(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
A61K 39/21

(11) 공개번호 특2001-0074495
(43) 공개일자 2001년08월04일

(21) 출원번호 10-2000-7012062
(22) 출원일자 2000년10월30일
번역문 제출일자 2000년10월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US1999/06556
(86) 국제출원출원일자 1999년04월30일
(87) 국제공개번호 WO 1999/56774
(87) 국제공개일자 1999년11월11일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 남아프리카, 아랍에미리트, 그레나다, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 유고슬라비아, 짐바브웨, 가나, 감비아,
AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀랜드, 사이프러스,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기네비쏘,

(30) 우선권주장 60/083,652 1998년04월30일 미국(US)
09/302,171 1999년04월29일 미국(US)

(71) 출원인 유니버시티 오브 써던 캘리포니아
추후제출
미국 캘리포니아주 90007 로스앤젤레스 스윗 313 사우스 호프 스트리트 3716

(72) 발명자 두바스안젤린
미국캘리포니아주91107파사데나에스.그랜드옥크스345
에흐레스만글렌
미국캘리포니아주91101알타데나미도우브룩로드1941

(74) 대리인 김태홍
김승호
김진회

심사청구 : 없음

(54) 시에이이브이 및 에이치아이브이-1 유전 인자를 함유하는바이러스 키메라

요약

본 발명은 염소 관절염-뇌염 바이러스 및 HIV-1의 게놈의 일부를 포함하는 폴리뉴클레오티드, 즉 "CHIV"로서 언급되는 키메라 레트로바이러스를 제공한다. 또한, 본 발명은 CHIV 면역원 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 백신을 제공한다. CHIV 면역원의 치료적 유효량을 투여함으로써 개체에 인간 면역결핍성 바이러스-1 감염에 대한 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 본 발명은 나아가 CHIV 면역원의 치료적 유효량을 림프구와 접촉시킴으로써 시험관내 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다.

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 면역학 및 의학 분야, 보다 구체적으로는 HIV-1에 대한 면역 반응을 일으키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

후천성 면역결핍증(AIDS)의 발병은 대부분 감염에 의하며, 특히 아프리카, 아시아 및 카리브의 제3 세계에서 발병한다. AIDS의 원인 물질은 인간 면역결핍 바이러스(HIV-1)이다. HIV-1은 영장류 렌티바이러스(lentivirus)이며 이것은 1950년대에 아프리카의 원숭이 집단에서 인간으로 종을 교차한 것으로 생각된다.

인간에서 HIV-1은 2종류의 일차 세포 유형, 즉 대식세포 및 T 림프구를 감염시킨다. 통상적인 감염에 있어서, 대식세포성 균주는 한 사람의 체액으로부터 다른 사람의 피부 또는 점액의 대식세포로 이전된다. 초기에는 바이러스가 임상적 질병을 발병시키지 않으면서 대식세포에서 복제될 수 있다. 감염이 진행되면서 바이러스의 빠른 돌연변이 생성 속도로 인해 다양한 균주가 생산되며, 이것은 낮은 복제도를 갖는 역전사효소에 부분적으로 기인한다. 결과적으로 T 세포성(T Cell-tropic) HIV-1 균주가 나타나 면역계의 결핍 및 AIDS로 알려진 임상적 발현을 가져오게 된다.

이러한 진행은 부분적으로 숙주의 면역계 인자에 따라 통상 6년 내지 10년 이상 걸린다. 그러나, T-세포성 HIV-1 균주는 또한 직접 이동하여 더욱 빠른 감염 경로를 만들 수 있다. 질병이 진행하면서 숙주의 면역계는 바이러스 감염에 의해 결핍되는 만큼 빨리 T 세포 집단을 대체시킬 수 있어서 T 세포 수준의 갑작스런 감소를 일으킬 수 있다. 결과적으로 통상 AIDS 환자는 건강한 개체에서는 일반적으로 최악의 상태에서도 가벼운 병을 일으킬 수 있는 감염때문에 사멸하게 된다.

연구를 위해 수억 달러를 지불하였지만, 진행을 억제하는 것이 유일한 질병 처치 방법이다. 초기에는 치료법이 면역 손상 환자에게 발생한 기회적 감염을 치료하는 방법으로 제한되었다. 나중에는 AZT, ddC 및 ddI와 같은 뉴클레오시드 유사체가 HIV-1 복제를 방해할 수 있음을 인식하였다. 이러한 약물, 특히 이들 약물과 함께 사용되는 것은 일부 AIDS 환자의 생명을 연장하였다. 최근에는 프로테아제 억제제로 불리는 약물의 부류가 HIV-1 복제를 억제하는데 매우 효

과적인 것으로 증명되었다. 뉴클레오시드 유사체와 함께 사용되는 경우에 프로테아제 억제제는 일부 환자에서 예견할 수 없는 수준으로 바이러스 역가를 감소시켰다. 최근에는 미국에서 AIDS에 의한 사망률이 감염 초기 이래 처음으로 감소되었다. 이것은 적어도 부분적으로, 위험한 행동을 자제토록 하는 교육 프로그램과 병행한 이러한 치료법의 결과로 생각된다.

이러한 치료법에 대한 희망은 복합 약물 칵테일에 대한 저항성에 뒤따르는 위험으로 인하여 사라졌다. 게다가, 프로테아제 억제제 및 여러 가지 뉴클레오티드 유사체로 치료받은 일부 환자에서 바이러스의 순환 수준은 떨어진 반면, 이러한 치료는 상기 환자로부터 바이러스를 제거하지 못한다. 바이러스 보유체는 순환 바이러스가 검출되지 않는 환자, 예를 들면 림프계 및 대식세포에도 남아있다고 생각된다. 또한, 순환 바이러스가 존재하지 않는 곳에도, 바이러스의 확산은 HIV-1로 이미 감염된 세포의 융합성질(fusogenic properties)때문에 발생할 수도 있다. 결국 약물 칵테일은 모든 환자에게 긍정적 결과를 가져오지 못하며, 따라서 모든 바이러스 균주에 대해 효과적인 것 같지 않다.

또한, 복합 약물 치료법에 의해 요구되는 까다로운 용법은 환자의 순응도(compliance)에 문제를 야기한다. 치료받는 환자가 더 오랜 기간동안 생존하기 때문에, 이러한 순응도 문제가 증가하여, 궁극적으로 환자는 약물 칵테일에 저항성을 갖는 HIV-1 균주의 생성 및 확산을 위한 통로가 될 수 있다.

또한, 미국의 일부 환자들은 이러한 고가의 복합 제제를 살 수 있지만, 이러한 약물의 비용은 많은 제3 세계 사람들의 연간 소득을 훨씬 초과한다. 이것은 제3 세계에서 HIV-1 감염이 빠르게 증가하기 때문에 특히 심각하다.

HIV-1 감염의 예방이 바람직한 접근임에 명백하다. 백신은 예방을 수행하는 데 합리적인 선택이다. 예를 들면, 백신은 폴리오, 홍역, 천연두 및 인플루엔자를 비롯한 다양한 바이러스 질병을 예방하거나 경감시키는데 사용되어 왔다. 또한, 백신은 바이러스로 이미 감염된 개체에서 면역계를 자극할 수 있다. 예를 들면, 광견병 백신은 감염된 동물에게 물린 경우와 같은 감염 발생 후에만 투여한다.

HIV-1 감염에 대한 사람의 저항성을 증가시키는 백신을 개발하기 위해 많은 시도가 있었으나, 최근에는 심각한 한계로 고심하고 있다. 예를 들면, HIV-1 단백질 일부를 포함하는 백신 또는 죽은 HIV-1 바이러스를 사용하는 백신을 생산하였다. 그러나, HIV-1는 바이러스 복제 동안 빠르게 돌연변이를 일으켜 면역계가 반응할 수 있기에는 너무 빠르게 신규한 변이체를 생산한다. 결과적으로, 특정 HIV-1 단백질 또는 균주에 대하여 자극받는 면역 반응은 감염 동안 발생하는 변이체에 대하여 효과적이지 않다. 또한, HIV-1 표면 단백질의 일부를 보유한 예방접종은 HIV-1 감염을 예방하기보다는 감염을 촉진할 수 있는 항체의 생산을 자극할 수 있다. 살아있으나 복제 결핍의 바이러스로 구성된 약독된 백신이 제안되었다. 그러나, 이러한 HIV-1 바이러스를 개체, 특히 다른 건강한 사람에게 주사하는 것에 대한 정당화된 관심이 존재한다. 따라서, HIV-1에 대한 면역 반응을 제공하나 백신제로서 HIV-1을 함께 사용하는 데 관련된 한계 및 참여자의 위험을 동반하지 않는 백신을 요구하게 되었다.

HIV-1 감염 및 가능한 백신 전략을 연구하는 동물 모델을 개발하는 한 접근법에서 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV)와 HIV-1간의 재조합 바이러스 또는 하급 영장류를 감염시킬 수 있는 SHIV를 발생시켰다. SHIV 모델의 생체내 행동은 레트로바이러스(retorvirus) 병리 및 숙주 반응의 다양한 측면을 설명하였다. 이것은 숙주 범위, 세포변성 및 중화항체의 특이성이 외피 서열에 의해 결정됨을 보여준다[Luciw et al.,Proc. Natl. Acad, Sci.92:7490-7494(1995)]. 살아있는 약독된 백신으로 사용되는 SHIV는 SIV의 점막 공격에 대하여 일본 원숭이(macaques)를 효과적으로 보호하는 것으로 나타났다[Baba et al., Science 267:1820-1825 (1995); Quesada-Rolander et al.,AIDS Res. Hum. Retro.12:993-999(1996)].

1985년 및 1986년에, HIV-1 및 염소 관절염-뇌염 바이러스(CAEV)의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열간의 관계가 설명되었다. CAEV 및 HIV-1은 계통발생적으로 밀접하게 관련되어 있고, 예를 들면 CAEV의 gp135/38과 HIV-1의 gp120/41 사이 및 RNA-의존성 DNA 폴리머라아제(pol)사이에 고도의 동종성을 공유하고 있다[참조;Gonda et al.Proc Natl. Acad. Sci., USA83:4007-4111(1986); Conda et al.,Retroviridae3:83-109(1994); Gary et al.,Retroviridae4:491-603(1995)]

CAEV는 염소를 감염시키고 일부 감염된 동물에서 면역계의 비정상을 야기한다[참조; Banks et al.,Arthrit, Rheum. 30:1046-1053(1987); Crawford et al.,Science207:997-999(1980)]. CAEV는 염소에서 3가지의 질병 증상과 관련이 있다. 즉, 관절염은 감염된 동물의 20-30%에서 발병하고, 백질뇌염은 어린 동물에게 발병하며, 산발성 신경계의 질병은 성숙한 염소에서 발병한다. 그러나, 감염된 동물의 60%는 장기간 진행이 없으나 임상적으로 명백하지 않은 손상이 진행되고 있다[Cheevers et al.,Lab. Invest.58;510-517(1988); Knowles et al.,J. Virol.64:2396-2398(1990); Perry et al.,J.Infect. Dis.171:328-334(1995)]. CAEV 감염은 세계 도처에서 발견되며, 염소 무리의 80%가 어느 정도의 감염으로 고통받는 것으로 추산된다.

CAEV는 감염된 우유, 특히 초유를 통해 염소들간에 전이되며, 어린 동물에게 먹이는 초유 풀링(pooling)의 농업적 관행에 의해 감염이 확산된다. CAEV는 단핵세포/대식세포 계통의 세포 및 섬유아세포 세포주에서 번식한다. 그러나. T 세포는 감염시키지 않는다. CAEV를 발현하는 대식세포는 감염된 염소의 활액, 폐, 중추신경계, 림프절, 지라, 위장관 및 유선에 분포되어 있다.

당업계에서는 영장류, 특히 인간에서 HIV-1에 대한 면역 반응을 생성할 수 있는 비병원성 렌티바이러스에 대한 필요성이 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명은 이러한 요구를 만족시키고 추가적 장점을 제공한다. 한 구체예에서 키메라 레트로바이러스 게놈을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 CAEV 및 HIV-1의 인자를 포함하도록 제공된다. 이 키메라 레트로바이러스는 CHIV로 간주된다. 레트로바이러스 게놈은 CHIV를 비병원성으로 하는데 필요한 기타 CAEV 코딩 서열 및 HIV-1 외피 유전자와 함께 CAEV로부터의 조절 서열을 포함한다. 기타 레트로바이러스 유전자는 CAEV 또는 HIV-1로부터 제공될 수 있다. CHIV는 적어도 하나의 포유류 숙주 세포에서 증식될 수 있어야 한다.

나아가 본 발명은 면역 반응을 자극할 수 있는 CHIV 면역원을 제공한다. 한 구체예에서, CHIV 면역원은 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자이다. 또 다른 구체예에서, CHIV 면역원은 발현 생성물에 대한 면역 반응을 자극하기 위해 유기체에 삽입되었을 경우 발현될 수 있는 폴리뉴클레오티드 발현 작제물이다.

또한, 본 발명은 CHIV 면역원 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 백신을 제공한다. 본 발명의 백신은, 예를 들면 인간 또는 다른 영장류에서 인간 면역결핍 바이러스(HIV-1)에 대한 면역 반응을 자극하는 데 유용하다.

또한, 본 발명은 CHIV 면역원을 개체에 투여함으로써 HIV-1에 대한 개체에서 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 이러한 반응은 예를 들면, 이전에 HIV-1에 노출되지 않은 개체의 HIV-1 감염에 대한 저항성을 증가시키는 데 또는 HIV-1 감염된 개체에서 HIV-1에 의하여 야기된 병의 심각한 정도를 완화시키는 데 유용하다. 게다가, 본 발명은 CHIV 면역원과 림프구를 접촉시켜 시험관내 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다.

발명의 상세한 설명

본원에서 제시된 키메라 CAEV/HIV-1 레트로바이러스(" CHIV")는 CAEV의 코아(core) 및 HIV-1의 면역원능(immunogenicity)을 갖는 약독화된 생 AIDS 백신을 개발하는 신규한 접근법이다. CHIV를 개발하는 장점은 원하는 HIV-1 외피 서열이 CAEV 외피 유전자 대신에 원칙적으로 치환되어 더 효능이 크고 특이적인 면역 반응을 일으킬 수 있다는 점이다.

CHIV에 대한 선행 기술은 SIV 및 HIV-1의 재조합 바이러스 키메라(SHIV)에 존재한다. SHIV의 사용은 숙주 범위, 세포변성(cytopathicity) 및 중화항제의 특이성이 외피 서열에 의해 결정된다는 것을 나타냈다[Luciw et al.,Proc. Natl. Acae. Sci.92:7490-7494(1995)]. SHIV의 개발은 또한 유전자가 렌티바이러스간에 상호교환할 수 있음을 보여주었다[Shibata et al.,J. Virol.65:3514-3520(1991)]. 따라서, 이러한 유전자를 상응하는 HIV-1 유전자로 치환하는 것은 CHIV의 HIV-1 항원성을 증가 및/또는 확대하면서 생존가능한 키메라 레트로바이러스를 만들 수 있다.

본 발명은 또한 CHIV 면역원 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 백신을 제공한다. 본원에서 개시된 바와 같이, CHIV 면역원을 가지고 개체를 예방접종하면 면역 반응을 일으킨다. CHIV 면역원을 사용하여 HIV-1에 대하여 예방접종하면, 예를 들면, 죽은 또는 약독화된 형태의 HIV-1 또는 HIV-1 단백질 항원의 사용에 있어서의 중요한 장점, 즉 CAEV가 인간 병원체로 알려지지 않았다는 장점을 제공한다.

본 발명의 백신은 감염의 가능성을 감소시킬 수 있는 면역반응의 유도를 목적으로 HIV-1로 감염되지 않은 개체에 투여할 수 있거나 또는 HIV-1의 면역병리에 대항하는 치료 반응의 제공을 목적으로 이미 HIV-1로 감염된 개체에 투여할 수 있다[참조; Cease and Berzofsky,Ann. Rev. Immunol.12: 923-989(1994)]. 따라서, 본 발명의 백신은 HIV-1 감염에 대한 개체의 저항성을 증가시키는 데 또는 HIV-1 감염된 개체에서 HIV-1에 기인한 병리의 심각도를 감소시키는 데 유용할 수 있다.

정의

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " CHIV 면역원" 은 CHIV 바이러스 입자를 의미하고, 이것은 살아있는, 약독화된, 또는 죽은 CHIV 또는 CHIV 바이러스를 위한 폴리뉴클레오티드 발현 작제물일 수 있다. CHIV 면역원은 생체내 또는 생체외에서 면역 반응을 자극할 수 있는 것을 특징으로 한다. CHIV 바이러스 입자는 키메라 바이러스 게놈을 포함하거나 또는 포함하지 않으며, 적어도 하나 이상의 CAEV 및 하나의 HIV-1 바이러스 단백질을 포함한다. CHIV 면역원은 인간에 투여된 경우에 HIV-1에 대해 교차 반응하는 면역 반응을 자극하는 것이 바람직하다. 미국 특허 제5,561,064호, 제5,703,055호, 제5,580,859호 및 제5,589,466호에 설명된 바와 같이, CHIV 레트로바이러스를 위한 발현 작제물을 개체내로 주사를 통해 도입하여 생체내에서 면역원성 발현 생성물을 발현할 수 있다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " 저항성 증가" 는 HIV-1 감염에 관련하여 사용되는 경우, CHIV 면역원에 의해 생성된 HIV-1에 대한 교차-반응성 면역 반응의 자극으로 인하여 개체내에서 바이러스 감염 또는 증식의 가능성이 감소됨을 의미한다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " 폴리뉴클레오티드" 는 DNA 및 RNA의 모든 형태, 즉 1본쇄, 2본쇄 또는 더 많은 쇄를 의미한다. 폴리뉴클레오티드는 화학적으로 합성될 수 있거나 또는 숙주 세포 또는 유기체로부터 분리될 수 있다. 특정 뉴클레오티드는 천연 발생한 잔기 및 합성 잔기 모두를 포함할 수 있다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " 발현 조절 단편" 은 재조합 CHIV 레트로바이러스의 전사 및 번역을 지시할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 이러한 단편은 프로모터, 인헨서(enhancer), 폴리 A 시그날, 스플라이스 공여체 및 수용체 부위, 번역개시부위 및 번역종결부위를 포함한다. 통상 전사 개시 및 종결을 위한 발현 조절 시그날은 레트로바이러스의 긴 종결 반복(LTR) 부위를 포함하며, CAEV 또는 HIV-1로부터 얻는 것이 바람직하다.

본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 " 표본" 은 본 발명의 진단 방법에 관하여 사용되는 경우에, 조직 시료 또는 유체 시료, 예를 들면 혈액(이것은 전체 혈액, 혈장 또는 혈청일 수 있다) 또는 요를 의미하며, 개체로부터 얻어서 CHIV 또는 HIV-1 감염에 대한 시험을 한다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " $TCID_{50}$ " 은 " 조직 배양 감염 용량 50%" , 즉, 배양된 세포 집단의 50%를 감염시키는데 요구되는 제제의 양을 의미한다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " 치료적 유효량" 은 치료를 받는 개체에서 면역 반응을 자극하는데 충분한 면역원의 양을 의미한다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 " 백신" 은 개체에 투여되어 면역 반응을 자극하는 면역원을 포함하는 조성물을 의미한다. 특히, 본 발명의 백신은 CHIV 면역원을 포함하며, 상기 면역원은 예를 들면, 인간에게 투여될 수 있다. 상기에서 HIV-1에 대한 교차-반응하는 CHIV에 대한 면역 반응이 자극된다. 따라서, CHIV 면역원은 HIV-1에 대한 면역 반응을 자극하기 위한 대리 면역원으로 사용된다.

키메라 CHIV 레트로바이러스의 제작

9.7 kb Co 클론은 CAEV의 유일한 감염성 DNA 클론으로 시판된다[문헌: Pyper et al.,J.Vir.58(2):665-670(1986)]. CAEV-Co의 핵산 서열은 진뱅크(GenBank) 수탁번호 M33677로서 입수할 수 있다[참조문헌; Saltarelli et al.,Virology179:347-364(1990); Knowles et al.,J.Virol.65:5744-5750(1991)]. 그러나, 원칙적으로 CAEV 또는 HIV-1의 임의의 변이체는 본 발명의 키메라를 위한 물질의 원료로 사용될 수 있다. 이러한 변이체는 함밍(Hamming) 거리 측정[Faulkner et al.,TIBS13:321-322(1988)]에 의해 결정된 공지된 CAEV 또는 HIV-1 서열에서 약 15% 이하의 변이가 바람직하다. 이러한 변이는 유전자 코드의 축퇴(degeneracy)에 기인하여 CAEV 또는 HIV-1의 분리된 균주에 대한 뉴클레오티드 수준에서 측정되지만, 유사한 단백질에 대한 뉴클레오티드 수준 코드에서 15% 이상의 변이가 있는 폴리뉴클레오티드를 합성할 수 있다. 따라서, 재조합 바이러스에서 상응하는 CAEV 또는 HIV-1 레트로바이러스의 기능을 수행할 수 있는 단백질을 암호화할 수 있고, 공지된 CAEV 또는 HIV-1 폴리뉴클레오티드로부터 약 15%이하의 변이인 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화될 수 있는 폴리뉴클레오티드를 또한 사용할 수 있다.

유사하게, 키메라의 HIV-1 성분은 임의의 HIV-1 균주로부터 분리될 수 있다. 특정한 구체예에서, HIV-1 외피 코딩 부분은 2 종류의 균주, 즉, SF_{162} (대식세포성) 또는 SF_{33} (T-세포주성) 중 하나에 의해 분리된다. 본원에서 설명된 것에서 변형된 외피 또는 다른 HIV-1 코딩 부분이 사용될 수 있으며, 대식세포 및 T-세포 모두의 감염을 매개할 수 있는 것을 포함한다. 변이체 HIV-1 유전자는 상술한 바와 같이 공지된 HIV-1 유전자로부터 15% 이하로 변이되었고, 또는 약 15% 이하 변이된 HIV-1 유전자에 의해 암호화될 수 있는 단백질을 암호화하고, 재조합 레트로바이러스에서 암호화된 HIV-1 단백질의 기능을 수행할 수 있다. 나아가, 이러한 변이 외피 단백질은 인간 T 세포, 인간 대식세포, 또는 모두의 감염을 매개할 수 있는 것이 바람직하다.

본원에서 설명된 키메라 CHIV 바이러스를 제조하는데 사용되는 기술은 폴리뉴클레오티드 조작 및 증식에 대한 표준 기술을 포함한다. 원칙적으로 임의의 기술은 키메라 폴리뉴클레오티드를 생성하는 데 유용할 수 있으며, 올리고뉴클레오티드 를 중복하고, 신장 및 연결, 연이은 PCR에서 결합할 수 있는 상보적 5'신장부분을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 각 출발 물질의 원하는 부분을 PCR하는 화학 합성법 및 원하는 단편을 분리하기 위해 필요한 경우 가교제(linker) 및 접착제(adapter)를 사용하여 연결하는 방법이 뒤따르는 더욱 통상적인 제한 효소 가수분해법을 포함한다. 또한, 바이러스 작제물의 연결되지 않은 상보적 부분을 숙주 세포내로 공이입(共移入)하면 숙주 세포 자체에서 완전한 복제성 바이러스를 발생시키는 것으로 발견되었다.

생성된 폴리뉴클레오티드 작제물은 표준 기술을 사용하여 증식시킬 수 있다. 예를 들면, 키메라 바이러스 게놈은 박테리아 벡터내로 삽입되어 박테리아 숙주 세포에서 증식될 수 있거나, 또는 바이러스는 포유류 숙주 세포에서 발현될 수 있고 생성된 바이러스주는 연속적으로 전달될 수 있거나, 또는 키메라 바이러스 게놈을 포함하는 DNA 작제물은 긴 PCR과 같은 기술을 사용하여 시험관내에서 증식될 수 있다. 바이러스는 또한 일본 원숭이와 같은 동물에서 증식할 수 있고 혈액 표본에서 회수할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 작제물은 키메라 레트로바이러스의 전체 구조 및 폴리뉴클레오티드의 서열의 양쪽 관점에서, 만들어진 작제물의 완전성을 유지하는 방식으로 증식된다. 따라서 폴리뉴클레오티드 작제물을 증식하는 바람직한 방식은 재조합에 결손이 있는 박테리아 숙주 균주에서 복제하는 박테리아 벡터, 예를 들면 플

라스미드내이고, 바람직하게는 recA이다. 이것은 키메라 레트로바이러스 작제물중 LTR 부분에서 발견되는 동방향 반복(direct repeat) 사이의 재조합을 억제한다. 만일 재조합이 recA 박테리아 숙주 균주에서 일어난다면, 나아가 공지된 재조합-결손 균주는 이러한 플라스미드 작제물을 증식하는데 사용될 수 있다.

원형 CAEV/HIV 키메라는 CAEV의 gag, pol, vif 및 LTR 기능을 보유하는 CAEV-Co의 9,7 kb 감염성 클론내로 HIV-1의 tat, vpu, 외피 및 rev 유전자를 분자 치환함으로써 제작된다. 도3A-C에서 개요된 치환 기법에 대한 이론은 종결 코돈으로 CAEV tat 유전자를 조기에 종결하면서 외피 및 rev 유전자에 대한 개시 부위 및 CAEV 외피 유전자의 제거에 있다. 약한 트랜스 활성의 CAEV tat 유전자를 종결시키는 결실 또는 종결 코돈은 생체내 또는 시험관내에서 CAEV 복제율에 영향을 주지않는다[Harmache et al.,J. Virol.69:5445-5454(1995)]. 이 선택은 대체로 기능적 복제를 위해 요구되는 CAEV vif 유전자의 활성을 보존하기 위한 필요에 기초가 되고[Harmache et al.,J. Virol.69:3247-3257(1995)], 또한 종결 부분과 tat 출발 부분 사이의 프레임 오버랩에서 8 bp를 갖는다.

상기 CHIV 작제물은 HIV-1에서 획득한 외피 및 rev 유전자에 따라 효과적으로 수행하며, 상기 양 유전자는 CAEV 복제에 있어서 필수적이다. CAEV 게놈이 HIV-1과 위치, 안정성 및 배좌가 유사한 안정한 스템 루프 구조를 포함하는 rev 반응 인자(RRE)를 가지고 있다는 관찰[Saltarelli et al.,Virol.179(1):347-364(1990)]에 의하여 CAEV 및 HIV-1 모두에서 rev가 유사한 역할을 한다는 사실을 뒷받침한다. 따라서 이 CHIV 작제물을 실험적으로 시험한다. 필요하다면, 더 복잡한 가공을 수행하여 CAEV rev 유전자를 키메라내로 삽입시킬 수 있다. 필수적이지 않은 nef 유전자는 그것의 위치 또한 3'HIV-1 LTR와 오버랩되며, 상기 CHIV 작제물에서 결실된다.

추가적 코딩 부분은 또한 CHIV 작제물내로 삽입될 수 있다. 예를 들면, 선택가능한 마커 또는 검출가능한 마커는 CHIV 작제물내에 포함되어 발현 세포를 선택하거나 또는 검출할 수 있다. 또한 유전자를 암호화하는 면역자극성 분자가 포함되어, 감염된 세포의 항원성을 증가시키고 따라서 강한 면역 반응을 자극할 수 있다.

나아가, 복제능이 있는 CHIV 작제물 및 바이러스주의 용도를 고려해보지만, 복제능이 있는 CHIV 작제물 및 바이러스주는 또한 본 발명의 범위내에 있다. 개체내로 주입되는 경우, 이러한 작제물은 감염을 일으키지 못한다. 복제능이 없는 CHIV 작제물은 상술된 바와 같이 제조될 수 있으나, 바이러스 증식을 위해 필요한 적어도 한 개의 기능성 코딩 부분이 부족하다. 예를 들면, 바이러스 작제물은 중요한 유전자에서 결실 또는 돌연변이를 가질 수 있고, 사용된 숙주 세포는 상실된 기능을 제공하여 복제능이 결핍된 바이러스주를 생산하게 된다. 예를 들면, CHIV 작제물은 pol유전자가 부족할 수 있으나, 이것의 기능은 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다. 따라서 숙주 세포는 숙주 세포에서 생성된 pol 단백질을 삽입한 감염성 바이러스 입자를 생산할 수 있으며, 이것은 바이러스 입자가 또다른 세포를 감염한 후에 결실된 RNA 레트로바이러스 게놈을 DNA로 역전사 시킬 수 있다. 일단 복제능이 결핍된 바이러스 게놈을 감염된 세포의 게놈 내로 통합시키고 발현시키면, 바이러스 항원은 감염된 세포에 의해 생산될 수 있으나, pol 단백질의 부족은 감염이 연속적으로 발생하지 않도록 할 것이다. 또한 키메라 폴리뉴클레오티드의 사용없이 숙주 세포에서 독립적으로 단백질의 코딩 서열을 발현시킴으로써 CAEV 및 HIV-1 단백질을 포함하는 키메라 레트로바이러스 입자를 만들 수 있다.

생성된 CHIV 작제물은 임의의 기술에 의해 포유류 숙주 세포내로 삽입시킬 수 있다. 사용될 수 있는 기술의 예는 칼슘 포스페이트 이입, 리포펙션, 인공 바이러스 외피내로 캡슐화, 전기영동, 스크래핑(scraping) 또는 문지르는 방법 및 볼리스트(bolistic) 효과와 같은 이입(transfection)을 포함한다. 바이러스 입자를 포함하는 작제물이 생성되면, 바이러스 감염은 적절한 바이러스 수용체를 발현하는 세포내에서 이용될 수 있다.

본 발명에 사용되는 포유류 숙주 세포는 삽입된 CHIV 작제물을 발현시킬 수 있는 세포 및 생산된 CHIV 바이러스 입자에 의하여 감염될 수 있는 세포를 말한다. 숙주 세포는 성립된 세포주 또는 일차 분리체일 수 있다. 예를 들면, CHIV 작제물은 공지된 기술에 의해 제조되어 1차 염소 활액막(GSM) 세포내로 또는 인간 횡문근육종 세포, 예를 들면 세포주 RD(ATCC #CCL-136) 또는 RD-5[Luciw et al.,Proc. Natl. Acad. Sci.92:7490-7494(1995)]내로 삽입될 수 있다. 나아가 이용할 수 있는 포유류 숙주 세포의 예는 공지된 기술에 의하여 1차 인간 대식세포 및 일본 원숭이 PBMC 및 대식세포 및 CD4+ 세포주 HUT78[Marchalonis et al.,Cell Immunol.77(1):161-75(1983); ATCC #TIB-161] 및 CEMX174[Sei et al,Cell Immunol.125(1):1-13(1990)]를 포함한다.

숙주 세포는 삽입된 작제물의 기능을 검출하기 위하여 분석될 수 있다. 수행될 수 있는 분석은 (a) gp120의 생성(gp120 항원 포착 ELISA에 의함) 및 CAEV gag 단백질 p28의 생성(폴리클로날 염소 혈청을 사용한 웨스턴 블롯에 의함)을 검출하는 면역검정법;(b) 프로바이러스 DNA 서열을 검출하는 GSM 또는 RD-5 게놈 DNA의 CAEV gag 및 HIV-1 외피 PCR ; 및 (C) 총 세포 RNA의 CAEV gag 및 HIV-1 외피 RT-PCR을 포함한다.

완전한 CHIV 작제물의 생존률은 예를 들면, GSM 세포 또는 인간 횡문근육종 주 RD-5[Luciw et al.,Proc. Natl. Acad. Sci.92:7490-7494(1995)]와 같은 적절한 숙주 세포로의 이입에 의해 시험된다. 상층액은 역전사효소(RT) 분석 및 CAEV-및 HIV-RT-RCP에 의해 검사된다. 생성된 키메라의 숙주-세포 범위는 인간 및 붉은털 일본 원숭이 PBMC 및 대식세포, 및 HUT78 및 CEMX174 세포주내로 접종하고 바이러스 복제에 대한 시험(RT-PCR 및 RT 분석)을 하여 분석할 수 있다. HIV-1 외피 및 CAEV gag 단백질의 생성은 gp120 항원 포착 ELISA 및 CAEV p28 웨스턴 블롯에 의하여 분석될 수 있다. 외피 유전자가 유도되는 HIV-1 균주의 향성(向性)에 기초하여 CHIV 키메라의 향성이 예측될 수 있다.

예를 들면, $CHIV_{SF33}$ 키메라는 HUT78 및 CEMX174주에서 복제가 예측되며, 이것은 T-세포성 HIV-1 균주의 발현을 지지한다. $CHIV_{SF162}$ 키메라는 인간, 일본 원숭이 및 GSM 세포 배양액에서 성장이 예측된다. 배양액에서 키메라 유전자의 발현은 CAEV gag 및 HIV-1 외피에 대하여 RT 분석 및 RT-PCR에 의해 평가된다. 게다가, RT-PCR 생성물의 서열 결정은 발현된 유전자의 동정을 확인하기 위하여 수행될 수 있다. 현미경 관찰에 의하여 융합 세포 형성 또는 세포변성에 대하여 배양액을 조사하였다. 융합 세포는 레트로바이러스 감염 생성을 특징으로 하는 거대한 다핵 세포이다. 세포변성은 융합 세포 형성 및 세포질 액포화 또는 세포 사멸에 의하여 결정될 수 있다. 감염과 싸우는 숙주 면역계가 없기 때문에 CHIV는 융합 세포를 형성하거나, 그렇지않으면 시험관내에서 의도된 목적 세포로 세포변성이 되는 것이 바람직하다. CHIV는 이러한 세포의 대부분에서 이러한 세포변성 효과를 만드는 것이 바람직하다.

바이러스 단백질 생성은 이입 실험에서처럼 면역학적 방법에 의해 검사되고, 필요하다면 방사능표지(예를 들면,^{35} S-메티오닌)된 배양액의 면역침전에 의해 검사된다.

단백질이 없는 경우에 프로바이러스 DNA 및 세포성 RNA가 검출된다면, 하나 이상의 유전자 기능을 비정상적으로 스플라이싱할 가능성은 노던 블로팅(Northern blotting)에 의하여 분석될 것이다. 키메라에서 우연히 활성화되는 잠재 스플라이스 부위는 부위 특이적 돌연변이 유발 또는 돌연변이원성 PCR과 같은 표준 기술에 의하여 제거될 수 있다. 강력한 공통 스플라이스 부위는 소정의 스플라이스 부위의 이용을 개선시킬 필요가 있는 경우에 유사한 기술에 의해 삽입될 수 있다. 별법으로서 내부 리보좀 침입 부위는 소정의 단백질의 번역을 직접 촉진하기 위하여 작제물내로 삽입할 수 있다.

단백질이 세포내에서 검출되지만 완숙한 바이러스 입자가 생성되지 않는다면, 조립(assembly)에 문제가 있을 수 있다. HIV-1 조립체에서, 신생 외피 분자는 미리스틸화된 기질 단백질(MA) 부위로 표적화되나, 유제(有蹄)류 렌티바이러스 조립의 메카니즘은 알려지지 않았다[Dorfma et al.,J. Virol.68(3):1689-1696(1994)]. 그러나, 미리스틸화의 부족으로 인한 부적합성은 또다른 바이러스로부터 미리스틸화된 막-결합 도메인을 제공함으로써 정정될 수 있다[Wills et al.,J.Virol.65(7):3804-3812(1991)].

결국, 통합된 키메라 DNA가 검출되지 않는다면, 박테리아 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(CAT)와 같은 리포터 유전자를 사용하여 CAEV-Co에서 tat 유전자의 기능을 평가할 수 있다[Saltarelli et al.,Virology197(1):35-44(1993)]. CAT 유전자는 CAEV-Co LTR 프로모터의 조절하에서 위치할 수 있으며, 숙주 세포내에서 발현에 대하여 CAEV tat 유전자가 있는 작제물 또는 CAEV tat 유전자가 없는 작제물을 평가할 수 있다. CAT는 숙주 세포내에서 발현되나 CHIV는 발현되지 않는다면, 이어서 추가적 CAEV 유전자를 필요한 CHIV 내로 통합시켜서 바이러스 복제를 가능하게 할 수 있다.

진단 접근법의 결과에 기초하여 도3A-C에 나타난 작제물을 개질한다. CAEV 및/또는 HIV-1로부터 추가적 코딩 부분을 키메라내로 포함시켜 더 나은 기능의 레트로바이러스를 얻을 수 있다. 키메라에 부정적 영향을 주는 코딩 부분은 결실될 수 있다.

결과로서 키메라 레트로바이러스는 적어도 HIV-1 균주의 외피 유전자를 포함하고, 영장류의 재조합 바이러스의 생물학적 영향을 약화시키는 충분한 CAEV 서열을 포함하여 CHIV을 비병원성으로 만들고, CAEV 또는 HIV-1로부터 유래된 바이러스 게놈의 나머지를 갖고 있으며, 숙주 세포내에 시험관내 복제가 가능하고, HIV-1에 대한 면역 반응을 야기한다.

CHIV 바이러스 입자를 포함하는 바이러스주는 표준 기술을 사용하여 발현 숙주 세포에서 만들어질 수 있다. 예들 들면, CHIV를 발현하는 ^{3}H-유리딘으로 표지된 숙주 세포 배양액에서 배양 상층액을 슈크로스 밀도 구배 원심 분리시킬 수 있다. 구배로부터 분획하여 포집하고 역전사효소 활성 및 방사능활성을 분석하여 레트로바이러스 입자의 위치를 결정할 수 있다. 더욱 구체적으로, CHIV를 발현하는 배양액은 130,000×g에서 원심분리하여 바이러스 입자를 펠렛으로 만들 수 있다. 생성된 펠렛을 세척하고 필요하면 재응집시켜 적절한 용액으로 재현탁시킨다.

바이러스 입자를 영장류내로 삽입시킨 경우, 숙주 세포 항원에 비특이적 면역 반응을 막기 위하여 바이러스는 영장류에서 유래된 숙주 세포로 이동하여야 한다. 예를 들면, 바이러스 입자는 인간에게 삽입되는 경우, 바이러스 입자에 우연히 포장된 비인간 숙주 세포 항원에 대한 면역 반응을 피하기 위하여 바이러스가 인간 PBMC에서 증식되는 것이 바람직하다.

인간에 사용하기 이전에 CHIV를 평가하는데 동물 모델을 사용할 수 있다. 생체내 감염은 동물, 예를 들면 일본 원숭이에서 수행되어, CHIV가 병원성인지, HIV-1 균주-특이성 면역 반응이 HIV-1 외피에서 진행되는지 측정할 수 있다. 동물은 상술된 바와 같이 생산된 바이러스 접종물과 함께 수혈받을 수 있다. 혈액을 일정 간격으로 채취하여 감염이 일어났는지, 동물의 혈액 세포수에 발병성 변화가 일어났는지를 측정할 수 있다. CHIV 면역원은 CHIV 바이러스 게놈을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 경우, 폴리뉴클레오티드 백신을 제조하는 당업계에 공지된 기술에 의하여 폴리뉴클레오티드를 제조할 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,561,064호, 제5,703,055호, 제5,580,859호, 제5,589,466호에 설명된 방법을 사용하여 포유류에 투여하기에 적절한 폴리뉴클레오티드를 제조하여 면역 반응을 생성할 수 있다.

본 발명의 백신은 CHIV 면역원 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 것이 바람직하다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 생리학적으로 완충된 식염수 또는 기타 용매와 같은 용액, 또는 글리콜, 글리세롤, 오일, 예를 들면, 올리브 오일과 같은 담체 또는 주입가능한 유기 에스테르를 포함한다. 필요하다면, 본 발명의 백신은 보조제인 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 수산화물, 프로인트(Freund's) 완전 또는 불완전 보조제, QS21(미국 특허 제5,889,176호, Rovinski et al.에서 설명) 또는 기타 특허 보조제와 같은 보조제가 당업계에 공지되었고 시판되고 있다[Ribi Immunochem Research, Inc,, Jamilton MT]. 보조제의 추가는 면역 반응을 자극하기에 필요한 CHIV 면역원의 양을 일반적으로 감소시킨다.

약학적으로 허용 가능한 담체는 또한 CHIV 면역원을 안정화시키거나 그것의 흡수를 증가시키는 것과 같은 작용을 하는 생리학적으로 허용 가능한 화합물을 포함할 수 있다. 생리학적으로 허용 가능한 화합물은 예를 들면, 포도당, 자당 또는 덱스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산 또는 글루타티온과 같은 항산화제, 킬레이트제, 저분자량 단백질, 또는 기타 안정화제 또는 부형제를 포함한다. 당업자는 생리학적으로 허용 가능한 화합물을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 화합물은 백신의 투여 경로에 따라 또한 CHIV 면역원의 특히 생리화학적 특징에 의존한다는 것을 알 수 있다.

CHIV 면역원은 그 자체로 면역생성이 가능하고, 생체내 면역원 분자를 생성할 수 있거나 또는 소 혈청 알부민과 같은 담체 분자 또는 CHIV 면역원-담체 복합체가 면역 반응을 자극할 수 있는 불활성 담체에 부착될 수 있다[참조; Harlow and Lane,Antibodies: A laboratory manual,Cole Spring harbor laboratory Press, 1988]. 예를 들면, 백신을 CHIV 바이러스 입자를 포함하는 경우, 바이러스는 면역원이고 백신화된 개체에서 면역 반응을 자극할 수 있다.

또한 개체를 백신화하여 면역 반응을 자극하는 방법이 공지되어 있다[Harlow,supra,1988]. 면역원은 예들 들면, 정맥내, 표피내, 피하내, 경구로, 항문으로, 질내로, 비강내, 경피로 투여될 수 있다. 백신은 목적된 투여 경로를 고려하여 제형화된다. 게다가, 하나 이상의 추가항원자극 면역제를 투여하는 것이 이로울 수 있다. 추가항원자극 면역제를 투여할 필요성 및 이러한 추가항원자극 면역제의 투여시기를, 예를 들면, 백신화된 개체의 혈청에 항-HIV-1 항체의 존재 및 역가를 실험적으로 결정할 수 있다.

개체에 CHIV 면역원의 투여하는 것이 본원에서 참고로 인용되지만, HIV-1에 대한 면역 반응은 생체내 또는 생체외에서 자극될 수 있는 것으로 인지된다. 예를 들면, 치료받는 개체가 AIDS를 갖거나 또는 HIV-1로 감염된 경우, HIV-1에 대한 생체외 면역 반응을 자극하는 것이 바람직할 수 있다. 생체외 자극에 있어서 림프구 집단을 증폭시킬 수 있다. 이러한 자극되고 증폭된 면역 세포는 개체내로 주입되고 따라서 치료적 장점을 제공하게 된다. 이러한 치료는 일시적일 수 있고 AIDS로 고통받는 개체에게 인생의 질을 증대시킬 수 있다.

치료적 유효량를 구성하는 CHIV 면역원의 양은 예를 들면 면역 반응의 자극이 생체내 또는 생체외인가에 따라, 투여가 제1 투여인지 또는 추가항원자극 투여인지에 따라, 보조제가 면역원과 함께 투여되는지 및 투여시기, 투여 경로 및 환자의 체중에 따라 달라진다. 면역원의 치료적 유효량을 결정하는 방법은 일상적이며 당업계에 공지되어 있다[참조: Powell and Newman,Vaccine Design: The subunit and adjuvant approach(Plenum Publ. Corp.,: 1994)].

예를 들면, CHIV 바이러스 입자를 원숭이에 투여하는 경우, 입자성 CHIV 면역원의 치료적 유효량을 약 0.1 내지 약 1×10^{8} $TCID_{50}$, 대체로 약 7×10^{2} 내지 약 7×10^{4} $TCID_{50}$ 의 범위일 수 있다. CHIV 바이러스 입자를 인간에게 투여하는 경우, 입자성 CHIV 면역원의 치료적 유효량은 약 0.1 내지 약 1×10^{8} $TCID_{50}$, 대체로 약 5×10^{3} 내지 약 5×10^{5} $TCID_{50}$ 의 범위일 수 있다. 면역원이 단일의 완전한 CHIV 레트로바이러스 게놈을 포함하는 폴리뉴클레오티드인 경우, 치료적 유효량은 약 0.05 ㎍/kg 내지 약 50 ㎎/kg, 대체로 약 0.005 내지 약 5 ㎎/kg의 범위일 수 있다.

표본은 CHIV 면역원을 주입받은 개체로부터 채취할 수 있고, 개체가 면역원에 면역 반응을 생산했는지, 예를 들면 개체가 HIV-1에 항원을 생산했는지를 결정하는 시험을 할 수 있다. 표본에 나타나는 항원-항체 상호반응을 검출하는 방법은 당업계에 공지되었고, 예를 들면 검출가능하게 표지된 항원의 사용 또는 검출가능하게 표지된 2차 항체를 포함한다. 상기 2차 항체는 특정 포유류 종으로부터 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE와 같은 항체의 특정 부류에 선택적으로 결합하는 항체이다[참조: Green and David, 미국 특허 제4,376,110호, 1983년 8월에 발행, 본원에 참고로 인용]. 예를 들면, 표본이 인간 개체에서 채취한 혈액 혈청 또는 혈액 혈장이라면, 2차 항체는 염소 항-인간 IgG일 수 있다.이러한 2차 항체는 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있거나 또는 시판되는 원료로부터 구입할 수 있다. 검출가능하게 표지된 CHIV 항원 또는 항체에 대한 방법은 당업계에 공지되었다.

다음의 실시예는 본 발명을 예시하는 것이며 제한하려는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

도1은 키메라 CHIV 바이러스 게놈의 도식적 설명으로서, 사용된 HIV-1 바이러스 게놈 및 CAEV의 단편을 나타낸다.

도2A는 CHIV내로 삽입하기 위하여 CAEV-Co 바이러스 게놈의 단편을 제조하는데 사용되는 구조를 도시하고 있다.

도2B는 도2A에서 생성된 연결된 단편 및 연결되지 않은 단편을 삽입한 후에 CAEV-Co 발현 세포의 배양 상층액에서 CAEV-Co 서열의 RT-PCR에 의한 검출을 보여준다.

도3A는 CHIV내로 삽입하기 위하여 HIV-1 및 CAEV 게놈의 단편을 제조하는 상세한 기법을 보여준다.

도3B는 완전한 CHIV 바이러스 작제물을 생성하기 위하여 도3A에 나타낸 단편과 함께 CAEV-Co의 3'LTR 부분을 삽입하는 구체적인 기법을 보여준다.

도3C는 절두형(truncated) CAEV tat 단백질의 코딩 부분과 함께 도3B에 나타낸 CHIV에서 CAEV-Co와 HIV-1 단편간에 접합부의 뉴클레오티드 서열을 상세하게 보여준다. 5'CAEV-Co/HIVp162/3'SX 접합부(서열번호:1), 절두형 CAEV tat 단백질 서열(서열번호:2) 및 3'CAEV-Co/HIV p162/3'SX 접합부(서열번호:3)이 나타난다.

실시예

실시예 1

키메라 CAEV/HIV-1 레트로바이러스의 생산

HIV-1의 외피 기능을 감염성 클론 CAEV-Co내로 치환하는 것을 기초로 실험을 고안하였다. 균주 SF_{162} [Cheng-Mayer.,J.Virol.64(8):4012-4020(1990)] 및 SF_{33} [York-Higgins et al.,J.Virol.64(8):4012-4020(1990)]에서 유래된 HIV-1 외피 기능을 CAEV-Co내로 치환하기 위한 자세한 개요는 도 3A-C에 제시되어 있다. CAEV/HIV(CHIV) 작제물을 만들기 위하여, 발현에 필요한 tat/env/rev 유전자의 부분을 결실시킴으로써 CAEV의 5'9.4 kb HindIII 단편을 개질하며, 이어서 HIV-1 tat/vpu/env/rev 유전자로 치환한다. 이러한 개질은 도3A에 단계 1-5로 보여준다.

9.4 kb 5' 및 0.4 kb 3'CAEV-Co 단편을 포함하는 pUC18 및 pGem2 벡터 [Pyper et al.,J.Virol.58(2):665-670(1986)]를 각각 Dr.J.Clements(존스 홉킨스 대학)로부터 입수하여 rec A-박테리아 숙주 DH5α 내로 형질전환시킨다. 표준 SDS-NaOH 용균, 박테리아 DNA 및 단편을 제거하기 위한 고농도 염 침전 및 이소프로필 알코올 침전을 사용하여 선택된 클론을 최대로 제조한다. 재용해된 플라스미드 DNA의 RNase 및 프로테인아제 K 처리를 한 후 페놀 클로로포름 추출, 에탄올 침전 및 TE 완충액으로 재현탁을 한다. 양쪽 플라스미드를 제한효소로 처리하고 부분적 서열 결정을 하여 동정한다.

작제물 1로서 도3A에 나타난 pUC18에 5'CAEV-Co 9.4 kb 삽입 단편은 5745 및 8097에 유일한 Spl 1 부분을 갖는다. Spl 1-Spl 1 조각은 CAEV tat 유전자의 대부분 및 개시 부위 및 외피 및 rev 유전자에 대한 코딩 부분을 보유한다. 상기 조각은 Spl 1로 작제물 1을 가수분해시키고 절단 플라스미드를 재연결시킴으로써 결실되고, 작제물 2로서 도3A에서 지시된 단일한 Spl 1 삽입 부위 5'CAEV 플라스미드를 형성할 수 있다. 3'말단 외피 및 rev 유전자(외피의 Tm 부분을 포함)의 절단되지 않은 부분은 번역 개시 코돈이 없으므로 번역되지 못한다. 또한, HIV-1 서열을 치환하면서 CAEV tat 유전자가 미리 종결된다.

완전한 HIV-1 tat, vpu, 외피 및 rev 유전자를 각각 함유하는 2개의 다른 HIV-1 카세트 삽입 단편이 각각 SF_{33} [York-Higgins et al.,J.Virol.64(8):4012-4020(1990)] 외피 유전자 및 SF_{162} [Cheng-Mayer et al.,J.Virol.74(9):4390-4398(1990)] 외피 유전자를 포함하는 플라스미드 작제물 p33/3'SX 및 p162/3'SX에서 도출된다[문헌; Luciw. et al.,Proc Natl. Acae. Sci.92:7490-7494(1995)]. 상기의 제작은 도3A의 작제물 3에 도식적으로 나타난다. 이러한 플라스미드는 HIV-1 tat/vpu/env/rev 삽입 단편에 인접하는 5'Sph 1 및 3'Xho 1 부위를 가지고 제작되었다. 이 Sph 1-Xho 1 단편은 절제되고, HIV-1 작제물에 존재하지 않는 양 끝이 Spl 1인 특정 말단 접착제 서열을 연결한다. DNA 접합부 서열은 도3C에서 설명된다.

5'CAEV-HIV 작제물을 제작하는 마지막 단계에서, Spl 1 말단의 HIV-1 삽입 단편(4)을 Spl 1 절단된 삽입 벡터(2) 내로 연결한다. 이 조작의 효능은 먼저 송아지 알카리성 포스파타아제(CIP)로 삽입 벡터(2)의 5'돌출된 포스페이트기를 제거하여 벡터의 자가폐쇄를 확실히 방지할 수 있다.

도3B에서 도시된 바와 같이, 완전한 CAEV-HIV 클론은 3'CAEV LTR을 포함하는 0.4 kb CAEV 단편(6)의 HindIII 단편과 최종 5'작제물(5)에서 HindIII 단편을 연결함으로써 조립이 된다. 별법으로서, 2개의 단편은 함께 GSM 세포내로 삽입될 수 있으며, 2개의 단편은 자가 연결될 수 있다. 이 연결의 최종 결과는 CAEV-HIV'CHIV' 바이러스 작제물(7)이다.

5'CAEV/HIV 와 3'HIV/CAEV 접합부의 Spl 1 DNA 접착제는 도3C에서 자세히 제시된다. 5'CAEV-HIV 접합부는 접착제 부분에 CAEV tat '프레임내' 종결 코돈(TGA)의 고안을 필요로 하는 CAEV vif 및 tat 유전자(5688-5693)의 프레임 중복으로부터 8 bp를 보여준다. 절두형 CAEV tat 유전자의 DNA 및 21 아미노산 서열은 개시 부분부터 종결 코돈까지 다음에서 직접 보여준다. p162/3'SX 플라스미드(5814)에서 Spl 1 제한효소 부위는 HIV-1 tat 개시 부분을 지나 HIV-1 162의 서열이 연속된다. 또한 CAEV 플라스미드 또는 HIV-1 삽입 단편(아래에 설명된 바와 같이 Not 1 부위와 함께 사용)내에 존재하지 않는 유일한 Cla 1 부위(ATCGAT)는 5'Spl 1 접착제내로 설계된다.

또한, 3'HIV-CAEV 접합부 DNA 서열은 HIV-1 Xho 1 부위 및 접착제/CAEV Spl 1 부위, 및 HIV-1 외피 유전자 코돈 부위(8801)과 함께 도3C에서 보여준다. 또한 CAEV 클론 및 HIV-1 삽입 단편이 없는 유일한 Not 1 부위(GCGGCCGC)는 3'Xho 1-Spl 1 접착제내로 포함된다. Not 1 부위는 5'접착제의 Cla 1 부위와 함께 5'Cla 1-3'Not 1 방향의 특정 방식으로 이 HIV-1 DNA 카세트를 치환시킨다.

도3A-C에 개요된 치환 계획에 대한 합리적 설명은 종결 코돈으로 CAEV tat 유전자를 미리 종결하는 동안 외피 및 rev 유전자에 대한 CAEV 외피 유전자 및 개시 부위를 제거하는 것이다. 약한 트랜스활성 CAEV tat 유전자의 결실 또는 종결 코돈의 종료는 생체내 또는 시험관내에서 CAEV 복제율에 영향을 미치지 않는다[Harmache et al.,J.Virol. 69:5445-5454(1995)]. 이러한 선택은 기능성 복제에 필요하고 이것의 종결 부위와 tat 개시 부위간에 프레임 중복에서 8 bp를 보유한 CAEV vif 유전자의 활성을 보존할 필요성에 기초하고 있었다[Harmache et al.,J.Virol. 69:3247-3257(1995)].

이 CHIV 작제물은 HIV-1에 의하여 제공되는 외피 및 rev 유전자에 따라, 효과적으로 기능한다. 상기의 양 유전자가 필수적이다. CAEV 게놈이 HIV-1과 위치, 안정성 및 배좌가 유사한 안정한 스템 루프 구조를 포함하는 rev 반응 인자(RRE)를 보유한다는 관찰[Saltarelli et al.,Virol.179(1):347-364(1990)]에 의하여 양 CAEV 및 HIV-1에서 rev가 유사한 역할을 함을 지지한다. 따라서 이 CHIV 작제물은 실험적으로 시험된다. 필요하다면, 더욱 복잡한 공학 기술이 CAEV rev 유전자를 키메라내로 통합시키는데 실행될 수 있다. 위치가 3'HIV-1 LTR에 중복되고 필수적이지 않은 HIV-1 nef 유전자는 CHIV 작제물내에서 결실된다.

실시예 II

숙주 세포내에서 재조합 레트로바이러스의 발현

완전한 CHIV 작제물의 생존률를 GSM 세포 또는 인간 횡문근육종주 RD-5내로 이입함으로써 시험한다[Luciw et al., Proc. Natl. Acad. Sci.92:7490-7494(1995)]. CAEV gag 및 HIV-1 외피 RT-PCR 및 RT 분석에 의하여 이입된 배양 상층액 및 모의 이입된 배양 상층액을 바이러스 생성에 대하여 시험하였다. 이입된 세포의 단계별 분석을 수행하여 작제물의 기능을 다음과 같이 검출한다: (a) gp120의 생성(gp120 항원 포착 ELISA에 의함) 및 CAEV gag 단백질 p28의 생성(폴리크론 염소 혈청을 사용한 웨스턴 블롯에 의함)을 검출하는 면역검정법;(b) 프로바이러스 DNA 서열을 검출하는 GSM의 CAEV gag 및 HIV-1 외피 PCR 또는 RD-5 게놈 DNA; 및 (C) 총 세포 RNA의 CAEV gag 및 HIV-1 외피 RT-PCR을 포함한다.

도2A-B는 pUC18내에 CAEV-Co 게놈, 9.4 kb 5'단편 및 pGem2내에 0.4 kb 3'단편을 포함하는 2개의 CAEV 단편은 GSM 세포내로 이입된 경우 살아있는 바이러스를 생산할 것임을 보여준다. 도2A에 나타난 바와 같이, GSM 세포는 연결되지 않은 5'단편 및 3'단편(1) 또는 송아지 알칼리성 포스페타아제로 처리되지 않은 연결된 DNA(2) 또는 송아지 알칼리성 포스페타아제로 처리된 연결된 DNA(3)로 리포펙타민(Lipofectamine) 이입이 되었다. 모든 3가지 양태는 배양 상층액의 CAEV gag RT-PCR에 의하여 측정되었듯이 바이러스를 생산하였다(도2B). 따라서 키메라의 5' 및 3' 단편으로 GSM 세포를 이입하는 경우 미리 연결하는 것이 필요하지 않을 것이다. 모의 이입된 GSM 배양액, 레인(4), (5) 및 (6)은 PCR 음성이었다.

방법:

CAEV-Co 9.4 kb(5'클론) 및 0.4 kb(3'클론) 플라스미드를 HindIII를 가지고 따로 가수분해시키고 단편을 겔 정제시켜 예비량을 얻었다. 더 작은 단편을 포스페타아제의 처리없이 또한 처리하여 단편을 연결시키거나 또는 연결없이 이입시켰다. GSM 세포내로의 이입은 리포펙타민(BRL)을 사용하여 수행되고 제작기의 조건을 따른다. 12시간후에 옵티멤/리포펙타민/DNA 시약에서, GSM 배양액을 DMEM으로 여러법 세척하고, 37℃, 5% CO_2에서 5% 소의 태아 혈청을 포함하는 DMEM의 표준 조직 배양 조건으로 복귀시켰다.

이입 후 6일째 상층액 분취량을 트리아졸(BRL)로 추출하고, CAEV gag 내포된 RT-PCR를 수행하여 173 bp 서열로 증폭시켰다. 포스페타아제를 처리하거나 연결하든간에, 양 단편을 주입받은 이입된 세포는 추출된 상층액에서 증폭된 173 bp 단편을 생산하였다.

CHIV 작제물을 GSM 또는 RD-5 세포내로 이입은 유사하게 수행되고, 배양 상층액은 재조합 키메라 바이러스의 생산을 위하여 분석된다.

실시예 III

CHIV의 숙주 범위 결정

살아있는 키메라의 숙주 세포 범위는 Luciw et al.[Luciw et al.,Proc Natl. Acad. Sci.92:7490-7494(1995)]에 의하여 설명하는 바와 같이 다음의 세포 배양액(인간 및 일본 원숭이 PBMC 및 대식세포, GSM 세포, 및 CD4+세포주 HUT78 및 CEMX174)을 상술한 바와 같은 이입된 세포에 의해 또는 그 세포로부터 이어진 계대에 의해 생산된(필요하다면 농축될 수 있는) CHIV 바이러스주로 접종하는 방법에 의하여 결정된다. 바이러스주의 연속된 희석을 사용하여 배양액을 접종할 수 있고, 통상적으로 사용된 바이러스의 양은 약 0.1 내지 약 1×10^6 $TCID_{50}$ 의 범위일 수 있다. 배양액에서 키메라 유전자의 발현은 RT 분석 및 CAEV gag 및 HIV-1 외피 RT-PCR에 의하여 평가된다. 게다가, RT-PCR 생성물을 서열결정하여 발현된 유전자의 동정하였다. 바이러스 단백질 생산은 이입 실험에서와 같은 면역 방법에 의하여 검사되고, 필요하다면 예를 들면^{35} S-메티오닌과 같은 방사능 표지된 배양 상층액 또는 세포용해물의 면역 침전에 의하여 검사된다. 현미경 관찰에 의하여 융합 세포 형성 또는 세포변성에 대하여 배양액을 조사한다.

일본 원숭이 PBMC에서 CHIV의 시험관내 증식:

2마리의 어린 일본 원숭이에서 채취한 10ml 혈액으로 PBMC를 제조하고, 6-웰 마이크로티터 플레이트(Falcon)에 RPMI에서 3×10^6 세포/웰, 10% 소의 태아 혈청 및 10 μg/ml PHA를 도포한다. 24시간 후에 0.5 ml 바이러스 접종물 또는 배지를 웰마다 첨가한다. 배양액을 4시간마다 회수하고 세포와 상층액을 분리하고, gag 내포된(nested) RT-PCR용 트리졸(Trizol)로 추출하였다.

인간 PBMC에서 CHIV의 시험관내 증식:

PBMC는 CAEV- 및 HIV-1 음성 인간 공여체로부터 피콜(Ficoll) 밀도 원심분리기에 의하여 제조된다. PBMC는 24-웰 마이크로티터 플레이트(Falcon 3047)에 RPMI의 0.8×10^6 세포/웰, 10% 인간 AB 혈청 및 10 μg/ml PHA를 첨가한다. 24시간 후에 200 μℓ 바이러스 접종물을 첨가한다. 추가적 4일 후에 배양액을 회수하고 세포 및 상층액을 원심분리기에 의하여 분리하였다. 세포를 ×3 PBS, pH 7.4에서 세척하였다. 상술된 바와 같이 CAEV gag 내포된 프라이머를 사용하여 게놈 DNA, 세포성 RNA 및 상층액 RNA 추출 및 PCR과 RT-PCR을 수행한다.

바이러스 계대에 의하여 생성되는 역전사효소 활성의 검출:

PCR(-) 공여체로부터 PHA 자극받은 인간 PBMC를 24개의 웰 마이크로티터 플레이트에 도포하고 CHIV 바이러스 접종물(10^5 $TCID_{50}$ /웰)로 접종한다. 동시에, CHIV 바이러스 접종물의 세포가 없는 분취물을 CO_2 항온기에 넣어둔다. 0, 2일 및 6일에 배양 상층액의 분취물을 수집하고, 문헌[Cheng-Mayer et al.,J. Virol.64(9):4390-4398(1990)]에서 설명된대로 RT 분석을 수행한다. 간단하게, 15 μℓ의세포가 없는 상층액을 복제된 96개의 웰 플레이트내로 분취하고, 50 μℓ ^{32}P-TTP 및 50 mM Tris, pH 7.8, 75 mM KCl, 2 mM DTT, 5 mM $MgCl_2$ 및 5 μg/ml 폴리-A 주형, 6.2μg/ml 올리고 dT 12-18 프라이머, 0.05% NP40, 0.5 mM EGTA 및 10 μCi/ml ^{32}P를 포함하는 칵테일로 혼합한다. 플레이트는 1.5 내지 2시간 동안 37℃에 습기있는 방에서 항온처리한 후, 각 웰에서 취한 10 μℓ를 CD81 필터 종이 위에 점찍고 30분동안 공기로 건조시킨다. 필터를 1×SSC로 5번 세척하고, 에탄올로 1번 세척한다. 방사능 삽입을 포스포 이미저(Phosphor Imager ™)를 사용하여 정량적으로 측정한다.

실시예 IV

CHIV 바이러스주의 제조

^{3}H-유리딘 표지된 CHIV를 생성하는 숙주 세포로부터 배양 상층액을 슈크로스 밀도 구배 원심분리시킨다. 구배로부터 분획을 수집하고 방사능 및 역전사효소 활성을 분석하여 레트로바이러스 입자의 위치를 측정한다. 별법으로 배양액을 표지화하지 않을 수 있고 면역학적 방법을 사용하여 바이러스 단백질을 포함하는 분획을 동정할 수 있다.

실시예 V

CHIV 감염에 대한 동물 모델

CHIV가 병원성인지 또한 HIV-1 균주 특이적 면역 반응이 CHIV 감염에서 발전되는지를 결정하기 위해 일본 원숭이의 생체내 감염을 수행한다. 바이러스가 감염시키는 세포 유형의 세포 수가 급강하는 것에 의하여 병원성을 측정한다. 병원성은 바이러스 혈증의 수준이 상승함으로써 증명될 수 있고, 바이러스 혈증은 쿰브스(Coomb's) 양성 용혈성 빈혈 또는 혈소판감소증을 야기할 수 있다. 또한 병원성은 체중 감소 또는 말초 결절의 확장과 같은 임상적 신호에 의하여 나타날 수 있다. 이러한 병원성을 나타내는 CHIV에서 상응하는 HIV-1 서열에 대한 추가적 CAEV 서열을 치환함으로써 재가공될 수 있다.

방법:

건강한 성숙한 일본 원숭이에게 대퇴 정맥을 통해 약 7×10^2 내지 약 7×10^4 $TCID_{50}$, 바람직하게는 약 7×10^3 $TCID_{50}$ 을 함유하는 10 ml CHIV 바이러스 접종물을 수혈한다. PBMC 분리 및 RT-PCR을 위하여 일본 원숭이로부터 약 4주 간격으로 혈액을 채취한다. 세포성 RNA의 gag 및 외피 내포된 RT-PCR를 상술한 바와 같이 수행한다.

실시예 VI

개체를 예방접족하는 CHIV 백신의 사용

이 실시예는 면역 반응을 자극하기 위하여 개체에 CHIV 백신을 투여하는 방법을 설명한다.

CHIV 바이러스는 상술된 숙주 세포의 접종에 의하여 제조된다. 세포 상층액을 채취하여, 4℃, 150,000×g에서 원심분리에 의하여 CHIV 비리온을 펠렛으로 만들어, 희석제로 50% 글리세롤을 포함한 약 2×10^8 pfu/ml의 살균 현탁액을 얻는다[참조: Graham et al.,J.Infect. Dis.166:244-252(1992)]. 살아있는 바이러스의 수용체는 분지된 살균 바늘을 사용하여 50 CHIV 현탁액으로 피부의 단일 부위에 피부내로 예방접종한다. 또한 예방접종은 죽은 CHIV 제제 또는 약독된 CHIV 제제 또는 기타 CHIV 면역원, 예를 들면 CHIV 바이러스 게놈을 포함하는 DNA 작제물을 사용하여 수행될 수 있다. 항균 투명 붕대를 예방접종된 부위에 도포하고 이어서 딱지가 형성되면 제거한다.

CHIV 면역원의 투여 후 약 14, 28 및 54일에 혈액 표본을 채취하고, 항체 역가(체액 반응) 또는 T 헬퍼 또는 세포독성 T 세포 면역 반응(세포 반응)을 측정함으로써 평가한다. 채액 반응 및 세포 반응을 조사하는 방법은 당업계에 공지되었다[참조: Egan et al.,J.Intect. Dis.171:1623-1627(1995); Harlow and Lane,suprt,1988]. 필요하다면 2차(추가면역) 면역을 최초 예방접종 후 약 56일째에 투여한다. 채액 반응 및 세포 반응의 추가적 평가는 최초 예방접종 후 약 70, 90, 160, 180, 270 및 355일째에 이루어진다. 필요하다면, 3차(추가면역) 면역을 약 365일째에 투여하고 또는 필요에 따라 이어서 투여한다. 개체에서 HIV-1 외피 및 CAEV gag 단백질의 생성은 gp120 항원 포착 ELISA 및 CAEV p28 웨스턴 블롯(Western blot)에 의한 추가면역 표본으로부터 분석될 수 있다.

실시예 VII

CHIV으로 접종된 인간에서 중화항체의 검출

이 실시예는 CHIV 감염된 개체가 CHIV 항원에 면역 반응의 생성을 보여주는 데 사용되는 방법을 설명한다.

혈액 표본 및 시약:

인간 및 염소 혈액 표본을 채취하고 혈청 성분을 면역 시험을 위하여 사용한다. 혈청 항체의 수준을 측정하는 ELISA 및 웨스턴 블롯 분석에 사용되는 항원은 생 CHIV 및 CAEV, 인트라셀(영국 세프레쓰)에서 구입한 재조합 HIV-1 gp120 및 p24를 포함한다.

CHIV 바이러스는 상술한 바와 같이 GSM 또는 RD-5 세포와 같은 발현 숙주 세포 배양액에서 생성된다. CHIV 감염된 배양액의 배지를 채취하고 600×g에서 원심분리하여 정화한다. 생 CHIV 제제의 분획물을 -70℃에서 냉동저장할 수 있다. 생 CHIV 제제를 정제된 CHIV를 분리하는데 사용하거나 또는 정제된 단백질을 제조하는 데 사용될 수 있다.

HIV-1 ELISA 및 웨스턴 블롯 분석:

보증 HIV-1 및 웨스턴 블롯 진단 키트를 오래곤 텍니카(영국 캠브리지)로부터 구입하고 공급자에 의해 지시된대로 분석을 실행한다.

각각 재조합 HIV-1 항원, gp120 및 p24, 및 HRP-접합된 토끼 항-염소 및 염소 항-인간 2차 항체(자임드 레보러토리 인크.)를 사용하여 전술한 바와 같이 ELISA 및 웨스턴 블롯 분석을 수행한다[Douvas and Takehana,AIDS Res. Hum. Retrovir.10:253-262(1994); Crow et al.,Cell. Immunol.121:99-112(1989)].

HIV-1 바이러스 중화 분석:

감염에 대한 표적으로서 1×10^6 세포/ml 농도의 성장 배지에서 유지되는 PHA-활성된 정상 공여체 PBMC를 사용하여 48개의 웰 조직 배양액 플레이트에서 바이러스 중화 분석을 수행하였다. HIVIG™ 의 다양한 희석, 열활성(56℃, 30분)된 혈청 또는 정제된 IgG를 37℃, 30분동안 10 또는 50 $TCID_{50}$ 바이러스와 함께 항온처리한다.

HIVIG™ 에 대한 음성 대조구 및 혈청에 대한 음성 대조구는 HIV-1에 의하여 감염되지 않고, 전신 류마티스 질병에 걸리지 않은 개체에서 채취된 열불활성된 혈청 및 IVIG™ 를 각각 포함한다. HIVIG™ 는 HIV-1 감염의 초기 단계에서 9개의 혈청반응 양성의 공여체로부터 혈청 푸울(pool)에서 제조된 중성 IgG 제제이고, IVIG ™ 는 정상 공여체의 IgG이고, 노스 아메리칸 바이오로지칼스 인크.(플로리다 마이애미)에서 입수한다.

별법으로, HIV-1 중화항체 및 대조 항체의 다른 원천이 사용될 수 있다. $TCID_{50}$ 은 바이러스 역가측정의 일상적 방법을 사용하여 측정한다.

바이러스와 함께 혈청 또는 IgG의 접종을 한 후에 혈청/IgG-바이러스 혼합물을 삼중으로 표적 세포에 첨가한다. 37℃에서 밤새 항온처리한 후, 플레이트를 1000 rpm에서 5분간 원심분리하고 배지를 완전히 갈아준다. 세척 단계를 3×반

복하여 혈청/IgG-바이러스 접종물의 완전한 제거를 확인한다. 배양액의 4일째에 배지를 갈아주고 7일째에 상층액을 p24 코아 항원의 정량을 위하여 수집한다. 퍼센트 저해는 각각 혈청/IgG 처리된 조직 배양액 웰의 중간값 p24 코아 항원 농도를 특정 음성 대조구의 값과 비교함으로써 측정한다.

동시에, 세척 단계에 의하여 완전히 제거되지 않은 HIVIG™ 나 혈청에 기인하여 측정된 p24 코아 항원의 양에서 임의의 비특이적 감소를 측정하기 위하여 대조구를 제조한다. 혈청/IgG-바이러스 혼합물을 표적 세포에 첨가한 경우, 각 혈청, IVIG™ 또는 HIVIG™ 을 또한 바이러스로 미리 예방접종되지 않은 표적 세포에 첨가한다. 이 웰은 실험 배양액과 동시에 처리된다. 배양액의 7일 후에, 각 웰에서 상층액은 음성 대조구의 상층액과 1:1로 혼합되고, p24 항원 농도를 정량한다. 음성 대조구의 값에 50% 이하인 측정값은 p24 항원의 비특이적 저해로 생각되며 이것은 남은 p24 항체의 존재때문일 수 있다.

본 발명은 상기 실시예에 참고로 설명되었지만, 다양한 개질이 본 발명의 본질에서 벗어나지 않는 한 만들어질 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 본 발명은 오직 다음의 청구범위에 의하여 제한된다. 상기에 인용된 모든 참고는 전체가 본원에서 인용된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

키메라 CHIV 레트로바이러스 게놈을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 상기 키메라 CHIV 레트로바이러스 게놈은 포유류의 숙주 세포에서 상기 키메라 레트로바이러스 게놈을 발현시켜 생성된 레트로바이러스 입자가 영장류에 대하여 비병원성을 나타내도록 하기에 충분한 염소 관절염 뇌염 바이러스(CAEV)의 바이러스 게놈의 단편 하나 이상과 하나의 HIV-1 외피 유전자를 함유하며, 포유류 숙주 세포에서 키메라 레트로바이러스 게놈의 발현을 지시할 수 있는 발현 조절 단편을 포함하고, 숙주 세포에서 레트로바이러스 게놈을 발현시킴으로서 생성된 상기 레트로바이러스 입자는 HIV-1에 대한 면역 반응을 일으킬 수 있는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 CAEV 바이러스 게놈의 일부가 CAEV-Co로부터 획득된 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 CAEV 바이러스 게놈의 일부가 CAEV-Co로부터 15 %이하 변이된 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 HIV-1 외피 유전자가 HIV-1의 균주 SF_{33} 으로부터 획득된 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 HIV-1 외피 유전자가 HIV-1의 균주 SF_{162} 에서 유래된 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 6.

제1항에 있어서, 상기 HIV-1 외피 유전자가 HIV-1의 균주 SF_{33} 또는 SF_{162} 의 외피 유전자로부터 15% 이하 변이된 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 7.

제1항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 정제된 레트로바이러스.

청구항 8.

제7항에 있어서, 상기 레트로바이러스가 시험관내 세포변성인 정제된 레트로바이러스.

청구항 9.

CHIV 면역원 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 백신.

청구항 10.

제9항에 있어서, 상기 CHIV 면역원은 정제된 레트로바이러스인 백신.

청구항 11.

제9항에 있어서, 상기 CHIV 면역원은 키메라 CHIV 레트로바이러스 게놈을 포함하는 정제된 폴리뉴클레오티드인 백신.

청구항 12.

제9항에 있어서, 또다른 면역자극성 물질을 추가로 포함하는 백신.

청구항 13.

제12항에 있어서, 상기 면역자극성 물질이 보조제인 백신.

청구항 14.

제13항에 있어서, 상기 보조제가 알루미늄 포스페이트, 수산화 알루미늄, 프로인트 불완전 보조제 및 QS21로 구성된 군 중에서 선택되는 백신.

청구항 15.

제9항에 있어서, 경구, 항문, 질내 또는 비강 투여를 위해 제제화된 백신.

청구항 16.

개체에 CHIV 면역원의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 개체에 면역 반응을 일으키는 방법.

청구항 17.

CHIV 면역원의 치료적 유효량을 림프구와 접촉시키는 단계를 포함하는 HIV-1에 대한 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 상기 CHIV 면역원의 치료적 유효량은 림프구로부터 면역 반응을 자극하는 것인 방법.

청구항 18.

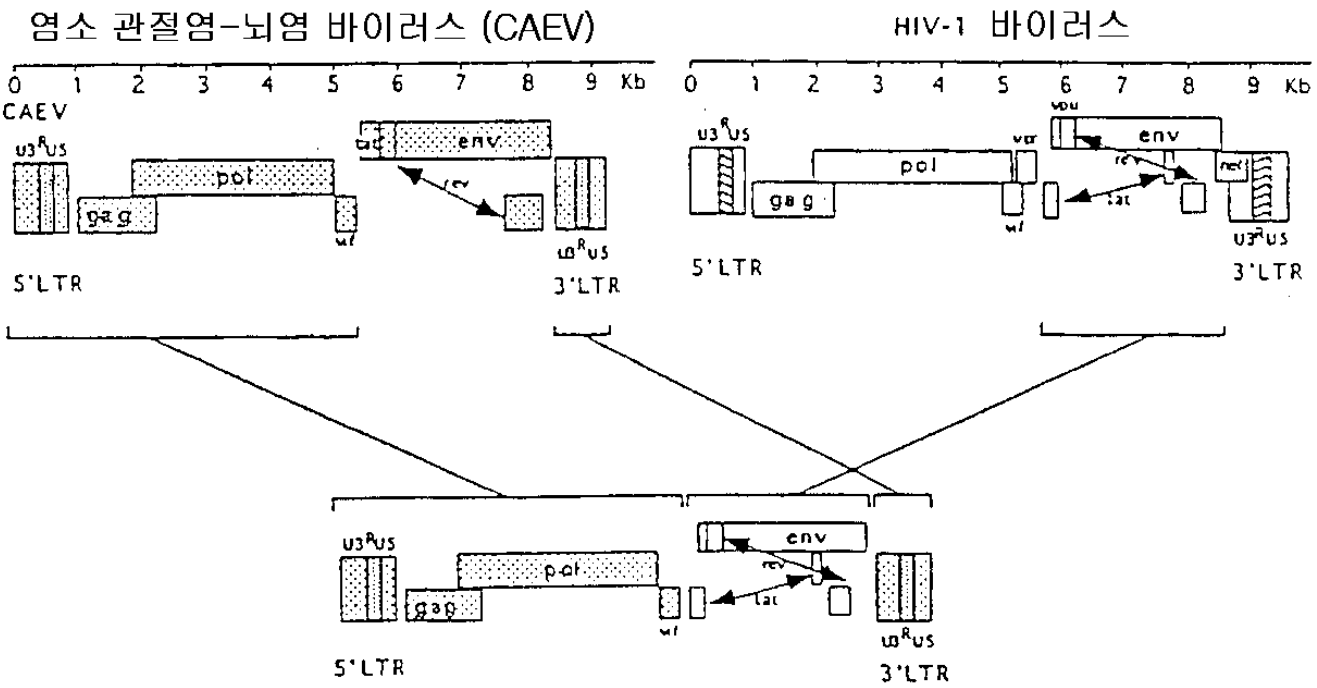
제1항의 폴리뉴클레오티드를 레트로바이러스 게놈을 발현시킬 수 있는 포유류 숙주 세포내로 도입시키는 단계, 배지에서 상기 숙주 세포를 배양하여 바이러스 입자를 생산하는 단계 및 상기 배양 배지로부터 상기 바이러스 입자를 정제하는 단계를 포함하는 바이러스 제제를 생산하는 방법.

청구항 19.

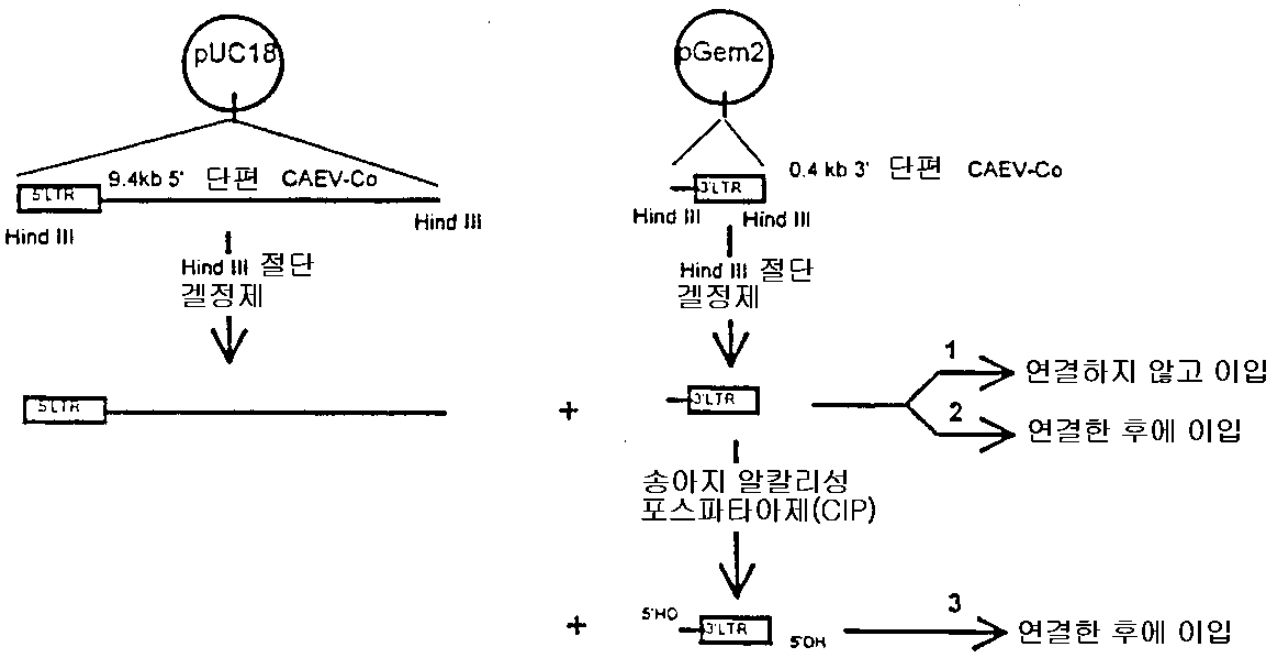
하나 이상의 CAEV 바이러스 단백질 및 하나 이상의 HIV-1 바이러스 단백질을 포함하는 정제된 레트로바이러스 입자.

도면

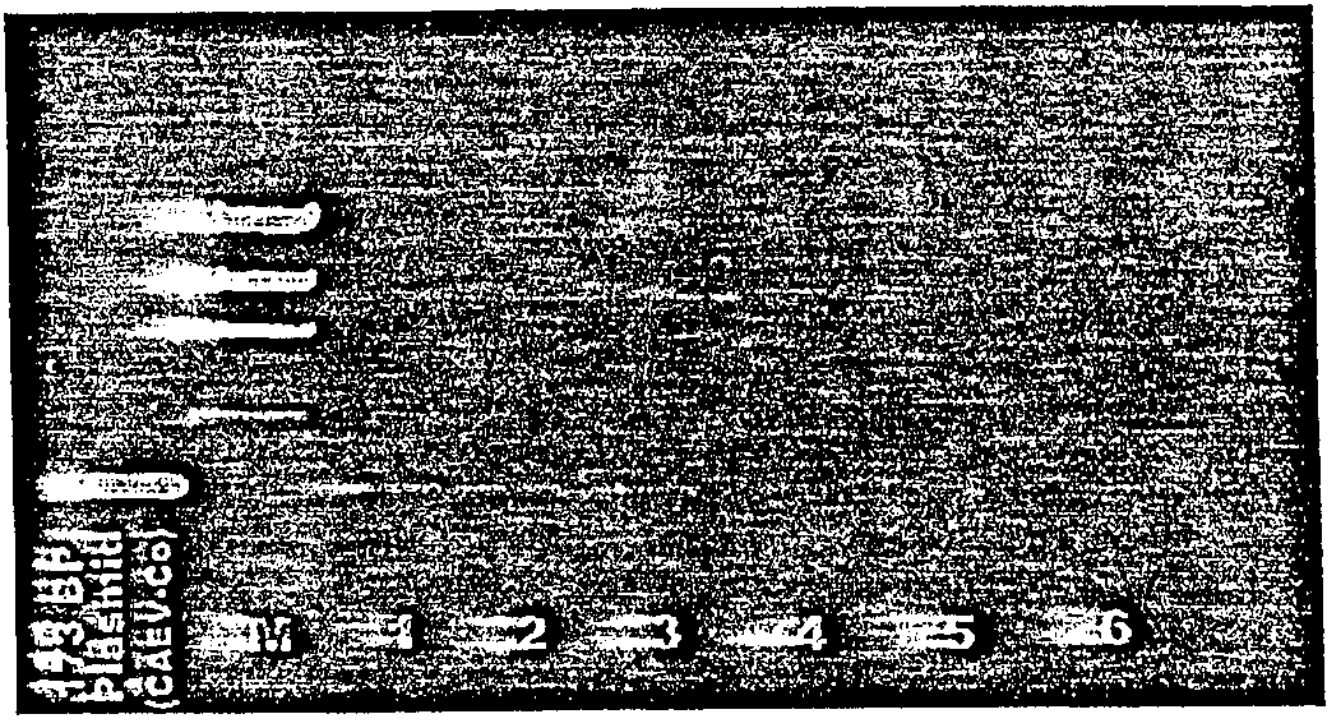
도면 1



도면 2a

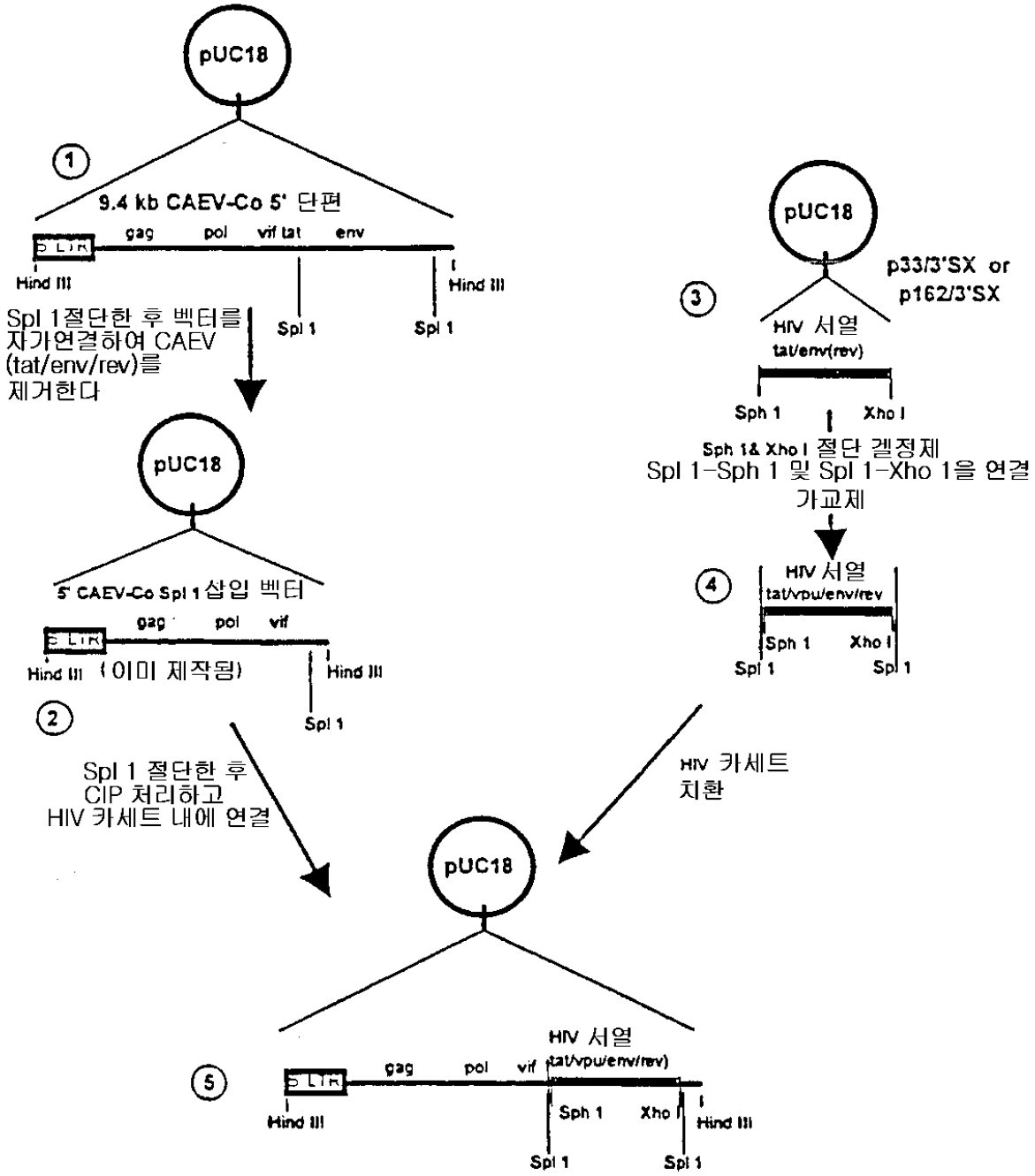

pUC18
9.4kb 5' 단편 CAEV-Co
5'LTR
Hind III
Hind III
Hind III 절단
겔정제
5'LTR
+
pGem2
0.4 kb 3' 단편 CAEV-Co
3'LTR
Hind III
Hind III
Hind III 절단
겔정제
3'LTR
1
연결하지 않고 이입
2
연결한 후에 이입
송아지 알칼리성
포스파타아제(CIP)
+
5'HO
3'LTR
5'OH
3
연결한 후에 이입

도면 2b

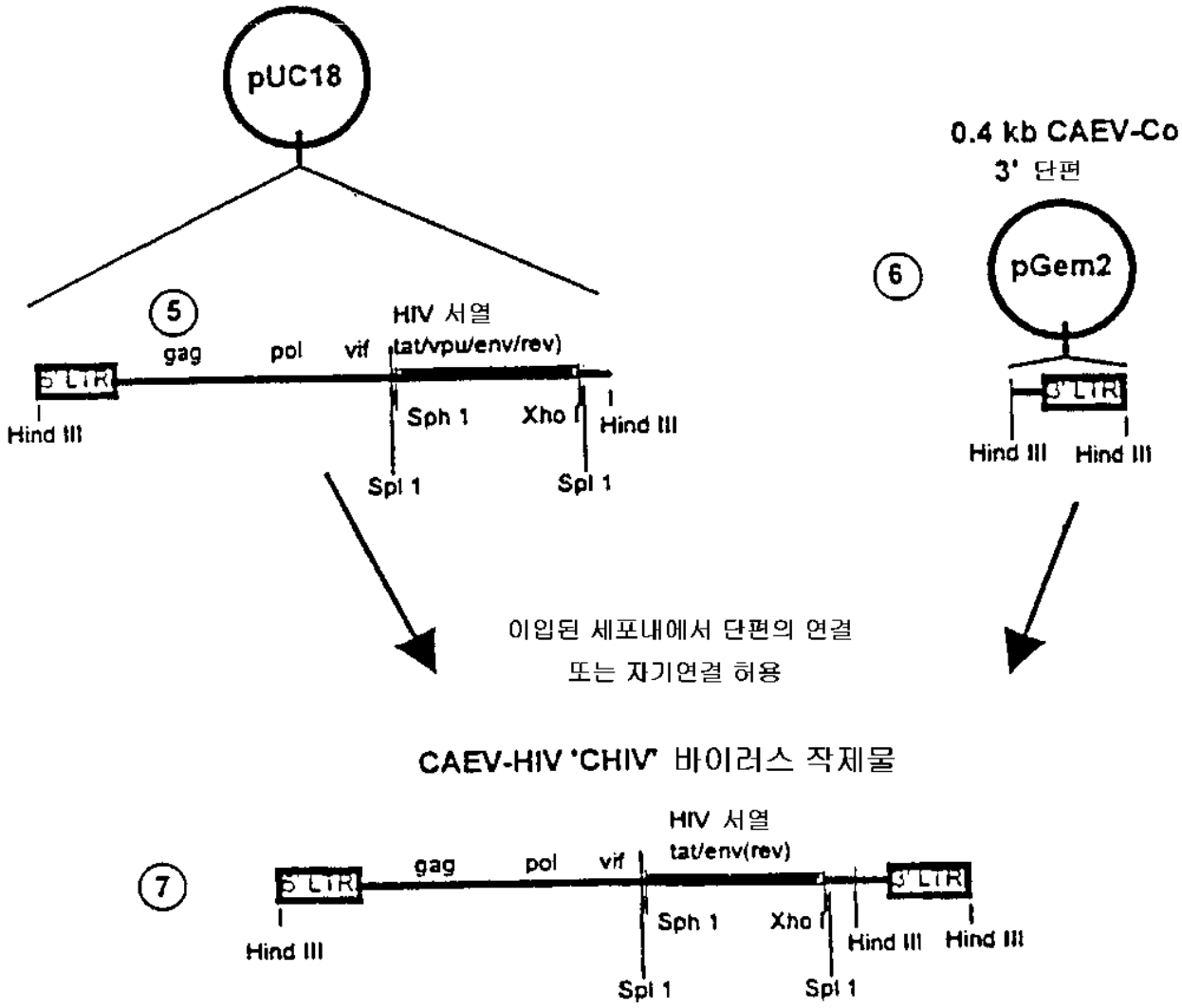

1 2 3 4 5 6

도면 3a

4/6

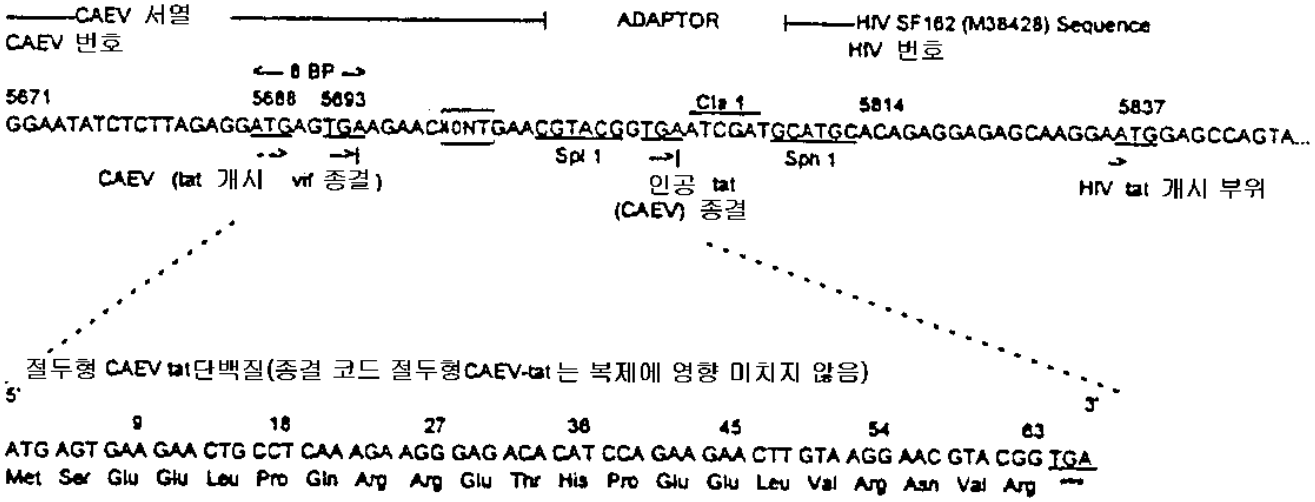

pUC18
1
9.4 kb CAEV-Co 5' 단편
5' LTR
gag
pol
vif tat
env
Hind III
Spl 1
Spl 1
Hind III
Spl 1절단한 후 벡터를 자가연결하여 CAEV (tat/env/rev)를 제거한다
pUC18
5' CAEV-Co Spl 1 삽입 벡터
5' LTR
gag
pol
vif
Hind III
(이미 제작됨)
Hind III
Spl 1
2
Spl 1 절단한 후 CIP 처리하고 HIV 카세트 내에 연결
pUC18
3
p33/3'SX or p162/3'SX
HIV 서열
tat/env(rev)
Sph 1
Xho I
Sph 1& Xho I 절단 겔정제
Spl 1-Sph 1 및 Spl 1-Xho 1을 연결
가교제
4
HIV 서열
tat/vpu/env/rev
Sph 1
Xho I
Spl 1
Spl 1
HIV 카세트 치환
pUC18
5
5' LTR
gag
pol
vif
HIV 서열
tat/vpu/env/rev
Hind III
Sph 1
Xho I
Hind III
Spl 1
Spl 1

도면 3b


pUC18
5
gag
pol
vif
HIV 서열
tat/vpu/env/rev)
5' LTR
Hind III
Sph 1
Xho I
Hind III
Spl 1
Spl 1
0.4 kb CAEV-Co
3' 단편
6
pGem2
3' LTR
Hind III
Hind III
이입된 세포내에서 단편의 연결
또는 자기연결 허용
CAEV-HIV 'CHIV' 바이러스 작제물
7
HIV 서열
tat/env(rev)
gag
pol
vif
5' LTR
3' LTR
Hind III
Sph 1
Xho I
Hind III
Hind III
Spl 1
Spl 1

도면 3c

5' CAEV-Co-HIV p162/3'SX 접합부



인공 종결에 의하여 절두된 정상 CAEV tat 서열의 첫 21 아미노산

3' CAEV-Co-HIV p162/3'SX 접합부