggressive replication kinetics in cultured cell lines, such as non-syncytium inducing HIV-1 strains.

The generation of HIV-1 reporter viruses afforded an alternative to the traditional methods of measuring HIV-1 replication. Single-cycle infectious HIV-1 reporter viruses encoding luciferase as the reporter gene have been described (Chen et al., 1994). Those viruses allow simple and rapid analysis of approximately the first half of the HIV-1 replication cycle, including viral entry, reverse transcription, integration, and gene expression. However, steps post HIV gene expression in the infected cell, such as HIV protease mediated processing of viral precursor polypeptides required for virion maturation, are not easily measured using those viruses. In order to analyze the full replication cycle of HIV and to follow HIV-1 dissemination through a population of cells, replication competent reporter viruses are required. Several replication competent HIV-1 reporter viruses that can be used for the analysis of HIV-1 replication have been generated (Terwilliger, et al., 1989; Malim et al. 1992; He & Landau, 1995; Pianelles, et al., 1995; Chen et al., 1996; Page et al., 1997; Jamieson and Zack, 1998). However, those reporter viruses are not useful for high volume anti-viral assays because the reporter gene products they encode cannot be measured by simple

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-3-

and rapid assays. For example, the expression of the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) reporter gene can only be measured by cumbersome enzymatic assays with a limited range of sensitivity. Similarly, reporter viruses that encode a marker gene require fluorescence-activated cell sorting to identify HIV infected cells.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to HIV-1 proviruses, which produce replication competent HIV-1 reporter viruses. These proviruses encode an HIV-1 genome in which a region of the genome that is not essential to viral replication has been substituted by a reporter gene, preferably, the renilla luciferase, a derivative of the renilla luciferase gene or the secreted placental alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene. Derivatives of the renilla luciferase gene include amino acid or nucleotide substitutions in the wild type Renilla luciferase sequence (i.e. cys-ala substitutions) that result in a functional renilla luciferase enzyme. (Liu, et al., (1999)). The expression of the reporter gene is dependent on bonifide viral replication and can be detected using a simple and rapid assay.

The replication competent HIV-1 proviruses of the invention may be constructed using any replication competent HIV-1 proviral clones derived from any HIV-1 viral strain. In one embodiment, a replication competent HIV-1 provirus is constructed by replacing the nef gene of the HIV-1 proviral clone pNL4-3 with the renilla luciferase reporter gene. The resulting provirus produces T-tropic viruses that utilize CXCR4 as

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-4-

the co-receptor for viral infection. Other examples of reporter genes that can be used include, but are not limited to, the SEAP gene, the CAT gene or the green fluorescence protein gene (GFP).

In another embodiment, a replication competent HIV-1 provirus is constructed by replacing the nef gene of the HIV-1 proviral clone pNL4-3 with the renilla luciferase reporter gene, and replacing the envelope gene of pNL4-3 with the envelope gene of the HIV-1 provirus JRFL. The resulting provirus produces macrophage-tropic viruses that utilize CCR5 as the co-receptor for viral infection.

In yet another embodiment, a replication competent HIV-1 provirus is produced by replacing the nef gene of the HIV-1 proviral clone pNL4-3 with the SEAP reporter gene, and the envelope gene of pNL4-3 with the envelope gene of the HIV-1 proviral clone JRFL. The resulting provirus, designated JRFNSEAP, produces macrophage-tropic viruses that utilize CCR5 as the co-receptor for viral infection.

Other examples of envelope genes that can be used for generating the HIV-1 provirus of the invention include, but are not limited to, HIV-1 envelopes that display tropism for any of the CC or CXCR chemokine receptors or any HIV-1 isolate envelope that is capable of initiating infection of a eukaryotic cell or cells.

The invention also relates to the use of the HIV-1 replication competent reporter viruses of the invention in high throughput in vitro screening of compounds that inhibit HIV-1 replication.

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-5-

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 is a schematic representation of the pNL4RLuc proviral construct.

Figure 2 is a schematic representation of the JRFNRLuc proviral construct.

Figure 3 is a schematic representation of the JRFNFLuc proviral construct.

Figure 4 is a schematic representation of the JRFNSEAP proviral construct.

Figure 5 shows the kinetics of replication of HIV-1 viruses produced by the HIV-1 provirus pNL4RLuc. Renilla luciferase activity and the level of mature viral capsid protein p24 measured on days 0, 2 and 5 are shown.

Figure 6 shows the kinetics of replication of HIV-1 viruses produced by the HIV-1 provirus JRFNRLuc. Renilla luciferase activity and the level of mature viral capsid protein p24 measured on days 0, 3 and 6 are shown.

Figure 7 shows that HIV-1 virus produced following pNL4RLuc infection of MT-2 #18 cells were capable of initiating new rounds of infection in MT-2 #18 cells.

Figure 8 shows that HIV-1 virus produced following JRFNRLuc infection of MT-2 #18 cells were capable of initiating new rounds of infection in MT-2 #18 cells.

Figure 9 shows the kinetics of replication of HIV-1 viruses produced by the HIV-1 provirus JRFNFLuc.

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-6-

Figure 10 shows the kinetics of replication of HIV-1 viruses produced by the HIV-1 provirus JRFNSEAP. SEAP activity and the level of mature viral capsid protein p24 measured on days 0, 3 and 6 are shown.

Figure 11 shows that HIV-1 virus produced following JRFNSEAP infection of MT-2 #18 cells were capable of initiating new rounds of infection in MT-2 #18 cells.

Figure 12 shows the p24 activity of the various HIV-1 reporter viruses and the pNL4-3 virus.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to replication competent HIV-1 proviruses. These replication competent HIV-1 proviruses are produced by replacing a region of an HIV-1 viral genome that is not essential to viral replication with a reporter gene, preferably the renilla luciferase gene, a derivative of the renilla luciferase gene or the secreted placental alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene. Derivatives of the renilla luciferase gene include amino acid or nucleotide substitutions in the wild type Renilla luciferase sequence (i.e. cys-ala substitutions) that result in a functional renilla luciferase enzyme. (Liu, et al., (1999)). The expression of the reporter gene is dependent on bonifide viral replication and therefore serves as a method for quantifying viral replication. The expression of the reporter gene can be detected using a simple and rapid assay.

To construct the replication competent HIV-1 proviruses of the invention, a non-debilitating reporter gene, for example the renilla luciferase reporter gene,

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-7-

can be inserted anywhere in the HIV-1 viral genome so long as it does not disrupt the replication of the virus. Preferably, the reporter gene is inserted into the HIV-1 genome by replacing a region of the viral genome that is not essential to viral replication. Examples of such regions include, but are not limited to, the nef gene, the vpr gene, and fragments of the nef gene and vpr gene. Fragments of the nef and vpr gene are generally 1 to 300 nucleotides in length.

The replication competent HIV-1 proviruses of the invention may be constructed using any replication competent HIV-1 proviral clones derived from any HIV-1 viral strain. Examples of such clones include, but are not limited to, pNL4-3 (Adachi, et al., 1986), pYU-2 (Lai et al., 1991), p89.6 (Collman et al., 1992) and HIV-1 Lai (Wain-Hobson et al., 1985).

In one embodiment, a replication competent HIV-1 provirus is produced by replacing the nef gene of the HIV-1 proviral clone pNL4-3 with the renilla luciferase reporter gene. The resulting provirus, designated NL4Rluc, produces T-tropic viruses that utilize CXCR4 as the co-receptor for viral infection.

In another embodiment, a replication competent HIV-1 provirus is produced by replacing the nef gene of the HIV-1 proviral clone pNL4-3 with the renilla luciferase reporter gene, and the envelope gene of pNL4-3 with the envelope gene of the HIV-1 proviral clone JRF1. The resulting provirus, designated JRFNRluc, produces macrophage-tropic viruses that utilize CCR5 as the co-receptor for viral infection.

In yet another embodiment, a replication competent HIV-1 provirus is produced by replacing the

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-8-

nef gene of the HIV-1 proviral clone pNL4-3 with the SEAP reporter gene, and the envelope gene of pNL4-3 with the envelope gene of the HIV-1 proviral clone JRFL. The resulting provirus, designated JRFNSEAP, produces macrophage-tropic viruses that utilize CCR5 as the co-receptor for viral infection.

The expression of the renilla luciferase reporter gene, derivatives of the renilla luciferase gene or the SEAP reporter gene in cells infected with the HIV-1 viruses of the invention is dependent on bonifide viral replication in cell culture and can be detected using methods known in the art. In one embodiment, renilla luciferase activity is measured by adding the renilla luciferase substrate coelenteramine (Promega Corp., Madison, WI) to cells infected with the provirus. As renilla luciferase converts coelenteramine to coelenteramide with the concomitant production of CO₂ and light, the renilla luciferase activity may be detected by light emission which can be quantified using a scintillation counter or a luminometer.

In another embodiment, the SEAP activity is measured by adding the SEAP substrate CSPD (Tropix PE Applied Systems, Bedford, MA), a luminescence enhancer, and a buffer system that inhibits endogenous non-placental alkaline phosphatase activity to the supernatants from infected cell cultures. Upon dephosphorylation of the substrate by SEAP, a metastable phenolate anion intermediate is formed which decomposes and emits light. The light emission can be measured utilizing a scintillation counter or a luminometer.

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-9-

It is understood that other substrates of renilla luciferase or SEAP known in the art may be used to measure renilla luciferase activity or SEAP activity.

As the replication of the HIV-1 viruses of the invention in cell culture can be readily measured using simple and rapid assays, the invention also relates to the use of these HIV-1 viruses in high throughput screening of compounds that inhibit HIV-1 replication.

In one embodiment, the method of screening comprises adding a test compound to cells infected with the viral stock of a replication competent provirus of the invention and measuring the level of renilla luciferase or SEAP activity 2 to 7 days, preferably 6 days, following incubation. In another embodiment, viral stocks may be added to a test compound together with the cells to be infected.

Suitable cells or cell lines for use in the screening of anti-viral compounds include, but are not limited to, MT-2 cell, MT-2 #18 cells, PM-1, CEM SS and Jurkat cells.

The level of renilla luciferase or SEAP activity in cells treated with the test compound is compared to that of the infected control cells. A reduction in the level of renilla luciferase or SEAP activity in cells treated with the test compounds relative to the level in the control cells indicates that the test compound may have the ability to inhibit HIV-1 viral replication. Preferably, the reduction is between 50 to 90%, and more preferably, it is more than 90%.

Viral stocks of the HIV-1 viruses of the invention can be generated by methods well known to

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-10-

those skilled in the art. In one embodiment, viral stocks are prepared by transfecting a proviral clone of the invention into cell cultures and harvesting the supernatants of the transfected cells. Transfection may be done using methods known in the art such as calcium phosphate, electroporation or liposome mediated transfection. Examples of cells that may be used for transfection include, but are not limited to, HEK 293 cells, Jurkat cells and CEM cells.

By measuring the change in the level of renilla luciferase or SEAP activity in cells treated with the test compound, it is possible to determine the effectiveness of the test compound in inhibiting viral replication as well as the degree of the effectiveness.

The present invention will now be described by way of examples, which are meant to illustrate, but not limit, the scope of the invention.

Examples

Materials and Methods

Cell Lines and Cell Culture Conditions

The MT-2 cell line, a CD4+ human malignant T-cell line, obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Bethesda, MD), were propagated in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Life Technologies, Gaithersburg, MD) containing 10 % fetal Bovine serum (FBS, Life Technologies). This cell line naturally expresses CD4 and CXCR4 and was transformed to express human CCR5, the macrophage tropic HIV-1 co-receptor. The transformed cell line was designated by their clonal population number as MT-2 #18 and was cultured as its parental cell line MT-2 with the addition of 0.5mg/ml of geneticin

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-11-

(Life Technologies, Gaithersburg, MD). MT-2 #18 cells are permissive to HIV-1 infection via use of either CXCR4 co-receptor for T-tropic viruses or HIV-1 infection via CCR5 co-receptor for macrophage-tropic viruses.

HEK 293-T is a human embryonic kidney cell line transformed with the SV-40 large T-antigen. HEK 293-T cells were propagated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies, Gaithersburg, MD) containing 10 % fetal Bovine serum.

Construction of Reporter Viruses

The HIV-1 proviral clone pNL4-3 (Adachi, et al., 1986) was used to construct the proviruses. To construct the NL4RLuc proviral clone (Fig. 1), a unique Xba I endonuclease restriction site was introduced immediately 3' of the envelope coding sequences in pNL4-3. A 191 base pair segment between the introduced Xba I site and the Bgl II endonuclease restriction site in *Nef* were deleted and replaced by a unique Xho I endonuclease restriction site. The 947 base pair renilla luciferase reporter gene (RLuc) (Matthews et al., and Lorenz et al. was then inserted into the modified pNL4-3 using the introduced Xba I and Xho I sites. The resulting construct, NL4RLuc, is 756 base pairs longer than the pNL4-3 construct.

To construct the proviral clone JRFNRLuc (Fig. 2), the envelope-coding region of NL4RLuc (approximately 3,100 base pairs) was removed via the Eco RI site, located immediately 5' to the envelope coding sequence, and the aforementioned unique Xba I site. This fragment was replaced by the envelope coding region of HIV-1 JRF1 (approximately 3,700 base pairs) (O'Brien, et al.,

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-12-

1990). The envelope coding region of the JRFL clone was prepared utilizing PCR amplification and recombinant cloning of this region at the Eco RI and Xba I sites. The JRFNRLuc cDNA clone (Fig. 3) was constructed by replacing the renilla luciferase gene in JRFNRLuc (947 base pairs) with the firefly luciferase gene (1,706 base pairs). The proviral clone JRFNSEAP was constructed by replacing the renilla luciferase gene in JRFNRLuc with the SEAP encoding gene (1,557 base pairs) utilizing the Xba I and Xho I sites (Fig.4).

Preparation of Virus Stocks

HEK 293 cells were transfected with the NL4RLuc, JRFNRLuc, JRFNRLuc or JRFNSEAP proviral clone using LipofectAMINE plus (Life Technologies, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions. Approximately 3×10^7 cells were used in each transfection. Transfected cell supernatants were harvested 72 hours after transfection, clarified by low speed centrifugation, and stored at -70°C . Infectious virus was thawed and titered using MT-2 #18 cells.

Infection of Cells and p24 assay

MT-2 #18 cells were pelleted and infected with virus stocks at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 at 37°C for 2hrs. Viruses were removed and cells were washed twice with 1xPBS before re-suspending in a final concentration of 10,000 cells/100 μL . Infectivity and drug sensitivity assays were carried out in 96 well tissue culture plates, and kinetic studies were carried out in T-25 flasks. Cell supernatants were harvested on day 0, 2, 3, 5 or 6, and passaged virus was harvested on day 2 or 3. The activity for the capsid protein p24 was

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-13-

analyzed according to manufacturer's protocol utilizing the Zephtometrix Retrotek product (Zephtometrix Incorporated, Buffalo, NY).

High Throughput Screening Assay

Large volume cultures of MT-2 #18 cells were prepared and kept at a concentration of less than 0.5×10^6 cells per milliliter in RPMI media with 10% fetal calf serum. Test compounds were plated into a 96 well tissue culture treated clear bottom black plates (Corning Incorporated, Corning, NY) at a concentration of 3 mM in 20 microliters of dionized water and 5% dimethyl sulfoxide. MT-2 #18 cells were pelleted via low speed centrifugation and re-suspended in fresh media. Reporter viruses were added to the fresh media and cells to obtain the appropriate MOI of 0.01 and a cell concentration of 1×10^4 in 160 microliters. Twenty microliters per well of 2X complete modified eagle's media was then added to compensate for the dionized water volume. 180 microliters of this mixture is then added to each test compound well and control wells. Following a 5 to 6 day incubation at 37°C, media was aspirated from the wells utilizing a 12-channel manifold.

Renilla luciferase activity was measured using the Promega Dual Luciferase Reporter kit (Promega Corp., Madison, WI). Substrate was added to the plates directly onto the bare cells in each well utilizing a Multidrop instrument (Labsystems, Franklin, MA) in batches of ten. Following the substrate addition, plates were immediately sealed and read for 5 seconds per well in a Wallac Microbeta 1450 (Perkin-Elmer Wallac

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-14-

Incorporated, Gaithersburg, MD) in the luminescence mode.

Secreted placental alkaline phosphatase (SEAP) activity was measured using the a 1,2 dioxetane alkaline phosphatase substrate called CSPD (Tropix PE Applied Biosystems, Bedford, MA). The assay includes two incubation steps including incubation at 65°C for 5-30 minutes but, preferably 30 minutes, and then adding L-homocysteine for a period of 5-20 minutes, preferably 20 minutes. Light emission can be measured utilizing a scintillation counter or a luminometer.

Example 1

Replication of Renilla Luciferase Reporter Viruses

The pNL4-3 construct, a well-characterized CXCR4-tropic HIV-1 proviral clone, was used as the proviral cDNA backbone for the construction of HIV-1 proviruses. Three proviral clones encoding the renilla luciferase gene, NL4Rluc, JRFNRLuc, and JRFNFLuc, were constructed. The NL4Rluc clone was constructed by replacing the nef gene in the HIV-1 genome with the renilla luciferase reporter gene. The NL4Rluc progeny virions utilize CXCR-4 as the co-receptor for viral infection. The JRFNRLuc clone was constructed by replacing the envelope region of the NL4Rluc clone with the envelope region of the HIV-1 strain JRFL. The JRFNFLuc clone was constructed by replacing the renilla luciferase reporter gene of the JRFNRLuc clone with the firefly luciferase gene. The progeny virions of JRFNRLuc and JRFNFLuc utilize CCR5 as the co-receptor for viral infection.

The ability of viruses derived from these clones to replicate in vitro was tested. Five days following infection, renilla luciferase activity in MT-2 #18 cells infected with NL4Rluc was more than 1000-fold over what was observed in uninfected cells (Fig. 5). Similarly, the production of renilla luciferase activity in MT-2 #18 cells infected with JRFNRLuc was more than 800-fold over what was observed in uninfected cells (Fig. 6). The kinetics of renilla luciferase activity in cells infected with either virus correlated with p24 (a capsid protein present in mature virions) production (Figs. 5 and 6). This suggests that the renilla luciferase activity detected resulted from HIV-1 viral replication. The finding that the level of p24 production by the NL4Rluc and JRFNRLuc viruses was virtually identical to that of the wild type pNL4-3 progeny virus demonstrates that replacement of the nef gene by the renilla luciferase gene had no detrimental effect on HIV-1 viral replication (Fig. 12).

To determine whether the HIV-1 viruses produced following NL4Rluc and JRFNRLuc infection of cell cultures were capable of initiating new rounds of infection in cell culture, MT-2 #18 cells were infected by NL4Rluc or JRFNRLuc supernatants and p24 activity and renilla luciferase activity were measured. As shown in Fig. 7, NL4Rluc viruses produced after infection of T-cell lines for 6 days were capable of transducing the reporter gene to fresh MT-2 #18 cells. Likewise, JRFNRLuc virions produced after infection of T-cell lines for 6 days were capable of transducing the reporter gene to fresh MT-2 #18 cells (Fig. 8). These results demonstrate that the NL4Rluc and JRFNRLuc

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-16-

viruses are capable of being passed from infected cell cultures to initiate multiple rounds of replication in fresh cell cultures and hence, are replication competent.

The replication property of the NL4Rluc and JRFNRLuc viruses was studied using the HIV-1 protease inhibitor Amprenavir (Glaxo Wellcome, Research Triangle Park, NC) and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor Efavirenz (Dupont Pharmaceuticals, Wilmington, DE). Amprenavir and Efavirenz are clinically used for the intervention of HIV-1 infection. The reverse transcriptase inhibitor Efavirenz acts early in the HIV-1 replication cycle, whereas the protease inhibitor Amprenavir acts late in the HIV-1 replication cycle. As shown in Table 1, infection of MT-2 #18 cells by NL4Rluc and JRFNRLuc was inhibited by Efavirenz as well as by Amprenavir. Amprenavir inhibited NL4Rluc and JRFNRLuc replication with an effective concentration 50 (EC 50) value of 19.4 nM and 6.9nM, respectively, and Efavirenz inhibited NL4Rluc and JRFNRLuc replication at an EC50 of 0.36 nM and 0.12nM, respectively. The HIV-1 protease inhibitor Amprenavir acts late in the replication cycle during virion maturation and would not inhibit a single cycle infection. Therefore, the results further demonstrate that the observed renilla luciferase reporter gene activity results from bona fide NL4Rluc or JRFNRLuc replication.

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-17-

Table 1
Inhibition of Viral Replication
by Amprenavir and Efavirenz

Provirus	Efavirenz EC50	Amprenavir EC50
NL4RLuc	0.36nM	19.4nM
JRFNRLuc	0.12nM	6.9nM
JRFNFLuc	0.18nM	>10,000nM
JRFNSEAP	0.10nM	21.5nM

The replication ability of the NL4RLuc and JRFNRLuc viruses were then compared to that of the JRFNFLuc virus. JRFNFLuc differs from JRFNRLuc in that it encodes the firefly luciferase gene instead of the renilla luciferase gene. JRFNFLuc was constructed in a fashion similar to that previously reported (Chen et al., 1994). Infection of T-cell lines by JRFNFLuc was carried out exactly as that was done for NL4RLuc and JRFNRLuc viruses. As shown in Fig. 9, infection of cells with JRFNFLuc resulted in the production of firefly luciferase activity that was over 200-fold what was observed in uninfected cells 3 days after infection. However, the level of activity did not increase beyond this point in time and p24 activity never increased above background levels during the course of 6 days. The results indicate that mature virus core particles were not being made. Upon passing the day 6 post infection JRFNFLuc supernatant onto uninfected MT-2 #18 cells, no firefly luciferase activity or p24 production could be detected up to seven days post inoculation (data not shown). The results suggest that the supernatants did not contain virus capable of initiating

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-18-

new rounds of replication. Finally, the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor Efavirenz inhibited JRFNRLuc with an effective concentration 50 (EC 50) value of 0.18 nM but the HIV-1 protease inhibitor Amprenavir was unable to inhibit this virus at 10 μ M; a concentration that is over 1000 fold that of the replication competent JRFNRLuc (Table 1). The finding that this virus was not capable of inhibition by a late stage HIV-1 replication cycle inhibitor is further evidence of it not being able to replicate. Taken together, these data strongly suggests that the JRFNRLuc virus is only capable of a single round of infection and is not replication competent, whereas NL4RLuc and JRFNRLuc are capable of multiple rounds of infection and are bona fide replication competent proviruses.

Example 2

Replication of the SEAP Reporter Virus

The JRFNSEAP proviral construct was made by replacing the renilla luciferase gene in the JRFNRLuc with the gene encoding SEAP. The ability of viruses produced by the proviral clone to replicate in vitro was tested. Six days following infection, SEAP activity in MT-2 #18 cells infected with JRFNSEAP was more than 150-fold greater than the activity observed in the uninfected cells. The kinetics of SEAP activity in cells infected with the virus correlated with p24 activity (Fig.10). This suggests that the SEAP activity detected resulted from HIV-1 viral replication. The finding that the level of p24 production by the JRFNSEAP virus was virtually identical to that of the wild type pNL4-3 progeny virus demonstrates that replacement of

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-19-

the nef gene by the SEAP gene had no detrimental effect on HIV-1 viral replication (Fig. 12).

Experiments were then carried out to determine whether the JRFNSEAP virus produced following infection of cell cultures was capable of initiating new rounds of infection in cell culture. As shown in Fig.11, JRFNSEAP virus produced after infection of T-cell lines for 6 days was capable of transducing the reporter gene to fresh MT-2 #18 cells. The results demonstrate that the SEAP reporter virus is capable of being passed from infected cell cultures to initiate multiple rounds of replication in fresh cell cultures and, hence, is replication competent.

The replication property of the JRFNSEAP virus was studied using the HIV-1 protease inhibitor Amprenavir and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor Efavirenz as described above. As shown in Table 1, infection of MT-2 #18 cells by JRFNSEAP was inhibited by Efavirenz as well as by Amprenavir. Amprenavir inhibited JRFNSEAP replication with an effective concentration 50 (EC 50) value of 21.5nM, and Efavirenz inhibited replication at an EC50 of 0.10nM. The HIV-1 protease inhibitor Amprenavir acts late in the replication cycle during virion maturation and would not inhibit a single cycle infection. Therefore, the finding further demonstrates that the observed SEAP reporter gene activity results from bonifide viral replication.

References

1. Chen et al., 1994, J. Virol. 68:654-660.
2. Terwilliger, et al., 1989, PNAS 86:3857-3861.
3. Malim et al., 1992, J. Exp. Med. 176:1197-1201.
4. He & Landau, 1995, J. Virol. 69:4587-4592.
5. Flannelles, et al., 1995, Gene Therapy 2:369-376.
6. Chen et al., 1996, J. Virol. 70:6044-6053.
7. Page et al., 1997, Aids Research and Human Retro. 13:1077-1081.
8. Jamieson and Zack, 1998, J. Virol. 72: 6520-6526.
9. Weislow et al., 1989, J. of Nat. Cancer Inst. 81: 577-586.
10. Adachi et al., 1986, J. Virol. 59: 284-291.
11. O'Brien et al., 1990, Nature 348: 69-73.
12. Matthews et al., 1977, Biochemistry 16: 85.
13. Edinger et al., 1998, J. Virol. 72: 7934-7940.
14. Wain-Hobson et al., 1985, Cell 40: 9-17.
15. Li et al., 1991, J. Virol. 65: 3973-3985.
16. Collman et al., 1992, J. Virol. 66: 7517-7521.
17. Lorenz et al., 1991, P.N.A.S. USA 88: 4438.
18. Liu et al., 1999, Gene 237: 153-159.

The contents of all patents, patent applications, published articles, reference manuals, texts and abstracts cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety to more fully describe the state of the art to which the present invention pertains.

As various changes can be made in the above compositions and methods without departing from the scope and spirit of the invention, it is intended that all subject matter contained in the above description, shown in the accompanying drawings, or defined in the appended claims be interpreted as illustrative, and not

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-21-

in a limiting sense.

CLAIMS

1. A vector that encodes a replication competent HIV-1 virus, said vector comprising an HIV-1 genome in which a region non-essential for viral replication has been replaced by a reporter gene.
2. The vector according to claim 1 wherein said reporter gene is selected from the group consisting of the renilla luciferase reporter gene, the SEAP reporter gene, the CAT gene, and the green fluorescence protein gene.
3. The vector according to claim 2 wherein said reporter gene is selected from the group consisting of the renilla luciferase reporter gene and the SEAP reporter gene.
4. The vector according to claims 1, 2 or 3 wherein the region non-essential for viral replication encodes the nef gene or a fragment of the nef gene.
5. The vector according to claims 1, 2 or 3 wherein the region non-essential for viral replication encodes the vpr gene or a fragment of the vpr gene.
6. The vector according to claims 1, 2 or 3 wherein the HIV-1 genome is the genome of the pNL4-3 proviral clone.
7. The vector according to claims 1, 2 or 3 wherein the HIV-1 genome is the genome of the pYU-2 proviral clone.
8. The vector according to claims 1, 2 or 3 wherein the HIV-1 genome is the genome of the p89.6 proviral clone.

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-23-

9. The vector according to claims 1, 2 or 3 wherein the HIV-1 genome is the genome of the HIV-1 Lai proviral clone.

10. A cell comprising the vector of claim 1, 2 or 3.

11. A method of screening for compounds that exhibit anti-viral activity against HIV-1 comprising:

a) adding a test compound to mammalian cells infected or cells to be infected

with the vector according to claim 1, 2 or 3; and

b) comparing reporter gene activity in cells exposed to the test compound to the level of expression in control cells,

wherein a reduction in the level of reporter gene expression indicates the test compound inhibits HIV-1 replication.

12. The method according to claim 8, wherein the mammalian cells are MT-2 #18 cells.

13. A vector that encodes a replication competent HIV-1 virus, said vector comprising an HIV-1 genome in which a region non-essential for viral replication has been replaced by a nucleic acid sequence encoding a functional renilla luciferase enzyme.

14. The vector according to claim 13 wherein the renilla luciferase gene contains a cysteine to alanine substitution that results in a functional renilla luciferase enzyme.

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-24-

15. The vector according to claim 13 wherein the region non-essential for viral replication encodes the nef gene or a fragment of the nef gene.

16. The vector according to claim 13 wherein the region non-essential for viral replication encodes the vpr gene or a fragment of the vpr gene.

17. The vector according to claim 13 wherein the HIV-1 genome is the genome of the pNL4-3 proviral clone.

18. The vector according to claim 13 wherein the HIV-1 genome is the genome of the pYU-2 proviral clone.

19. The vector according to claim 13 wherein the HIV-1 genome is the genome of the p89.6 proviral clone.

20. The vector according to claim 13 wherein the HIV-1 genome is the genome of the HIV-1 Lai proviral clone.

21. A cell comprising the vector of claim 13.

22. A method of screening for compounds that exhibit anti-viral activity against HIV-1 comprising:

- a) adding a test compound to mammalian cells infected or cells that will be infected with the vector according to claim 13; and
- b) comparing reporter gene activity in cells exposed to the test compound to the level of expression in control cells.

WO 01/96610

PCT/US01/18438

-25-

wherein a reduction in the level of reporter gene expression indicates the test compound inhibits HIV-1 replication.

23. The method according to claim 13, wherein the mammalian cells are MT-2 #18 cells.

Figure 1

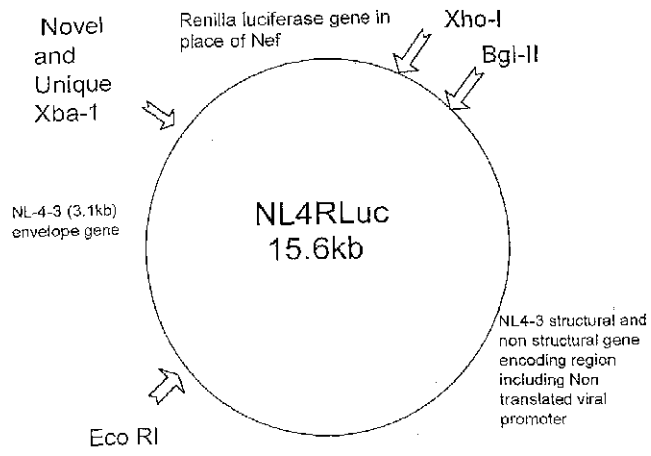


Figure 2

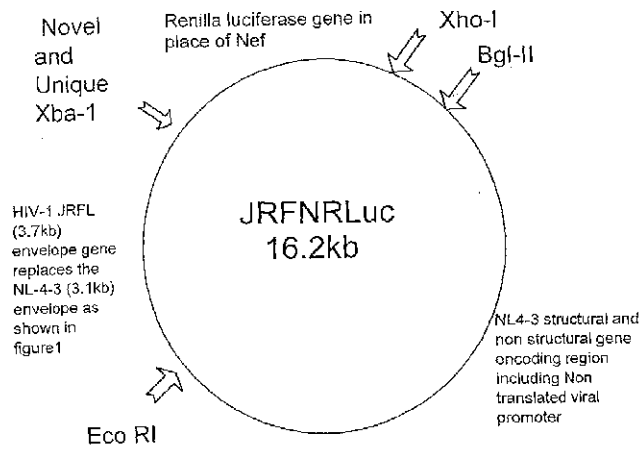


Figure 3

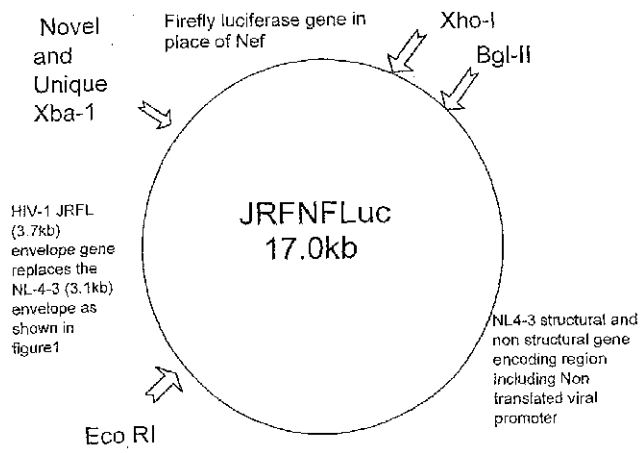


Figure 4

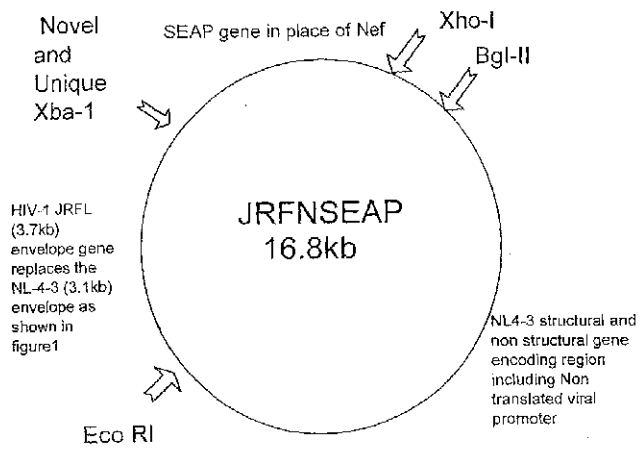


Figure 5

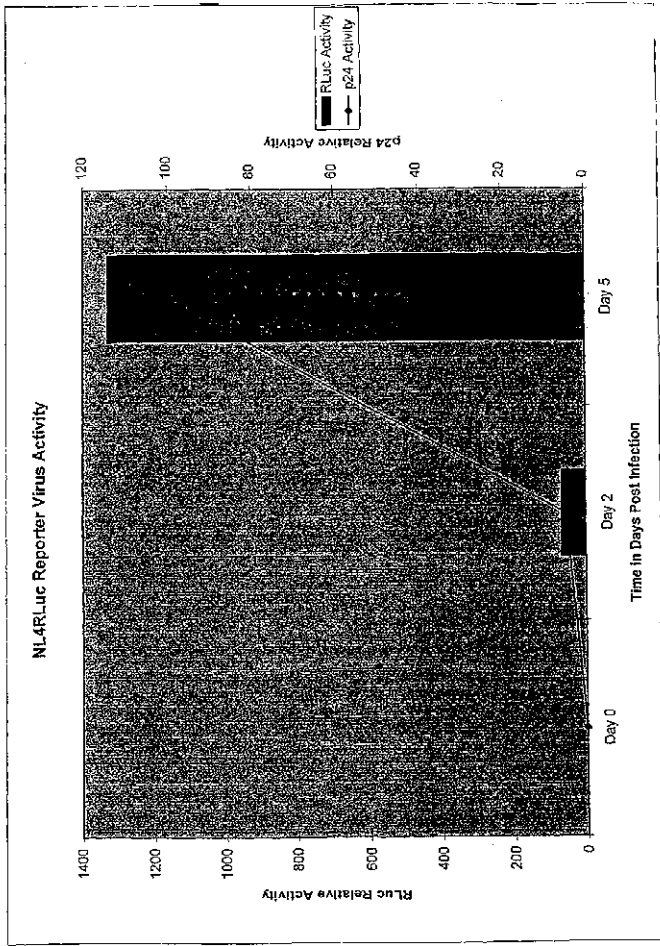


Figure 6

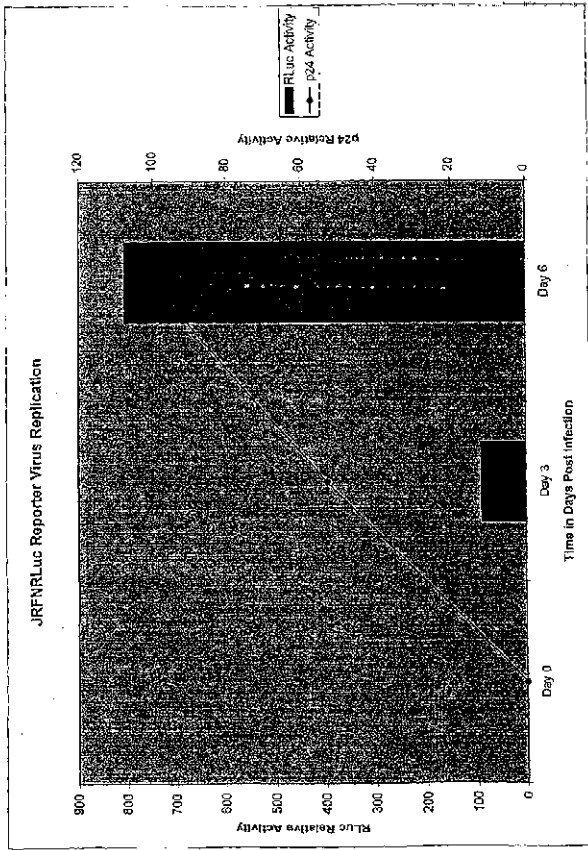
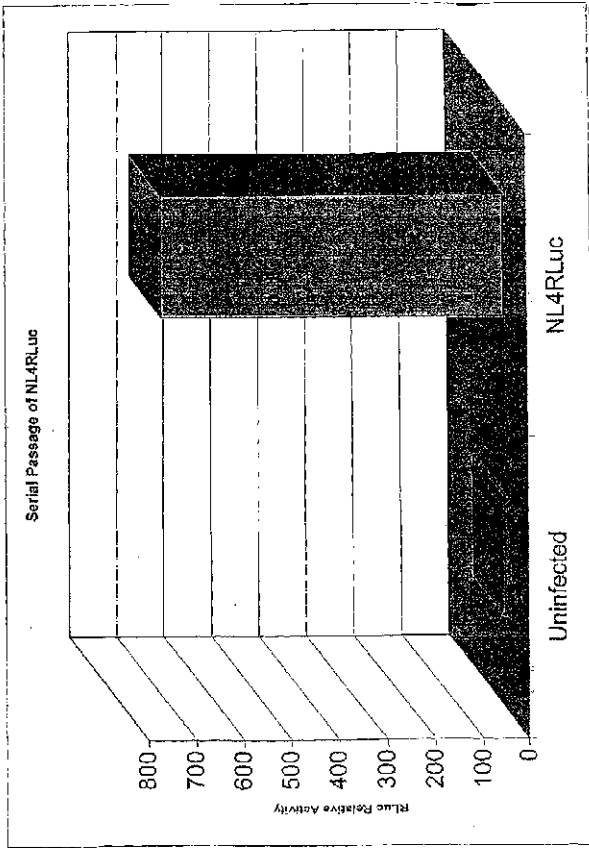


Figure 7



WO 01/96610

8/12

PCT/US01/18438

Figure 8

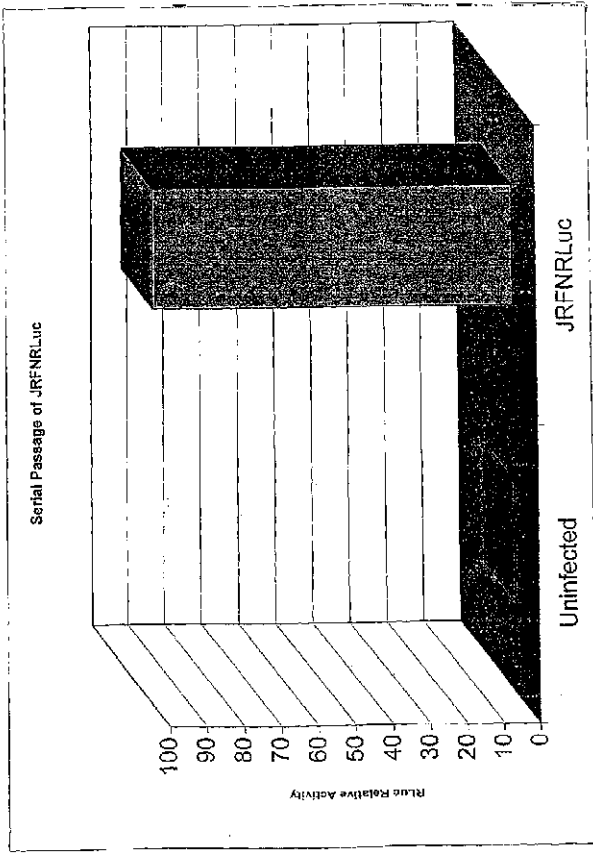


Figure 9

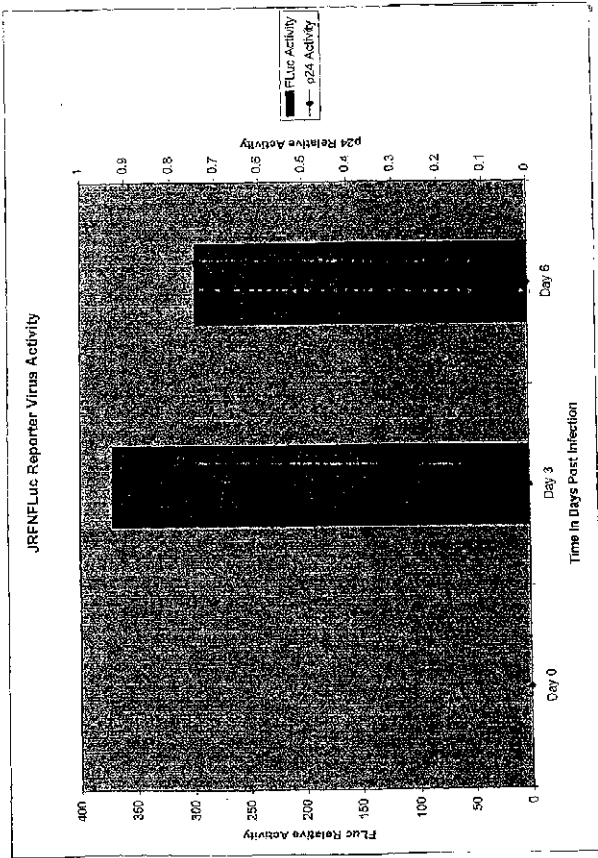
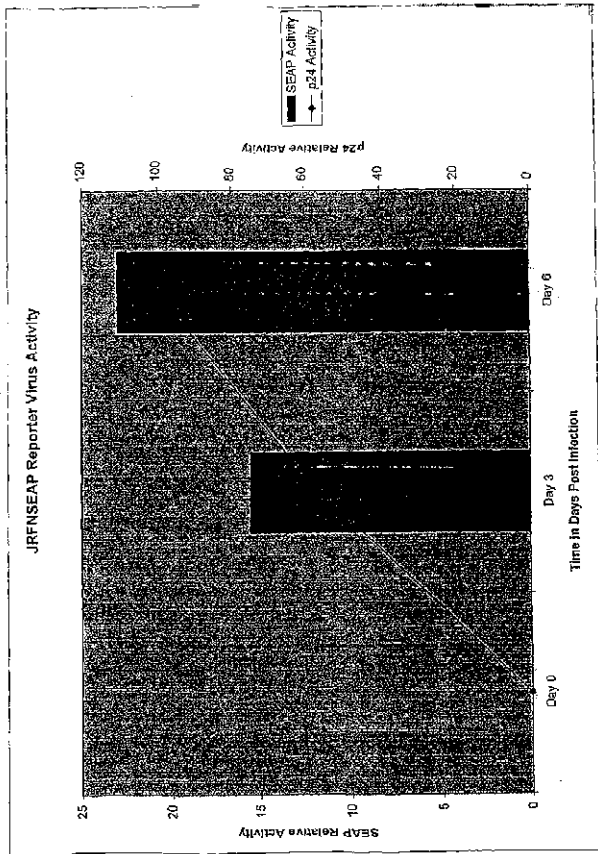


Figure 10



WO 01/96610

11/12

PCT/US01/18438

Figure 11

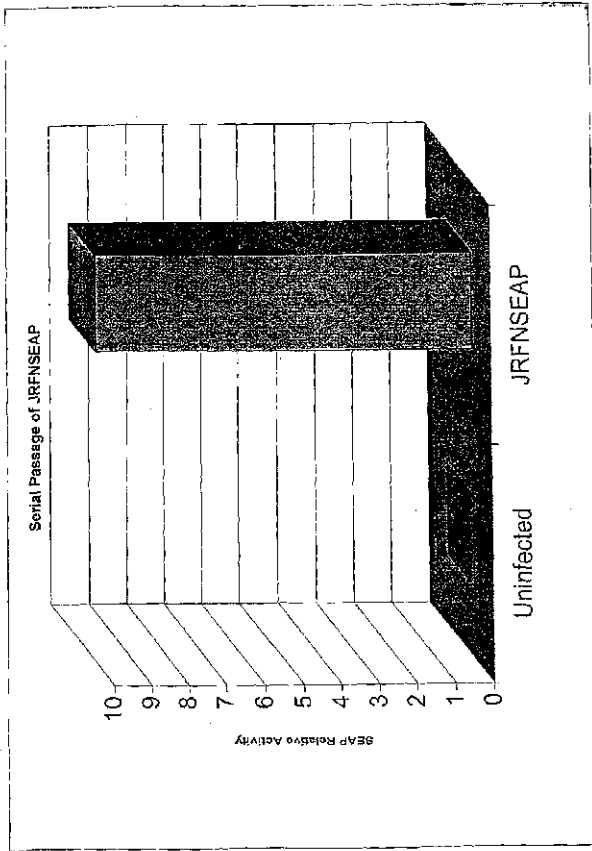
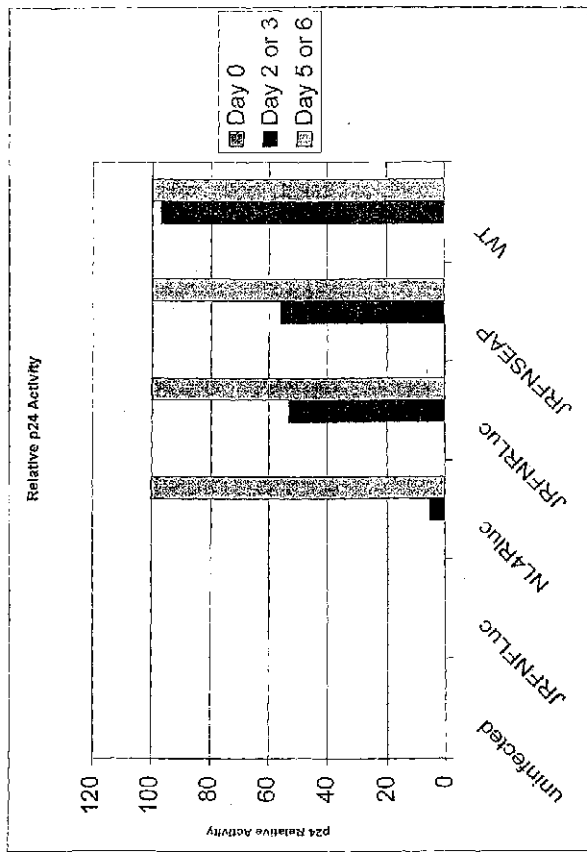


Figure 12



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/18438
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/70 C12Q1/68 C12N15/86 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documented search (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, MEDLINE, EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, SCISEARCH, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant class No.
X	EP 0 361 749 A (DANA FARBER CANCER INST INC) 4 April 1990 (1990-04-04) the whole document	1, 2, 4, 6-12 3, 13-23
X	JAMIESON BD ET AL: "In vivo pathogenesis of a human immunodeficiency virus type 1 reporter virus" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 72, no. 8, August 1998 (1998-08), pages 6520-6526, XP002142662 ISSN: 0022-538X cited in the application	1-3, 5-10, 12
Y	the whole document	13-21, 23
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document of the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document not published or after the international filing date *I* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than its priority date claim ** later document published after the international filing date or priority date and not to conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *C* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *T* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered on its own or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *S* document member of the same patent family		
Date of final search completion of the international search 21 November 2001		Date of mailing of the international search report 05/12/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 6018 Patentplan 2 DK - 2250 HV RISELIG Tel. (+45) 730 340 2340, Telex 31 051 epon dk, Fax (+45) -73 340 3010		Authorized officer Niemann, F

Form PCT/ISA/210 (personal copy) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/18438

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Description of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HE JIANGLIN ET AL: "Use of a novel human immunodeficiency virus type 1 reporter virus expressing human placental alkaline phosphatase to detect an alternative viral receptor." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 7, 1995, pages 4587-4592, XP002183580 ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document	1-4, 6-10,12
Y	---	13-21,23
X	CHEN BENJAMIN K ET AL: "Distinct modes of human immunodeficiency virus type 1 proviral latency revealed by superinfection of nonproductively infected cell lines with recombinant luciferase-encoding viruses." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 2, 1994, pages 654-660, XP002183581 ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document	1-4, 6-10,12
Y	---	13-21,23
X	PAGE KATHLEEN A ET AL: "Use of a green fluorescent protein as a marker for human immunodeficiency virus type 1 infection." AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 13, no. 13, 1997, pages 1077-1081, XP802183582 ISSN: 0889-2229 cited in the application the whole document	1,2,4, 6-10,12
Y	---	3,13-23
Y	LIU J ET AL: "Improved assay sensitivity of an engineered secreted Renilla luciferase" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 237, no. 1, 3 September 1999 (1999-09-03), pages 153-159, XP004183507 ISSN: 0378-1119 cited in the application the whole document	3,13-23

*See PCT/US 01/18438 (Continuation of International Application No. PCT/US 01/18438)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/18438

Patent documents cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
EP 0361749	A 04-04-1990	AT 118247 I	15-02-1995
		CA 1336075 A1	27-06-1995
		DE 68921034 D1	23-03-1995
		EP 0361749 A1	04-04-1990
		JP 2211882 A	23-08-1990
		US 6033902 A	07-03-2000

*See PCT/US/01/18438 (parent family members) (only EP-C)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B

(72)発明者 ウェイド・ブレアー

アメリカ合衆国 9 2 0 6 9 カリフォルニア州サン・マルコス、シマ・ドライブ 1 0 2 2 番

(72)発明者 ティモシー・ピー・スパイサー

アメリカ合衆国 0 6 1 0 9 コネチカット州ウェザーズフィールド、ランタン・レイン 1 5 番

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA08 CA04 CA05 CA06 CA09 DA02 EA02 FA10 GA11
 GA18 GA19 HA08 HA12
 4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ22 QR08 QR14 QR20 QR32 QR38 QR41
 QR42 QR58 QR59 QR66 QR69 QR77 QR79 QR80 QS12 QS28
 QS36 QX02
 4B065 AA90X AA90Y AA97Y AB01 AC14 BA02 CA28 CA60