(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4316371号
(P4316371)

(45)発行日　平成21年8月19日(2009.8.19)　(24)登録日　平成21年5月29日(2009.5.29)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B
C07K 14/16	(2006.01)	C07K	14/16	
A61K 31/713	(2006.01)	A61K	31/713	
A61P 31/18	(2006.01)	A61P	31/18	

請求項の数 15　(全 67 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-502211 (P2003-502211)
(86)(22)出願日　平成14年5月31日(2002.5.31)
(65)公表番号　特表2004-535190 (P2004-535190A)
(43)公表日　平成16年11月25日(2004.11.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/017258
(87)国際公開番号　WO2002/099101
(87)国際公開日　平成14年12月12日(2002.12.12)
審査請求日　平成17年5月6日(2005.5.6)
(31)優先権主張番号　09/872,733
(32)優先日　平成13年6月1日(2001.6.1)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　502354111
アメリカ合衆国
アメリカ合衆国、メリーランド州　２０８５２、ロックヴィル、スウィート　３２５、エグゼキュティヴ　ブルヴァード　６０１１、ナショナル　インスティテューツ　オヴ　ヘルス、オフィス　オヴ　テクノロジー　トランスファー
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一
(72)発明者　パブラキス　ジョージ　エヌ.
アメリカ合衆国　メリーランド州　ロックビル　プルデュ　コート　９
最終頁に続く

(54)【発明の名称】変異したＨＩＶｇａｇ／ｐｏｌ、ＳＩＶｇａｇおよびＳＩＶｅｎｖ遺伝子を有する分子クローン

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

以下を含む、Rev、Tat、および任意のウイルスRNA輸送エレメントの非存在下で機能する能力があるレンチウイルス発現系：

(a)抑制性/不安定性領域を除去するように変異させたHIV-1 gag/pol遺伝子を含む、パッケージングベクター；

(b)転移ベクター；および

(c)配列番号：１８に示されるenv遺伝子のコード配列を有するSIV-1 env遺伝子を含む、エンベロープをコードするベクター。

【請求項２】

請求項１記載のレンチウイルス発現系を含む形質転換された宿主細胞。

【請求項３】

細胞が真核生物である、請求項２記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項４】

細胞がヒト細胞である、請求項３記載の宿主細胞。

【請求項５】

抑制性/不安定性領域を除去するように変異させたHIV-1 gag/pol遺伝子から、宿主細胞においてHIV GagおよびHIV Polを発現させる段階、ならびに発現がRev、Tatまたは任意のウイルスRNA輸送エレメントに依存していない、配列番号：１８に示されるenv遺伝子のコード配列を有するエンベロープコード遺伝子からエンベロープタンパク質を発現させる段

階を含む、Rev、Tat、または任意のウイルスRNA輸送エレメントの非存在下でレンチウイルス粒子を作製するための方法。

【請求項６】

配列番号：１８に示されるenv遺伝子のコード配列を有するSIV-1 env遺伝子を含む、核酸構築物。

【請求項７】

請求項６記載の核酸構築物を含むベクター。

【請求項８】

請求項６記載の核酸構築物を含む形質転換された宿主細胞。

【請求項９】

請求項６記載の核酸構築物および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項１０】

gag/pol遺伝子がHIV-1 gag/pol遺伝子である、請求項１記載のレンチウイルス発現系。

【請求項１１】

HIV-1 gag/pol遺伝子が配列番号：１に示されるHIV-1 gag/pol遺伝子のコード配列を有する、請求項１記載のレンチウイルス発現系。

【請求項１２】

gag/pol遺伝子がHIV-1 gag/pol遺伝子である、請求項５記載の方法。

【請求項１３】

HIV-1 gag/pol遺伝子が配列番号：１に示されるHIV-1 gag/pol遺伝子のコード配列を有する、請求項５記載の方法。

【請求項１４】

パッケージングベクターが配列番号：６に示されるパッケージング構築物pCMVgag/polBNKanのDNA配列を有する、請求項１記載のレンチウイルス発現系。

【請求項１５】

転移ベクターが配列番号：８に示されるpmBCwCNluciまたは配列番号：９に示されるpmBCmCNluciのDNA配列を有する、請求項１記載のレンチウイルス発現系。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

I．技術分野

本発明は、いずれのSIVまたはHIVの制御因子にも依存せずに発現することができる、変異したHIV-1 gag/polおよびSIV gag遺伝子配列を含む核酸に関する。本発明はまた、いずれのSIVまたはHIV制御因子にも依存せずに発現することができる、変異したSIV env遺伝子配列を含む核酸に関する。本発明の好ましい核酸は、感染性ウイルス粒子を生成することができる。

【０００２】

本発明はまた、変異したHIV-1 gag、HIV-1 pol、SIV gagおよび/またはSIV env遺伝子配列を含むベクター、ベクター系、および宿主細胞に関する。本発明はまた、これらの核酸および/またはベクターもしくはベクター系を含む宿主細胞に関する。本発明はまた、遺伝子治療における、またはワクチンとしての使用のためのこれらの核酸、ベクター、ベクター系および/または宿主細胞の使用に関する。

【背景技術】

【０００３】

II．背景

最近まで、遺伝子治療プロトコールは、しばしば、マウス白血病ウイルス(MLV)のようなレトロウイルス由来のベクターに頼ってきた。これらのベクターは、それらが形質導入する遺伝子は標的細胞のゲノムへ組み込まれるという、長期間発現のために望ましい性質であるため、有用である。しかしながら、これらのレトロウイルスベクターは、分裂細胞にのみ形質導入することができ、これは肝細胞、筋線維、造血幹細胞、および神経細胞の

ような非増殖性細胞におけるインビボでの遺伝子移入についてそれらの使用を制限する。

【０００４】

レンチウイルスは、分裂細胞および非分裂細胞の両方を感染させることができるレトロウイルスの型である。それらは動物モデルにおいて、様々な非分裂細胞(神経細胞およびマクロファージのような)での長期間の遺伝子発現(6ヶ月まで)を提供するのに極めて効果的であることが立証されている。例えば、Amadoら、Science 285:674-676(1999年7月)を参照されたい。最適な遺伝子移入系は非増殖性細胞のゲノムへ統合されうるHIV、または他のレンチウイルスに基づくベクターを含むであろうことが提唱された。レトロウイルスは標的細胞のゲノムに統合されるため、形質導入の繰り返しは必要ない。それゆえに、インビボでの遺伝子送達の能力があるアデノウイルスベクターと対照的に、注入されたウイルス抗原に対する体液性応答に関連する問題を回避することができる。例えば、Naldiniら、Science, 272:263-267(1996), p. 263を参照されたい。

【０００５】

HIVおよび他のレンチウイルスは、本質的な構造遺伝子(env、gagおよびpol)に加えて、制御遺伝子(tatおよびrev)およびアクセサリー遺伝子(vpr、vif、vpuおよびnef)を含む複合体ゲノムを有する。HIVは、ヒト細胞においてその遺伝子を効率的に感染および発現させるように進化してきた。かつ、その組み込み前複合体が標的細胞において、核の無傷の膜を通り抜けることができるため、マクロファージのような非分裂細胞を感染させることができる。この複合体は、ウイルスDNAに加えて、酵素インテグラーゼ、vpr遺伝子の産物、およびマトリックスと呼ばれるgag遺伝子によりコードされるタンパク質を含む。マトリックスタンパク質は、組み込み前複合体が核の中へと進み宿主DNAに接近することを可能にする。レンチウイルスは、真に静止状態の細胞(G_0期における細胞)を効率的に形質導入することができない。しかしながら、マウスレトロウイルスベクターとは違って、分裂細胞を感染させることができることに加えて、HIV基盤ベクターは、造血幹細胞のような非分裂細胞において、ならびに神経細胞、網膜光受容体、筋肉および肝細胞のような終末分化した細胞において、治療遺伝子の効果的かつ持続性の形質導入および発現を達成することができる。例えば、Amadoら(1999年7月)およびKlimatchevaら、Frontiers in Bioscience 4:d481-496(1999年6月)、ならびにそれらに引用される参照文献を参照されたい。

【０００６】

レンチウイルスベクターは効率的な遺伝子送達媒体でありうるが、それらの起源による安全性の心配がある。それゆえに、この分野では、複製可能レンチウイルス(replication competent lentivirus)(RCL)の出現を防ぐために組み込まれた安全性の特徴をもつベクターおよび生成系の開発を研究してきた。例えば、たいていの実験室での適用では、レンチウイルスは一般的に、細胞系が3つの別々の構築物（パッケージング構築物、転移構築物、およびエンベロープコード構築物）でトランスフェクションされる、一過性系において作製される。パッケージング構築物は、ベクターのパッケージングに必要なエレメント(envを除いて)およびベクター粒子を生成するために必要とされる酵素を含む。転移構築物は、ベクターが標的細胞を感染させるため、および治療(またはレポーター)遺伝子の転移のために必要な遺伝的シス作用配列を含む。レンチウイルスenv遺伝子は一般的に、パッケージング構築物から除去され、その代わりとして、異なるウイルスのエンベロープ遺伝子が第三のベクター「envコードベクター」において供給されるが、レンチウイルスenv遺伝子は、ベクターが$CD4^+$T細胞を感染させることを意図されることが望ましい場合に用いられうる。通常用いられるエンベロープ遺伝子は、幅広い種類の細胞を感染させることができ、その上、粒子に安定性を与え、かつベクターが高力価まで濃縮されることを可能にする、水疱性口内炎ウイルスのG糖タンパク質(VSV-G)をコードするものである(例えば、Naldiniら、Science 272:263-267(1996)およびAkkinaら、J. Virol. 70:2581(1996)を参照)。3つの別々の構築物の使用およびそれらの間の重複配列の欠如により、レンチウイルス(転移)ベクターの生成時における、組換えの可能性が最小化される。さらに、レンチウイルス(転移)ベクター自身によりウイルスタンパク質が発現されないため、それらは動物モデルにおいて、ベクターを発現する細胞に対する有効な免疫応答(アデノウイルスに

基づくベクターに関する特定的な問題)を誘発しない。例えば、Amadoら、Science 285:674-676(1999年7月)およびそれに引用される参照文献を参照されたい。Naldiniら、Science 272:263-267(1996)も参照。

【０００７】

最初のパッケージングプラスミドは、envを除いてはほとんどのHIV遺伝子を含んでいた。安全性を向上させる試みにおいて、その後のHIVベクターは、パッケージングプラスミドがすべてのアクセサリー遺伝子を欠いて作製された。この方法は、効率的なベクター作製を妨げず、可能性のあるRCLはヒトにおいてHIVの効率的な複製に必要なアクセサリー遺伝子を欠損しているため、系の安全性を有意に増加させる。これらのベクターはインビボにおいて成長が停止した細胞系および神経細胞を形質導入することができるが、それらは効率的にはマクロファージに形質導入しないことが報告されていた。アクセサリー遺伝子vprは、これらのHIVベクターを用いるこれらの細胞のHIV感染に必要であると考えられている。Zuffereyら、Nature Biotechnol. 15:871-875(1997)を参照されたい。対照的に、本明細書に後で考察されているように、本発明のHIV基盤レンチウイルスベクターは、ヒトマクロファージおよび試験される他の細胞を感染させることができるために、いずれのHIVアクセサリー遺伝子も必要としない。

【０００８】

肝細胞の効率的形質導入のためのvprまたはvifの必要性もまた、報告されている。例えば、Kafriら、Nature Genet. 17:314(1997)を参照されたい。これらの結果は、効率的なレンチウイルス媒介型遺伝子移入のためのアクセサリー遺伝子の必要性が標的として選択される細胞の型に依存していることを示し、レンチウイルスベクターの将来的適用は、必要とされる異なるアクセサリー遺伝子をもつベクター構築物を含みうることを示唆している。

【０００９】

Zuffereyら(1997)は、病原性遺伝子、env、vif、vpr、vpu、およびnefが除去されたHIVベクター系を記載している。この複合的に弱毒化されたベクターは、成長を停止した細胞および培養中の単球由来マクロファージを形質導入する能力を保存し、かつインビボでの成体の神経細胞へ遺伝子を効率的に送達することができた。Zuffereyら(1997)およびNaldiniら(1996)に記載されているパッケージングプラスミドは、GagおよびPolに加えて、RevおよびTatをコードしている。

【００１０】

制御遺伝子tatの非存在下でビリオンへパッケージされることになるように操作されたレンチウイルスベクターもまた記載されている。例えば、Kimら、J. Virol. 72:811-816(1998)およびMiyoshiら、J. Virol. 72:8150-8157(1998)を参照されたい。これらのベクターにおいて、tat遺伝子は、パッケージングプラスミドから除去された。Kimらは、連続的な5' LTRプロモーターが強い構成的なプロモーターに置換されさえすれば、tatは必要ではないと述べている。それはまた、HIV治療にとって他の利点をもつ。構成的HCMVプロモーターでのHIV-1 LTRの置換は、ベクター作製に影響を及ぼさないであろうことから、Tatトランスドミナント変異体のような、抗Tat分子または治療的薬剤としてのTat活性化応答エレメントデコイ（decoy）の使用を可能にする。(p. 814、2段落目を参照。)tat遺伝子の除去は、可能性のあるRCLに寄与しうると考えられる本質的病原性因子を排除する。Kimら(1998)は、tat、vif、vpr、vpuおよびnefを含まないベクター系を記載している。好ましいベクター系は、著者らは「RREと共に」と述べているが、この系において効率的なRNA操作に必要とされるrev遺伝子を含む。(p. 811、2段落目。)しかしながら、Kimらはまた、CTEを使用するRev非依存性構築物も構築した。rev/RRE構成要素は、Mason-Pfizerサルウイルス(MPMV)構成的輸送エレメント(constitutive transport element)(CTE)のような配列を用いることにより除去することができ、それによりすべてのアクセサリータンパク質を排除するが、これは力価において有意な低下を導くと、Kimらは述べている。

【００１１】

Srinivasakumarら、J. Virol. 71:5841-5848(1997)は、Rev依存性様式またはRev非依存

性様式のどちらにおいても、高レベルのHIV-1構造タンパク質を構成的に発現させる安定的なHIV-1パッケージング系統の作製を記載している。これらの細胞系は、ハイグロマイシンB耐性遺伝子を発現させるHIV-1ベクターを用いることにより遺伝子移入を評価するために、およびベクター力価へのRev、Tat、およびNefの効果を研究するために用いられた。Rev非依存性細胞系は、MPMV CTEを含むgag-pol発現ベクターおよびenv発現ベクターを用いることにより作製された。この論文は特に、4つのプラスミド：HIV-1構造遺伝子発現のためにRev同時発現を必要とするCMV gagpol-RREおよびpCMVenv、ならびに必要としないpCMV gagpol-CTEおよびpCMVenv-CTEの構築を記載している。Rev含有細胞系およびRev非依存性パッケージング細胞系を作製するために、CMT3細胞は、リン酸カルシウムトランスフェクション法を用いて、Gag、Gag-Pol、およびEnvを発現させるベクターでトランスフェクションされた。

【００１２】

MPMV CTE(pTR167-CTE)およびRev非依存性様式でHIV構造タンパク質を発現させるパッケージング細胞系を含むHIVベクターを作製することにより、著者らはRev無しで完全に機能するHIVベクター系を得ることができた。この系から得られるベクターの力価は、Revを含む対応する系から得られるものと本質的に同じであった。著者らはこのような関係において、CTEがRev依存性構築物での一過性発現アッセイにおいて以前に観察されたものと類似して、完全にRev-RRE機能の代わりになっているように考えられると述べている。これは、HIV複製の数ラウンドが測定された状況と対照的である。それらの場合において、CTE含有ウイルスからの力価は常に、RevおよびRREを利用するウイルスと比較して、少なくとも1ログユニット低下していた。(Srinivasakumarら、p. 5847を参照。)

【００１３】

著者らは、Revの非存在下において働くHIVベクター系をもつことの利点は、Rev機能に対する細胞内免疫のための送達媒体としてそれを使用する可能性を開くと述べている。Rev M10またはRREデコイのような、HIV複製に顕著な阻害効果を生じるRev拮抗物質をコードする遺伝子は、HIVベクターへ導入され、普通にHIVによる感染が可能な細胞へと入ることができる。「抗Rev」遺伝子の発現は、HIV感染を減衰させることが予想されるものと考えられる。任意の残留するHIVの複製がベクターLTR(Tatによる)の活性化を導き、感染性ウイルス由来のタンパク質によりパッケージされるであろうベクター由来のRNAを作製する。このシナリオにおいて、野生型ウイルスは、以前に免疫化されていない細胞へのベクター粒子の伝播を可能にしうるヘルパーとして作用するものと考えられる。さらなるベクター伝播のため、この種のスキームは、伝統的なレトロウイルスベクターに基づくものより、インビボでのHIV感染の調節においてより効果的である可能性が高い。著者らは、目下、モデル系においてこの方法を試験しているところであると、述べている。(Srinivasakumarら、p. 5847を参照)

【００１４】

安全な系の探求におけるもう一つの開発は、いわゆる自己不活化(self-inactivating)(SIN)ベクターである。例えば、Yuら、Proc Natl Acad Sci USA 83:3194-3198(1986)、およびMiyoshiら、J. Virol. 72:8150(1998)を参照されたい。Yuらにおいて、レトロウイルス由来ベクターSINベクターは、哺乳動物細胞へ遺伝子全体の形質導入のために設計された。YuらのSINベクターは、エンハンサーおよびプロモーターの機能をコードする配列を含む、3'末端反復配列(long terminal repeat)(LTR)において299塩基対の欠失を含む。そのようなベクター由来のウイルスがNIH 3T3細胞を感染させるために使用された場合、その欠失は5' LTRへ転移され、結果として感染した細胞においてプロウイルスの転写を不活化した。SINベクターによる細胞へのハイブリッド遺伝子(ヒトメタロチオネイン促進c-fos)の導入は、再編成に関連せず、いくつかの場合においてカドミウムにより誘導される標準のmRNA転写の形成に至った。Miyoshiらにおいて記載されているベクターもまた、欠失3'(下流)LTRを含む。上流LTR内の配列は、ウイルスのゲノムが発現されるプロモーターとしての役割を果たす。下流LTRに導入された欠失は、逆転写の間に上流LTRへ転移される。この欠失は、LTRプロモーターを不活化し、ベクターRNAの生成を排除する。転移されうる

遺伝子(例えば、レポーターまたは治療遺伝子)は、レンチウイルスベクターへ挿入されている外因性ウイルスまたは細胞のプロモーターから発現される。SINベクターの重要な安全性特徴は、LTRのプロモーター活性の不活化が宿主ゲノムへの(転移ベクターの)挿入性突然変異誘発の可能性を低下させることである。さらに、(転移)ベクターRNAの発現が排除されるため、標的細胞におけるRCL生成の可能性がなお一層最小化される。SINベクターは、哺乳動物細胞において遺伝子の制御された発現を研究するために設計された遺伝子移入実験において、特に有用である。組み込まれたプロウイルスの両方のLTRにおけるエンハンサーおよびプロモーター配列の欠如はまた、細胞の発癌遺伝子を活性化する可能性を最小にし、ヒト遺伝子治療に用いられうるより安全な代替物を提供しうる。安全性および特異性を高めうる他の改変は、一時的にまたは組織もしくは細胞特異性を伴ってのいずれかで、遺伝子発現を制御する特定の内部プロモーターの使用を含む。

【００１５】

ヒトの研究において安全性を向上させるための他の方策は、サル免疫不全ウイルス、ウシ免疫不全ウイルス、またはウマ伝染性貧血ウイルスのような非ヒトのレンチウイルスを使用することであると考えられる。これらのうち、ネコ免疫不全ウイルス由来のベクターは、非分裂ヒト細胞を効率的に形質導入するように操作された。例えば、Poeschlaら、Nature Med. 4:354-357(1998)および国際公開公報第99/15641号を参照されたい。さらに、Whiteら、J. Virol. 73:2832-2840(1999年4月)は、パッケージング構築物と転移構築物との間の組換えの可能性を低下させることにより安全性を向上させる試みにおいて、ヒトおよびサルの免疫不全ウイルスエレメントを用いるレンチウイルスベクターを記載した。

【００１６】

効率的なパッケージング系統の開発は、VSV-Gエンベロープの発現および多数のHIVタンパク質が細胞への毒性があるため、困難であることが判明した。最近、パッケージング遺伝子およびVSV-Gの発現、さらにベクターの生成を意のままに行うことができる産生系統が設計された。Kafriら、J. Virol. 73:576-584(1999)。毒性遺伝子の発現が止められた場合、細胞系は、ベクター生成拡大のために増量されうる。この細胞系は、RCLを発生させることなく、高力価のベクターを生成する。Donahueら、Blood 92(補遺1)、抄録4648.5(1998)により記載されているように、HIVベクターで形質導入された造血幹細胞は、アカゲザルへ移植され、少なくとも14ヶ月、経過観察された。その時は、この方法が安全であることが立証された。その研究におけるすべての動物は、循環しているHIVまたはベクターの形跡もなく、健康なままであった。Amadoら、Science 285:674-676(1999年7月)を参照されたい。

【００１７】

多くの遺伝子治療プロトコールは、造血幹細胞を用いて多数の遺伝した代謝障害、感染症、または悪性腫瘍疾患を矯正するために設計されてきた。この細胞は、自己再生する、ならびに血液系および免疫系のすべての成熟細胞へと分化する能力を有する。これらの系に影響を及ぼす多くの疾患は、幹細胞への治療遺伝子の安定的導入により治療されうる可能性がある。最近、レンチウイルスベクターが、多くの造血系統をもつSCIDマウス骨髄の安定的な長期間の再構成に寄与する、極めて初期のヒト幹細胞への効率的遺伝子移入を媒介することにより、エキソビボの幹細胞刺激(マウスのレトロウイルスベクターを使用する場合には必要である)の必要性を回避することが示された。例えば、Miyoshiら、Science 283:682(1999)を参照。同様に、レンチウイルスで形質導入された幹細胞での自家移植のアカゲザルモデルにおいて、多系統遺伝子発現が見出され、マウスのレトロウイルスでの形質導入のためには通常不十分である、最小限の幹細胞刺激の条件下での初期血液細胞前駆体の形質導入を示唆した。Donahueら、Blood 92(補遺1)、抄録4648.5(1998)、およびAmadoら、Science 285:674-676(1999年7月)を参照されたい。

【００１８】

HIV感染において、HIVに対して設計されたレンチウイルスベクターのもう一つの利点は、ウイルスがベクターのパッケージングのためのすべての必要なエレメントを供給するため、感染した患者においてHIVにより動員される可能性である。これらの動員されるベク

ターがHIVエンベロープを含んでいるとすれば、それらは$CD4^+$ T細胞へそれらの遺伝子(例えば、HIVに対する抵抗性を与えるためにカスタム設計された遺伝子)を効率的に転移することができ、それらをその後のHIV感染から保護することができるであろう。レンチウイルスベクターはまた、HIVに感染している$CD4^+$ T細胞においてのみそれらの遺伝子を効率的に発現させるように設計されうる(いわゆる、tat誘導性ベクター)。これらのベクターにおいて、tatおよびrevを含むすべてのHIV遺伝子が除去される；組み込み、発現、およびパッケージングに必要とされるシス作用配列は保持され、発現はHIV LTRの活性(Tatによるトランス活性化を必要とする)に依存している。この系において、ベクター発現がHIV感染に効率的に誘導されることが示された。なおさらに、HIVに対する抵抗性を与える遺伝子の非存在下において、許容的な細胞系におけるこのベクターの安定的組み込みは、結果として、HIV複製の抑制を生じた。HIV抑制の機構は完全には解明されていないが、予備的な結果は、このベクターが逆転写のレベルでHIVと競合することを示唆している。Anら、J. Virol.、印刷中、およびAmadoら、Science 285:674-676(1999)を参照。

【００１９】

静止状態の細胞の遺伝物質の改変が結果として疾患過程の予防または反転を生じる、多数の他の可能性のある医学的適用は探究され始めたところである。例えば、レンチウイルスベクターがラットおよびマウスの網膜へ、ベクターの直接的注入により安定的かつ長期間の遺伝子移入を媒介することができるという発見は、色素性網膜炎の治療のための遺伝子治療という概念に支持を与えた。この網膜の変性疾患は、光受容体細胞死を特徴とし、ゆっくりとした進行で失明に至る。桿体光受容体のcGMPホスホジエステラーゼβサブユニット(PDEβ)遺伝子における変異は、ヒトにおいておよびその疾患のrdマウスモデルにおいて、色素性網膜炎の常染色体劣性型へと導く。以前の研究では、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス媒介型PDEP網膜下の遺伝子移入が、結果として、光受容体細胞死に遅延を生じることを示した。rdマウスモデルを用いて、最近の研究が、光受容体はマウスPDEβ遺伝子を含むレンチウイルスベクターを注入された目のうち、最大50％において救出されうることを実証した。アデノウイルスベクターで以前に得られた短期間の発現と対照的に、この研究でのPDEβ発現は、少なくとも24週間、持続した。この発見は、目下有効な治療を欠いている疾患において遺伝子治療の成功の可能性を指摘するものである。Takahashiら、J. Virol., 73:7812-7816(1999年9月)およびAmadoら、Science, 285:674-676(1999)を参照。

【００２０】

天然において、HIV-1のgag、pol、およびenvの発現は、ウイルスのRevタンパク質の存在に依存している。この依存は、少なくとも一部は、スプライスされていないおよび部分的にスプライスされたmRNA内に位置する、負に作用する配列(抑制性または不安定性エレメント[INS])の存在による。これらのmRNAにおけるRevのRev応答エレメント[RRE]との正の相互作用は、抑制性配列の負の効果を打ち消す。

【００２１】

上記の参照文献のいずれも、そこに記載されるgagおよび/またはpol遺伝子が、抑制性/不安定性が変異されてそれらの発現をRev非依存性にしたgagおよび/またはpol遺伝子に置換されうることを示していないか、または示唆していない。さらになお、本明細書に記載される特定のHIV-1 gag/polまたはSIV gagの変異型遺伝子の開示はない。

【００２２】

本発明のgag/polクローンは、「Method of Eliminating Inhibitory/Instability Regions from mRNA」と題する1992年3月27日に出願された米国特許出願第07/858,747号(米国特許第6,174,666号として発行された)に初めて記載されており、かつ後に、1993年3月29日にPCT出願PCT/US93/02908として出願された一部継続出願(「CIP」)、ならびに米国特許第5,972,596号および第5,965,726号に記載されているように、遺伝子から抑制性/不安定性領域を除去するための方法を用いて作製された。CIP出願の開示は、1993年10月14日の国際公開公報第93/20212号として公表された。(これらの特許および特許出願の開示は、参照として本明細書に完全に明確に組み入れられている。)方法はまた、Schwartzら、J.

Virol. 66:7176-7182(1992)に記載された。

【００２３】

Schneiderら、J. Virol. 71:4892-4903(1997)は、gag、プロテアーゼおよびpol遺伝子内の追加のINSを同定し、特徴付け、かつそれらを同様の方法で変異させることにより、特許出願およびSchwartzらに記載されている研究を広げている。Schneiderらは、完全に変異させたHIV-1gag遺伝子、しかし部分的にのみ変異させたHIV-1pol遺伝子を含む、核酸構築物を開示している。

【００２４】

Schneiderらは、無傷のまたはほとんど無傷のp55^{gag}領域を含む発現ベクターが、他の任意のHIVタンパク質の非存在下で哺乳動物細胞において未成熟なウイルス粒子の生成を可能にすることを実証している。プロテアーゼ領域における追加の変異の導入は、Gag/プロテアーゼの効率的な生成を可能にし、結果として、Pr55^{gag}前駆体のプロセシング、およびレンチウイルス様円錐形コア構造をもつ成熟Gag粒子の生成を生じた。

【００２５】

Schneiderらは、Rev非依存性発現ベクターがこれらのRNAの効率的なRev-RRE依存性救出を支持することができない多くの細胞系において、Gagタンパク質の効率的な発現を可能にすることを開示している。Schneiderらはまた、gag/pol領域がenv領域より多く保存されており、HIVに対する効果的な免疫応答および感染からの保護のために重要である可能性があるため、gag/pol発現ベクターはHIV-1に対するワクチン法にとって重要である可能性があることを開示している。彼らはまた、HIVおよび他のレンチウイルスが静止状態の細胞を感染させることができるため、多くの細胞における効率的なHIV遺伝子発現が非分裂細胞またはゆっくりと分裂する細胞において、レンチウイルスベクターを用いる可能な遺伝子移入実験の対象ともなると述べている。

【００２６】

Pavlakisら、「Natl Conf Hum Retroviruses Relat Infect」(第二版) (1995), 91は、Rev非依存性Gag発現ベクターが、他の任意のHIVタンパク質の非存在下で、ヒト細胞およびマウス細胞においてウイルス粒子を生成できることと、pol領域における追加の変異がプロテアーゼの発現およびp55 gag前駆体のプロセシングを可能にすることを述べている。TatおよびRev非依存性Gag発現ベクターのマウス筋肉における直接的DNAの注入により、結果として、ELISAによるGag発現の検出、および抗gag抗体の応答が生じた。いくつかのRevおよびTat非依存性Gag発現カセットは、レトロウイルスベクターへ挿入され、HIV-1のドミナントネガティブな抑制剤であるGagまたはGag断片を発現させる細胞系が構築された。

【００２７】

Shiverら(1996)は、HIV-1 gag(p55 gag)またはenv(gp120またはgp160)をコードする変異した遺伝子のどちらかをコードする、変異したプラスミドDNAでのマウスおよび非ヒトの霊長類のDNAワクチン接種の結果を記載している。gagおよびenvワクチンのレシピエントの両方とも、抗原特異的な細胞障害性Tリンパ球およびヘルパーTリンパ球(CTL、Th)応答を示した。その結果より、DNAワクチンがマウスおよび非ヒト霊長類の両方において、リンパを通して広められる長命のT細胞応答を誘発したことが実証されたことが示された。

【発明の開示】

【００２８】

III. 発明の概要

本発明は、図1(配列番号：1)に示される変異したHIV-1 gag/pol遺伝子の核酸配列を含む核酸、ならびにこれらの核酸を含むベクターおよびベクター系に関する。

【００２９】

本発明はまた、図3に示される変異したSIV gag遺伝子の核酸配列を含む核酸、ならびにこれらの核酸を含むベクターおよびベクター系に関する。

【００３０】

本発明はまた、図17に示される変異したSIV env遺伝子を含む核酸、ならびにこれらの核酸を含むベクターおよびベクター系に関する。

【００３１】

本発明はまた、その核酸により生成される生成物、例えば、mRNA、タンパク質、および感染性ウイルス粒子に関する。

【００３２】

本発明はまた、これらの核酸および/またはそれらの発現産物を含む組成物に関する。

【００３３】

本発明はまた、これらの核酸、ベクター系またはウイルス粒子を含む宿主細胞に関する。

【００３４】

本発明はまた、mRNA、タンパク質、および/もしくは感染性ウイルス粒子を生成するための、ならびに/または抗体および/もしくは細胞障害性Tリンパ球もしくはヘルパーTリンパ球を誘導するための、これらの核酸、ベクター系、宿主細胞、発現産物、および/または組成物の使用に関する。

【００３５】

本発明はまた、好ましくはヒトにおいて、免疫療法および例えば、ワクチンとしての免疫予防における、または発現後の遺伝子治療における使用のための、これらの核酸構築物、ベクター、ベクター系および/または宿主細胞の使用に関する。本発明の核酸構築物は、レンチウイルスベクターもしくは他の発現ベクターに含まれうるかもしくは組み入れられうる、またはそれらはまた組織細胞へ直接的に注入されうり、結果として、コードされたタンパク質もしくはタンパク質断片の効率的な発現を生じうる。これらの構築物はまた、例えば、インサイチューの標的遺伝子との相同的組換えによる、インビボまたはインビトロでの遺伝子置換のために使用されうる。

【００３６】

V．本発明を行うための様式

前記の概括的な記載および以下の詳細な記載のどちらも、例示的かつ説明のためのもののみであり、主張しているように、本発明を限定するものではないことは理解されるべきである。組み入れられて本明細書の一部を構成している添付の図面は、本発明の態様を図示し、かつ記載と共に、本発明の原理を説明する役目を果たしている。

【００３７】

本発明の一つの局面は、Rev非依存性様式においてHIV-1のGagおよび/またはPolをコードするベクターを含む。本明細書に記載されているそのようなベクターの例は、プラスミドpCMVgagpolBNkanであり、Rev非依存性様式においてHIV-1の完全なGagおよびPolをコードし、カナマイシン耐性を与える遺伝子も含む。このプラスミドは、TatおよびRev非依存性であり、gag/pol mRNAに存在する抑制性/不安定性配列を、その遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を変えることなく除去することにより、作製された。

【００３８】

本発明のgag/polクローンは、抑制性/不安定性領域を除去されているHIVのgag/pol領域のDNA構築物である。構築物は、遺伝子治療での使用のためのレンチウイルスベクターの新しい型の構成要素として、またはワクチンとして有用であると期待される。

【００３９】

本発明のgag、polまたはgag/pol配列は、Revを含むHIVの他の任意の制御および構造タンパク質の非存在下で、ヒトおよび他の哺乳動物の細胞において高度に発現されうる。gag/pol配列がVSV Gタンパク質またはHIVエンベロープタンパク質のようなエンベロープタンパク質をコードする配列(例えば、同じベクターまたは別の発現ベクターにおける)と結合される場合、ヒト細胞へのトランスフェクション後に感染性ウイルスが生成される。HIV gag/pol遺伝子の存在下において、例えば、非HIVエンベロープタンパク質をコードする遺伝子が用いられる場合、生成されるウイルス粒子は、HIVタンパク質GagおよびPolのみを含むものと考えられる。

【００４０】
本発明のgag、polまたはgag/pol配列に基づくレンチウイルスベクターまたはベクター系は、本明細書に記載されているRev非依存性pCMVgagpolBNkan構築物により例示されているように、インビボ(例えば、高力価ベクターの非経口的接種)またはエキソビボ(例えば、インビトロでの患者の細胞の形質導入、続いて形質導入された細胞の患者への再注入)での遺伝子治療のために使用されうる。これらの工程は、種々の立証済みの遺伝子治療プロトコールにすでに使用されている。
【００４１】
本発明のHIV gag/polクローンおよびSIV gagクローンは、参照として本明細書に組み入れられている、米国特許第6,174,666号、ならびにまた関連した米国特許第5,972,596号および第5,965,726号に記載されているように、遺伝子から抑制性/不安定性領域を除去するための方法を用いて作製された。この方法は、正確な位置の同定またはINS機能の機構に関する知識を必要としない。一般的に、突然変異は、mRNAにコードされるアミノ酸配列が変化していないものであるが、変異した遺伝子によりコードされるタンパク質が変異していない遺伝子によりコードされるタンパク質と実質的に類似している、保存的および非保存的アミノ酸置換もまた構想される。変異した遺伝子は、合成でありうる(例えば、化学合成により合成される)、半合成でありうる(例えば、ゲノムDNA、cDNA、またはPCR増幅されたDNAおよび合成DNAの組み合わせ)、または組換え的に作製されうる。遺伝子はまた、選択的にイントロンを含まない場合もある。本発明の核酸はまた、望ましい機能(例えば、GagもしくはPolの抗原性、粒子形成(Gag)または酵素活性(Pol)について)を保持するこれらの遺伝子のRev非依存性断片を含みうるか、またはコードされたタンパク質が、ある特定の環境において好ましくない機能を失うように変異させたRev非依存性変異体も含みうる。後者の場合、例えば、逆転写または組み込みを防ぐために、逆転写酵素またはインテグラーゼの活性部位において変異をコードする(アミノ酸レベルで)ように改変されうる。gag遺伝子のRev非依存性断片は、参照として本明細書に組み入れられている、1992年3月27日に出願された米国特許出願第07/858,747号に、ならびにまた関連した米国特許第5,972,596号および第5,965,726号に記載されている。望ましい場合には、存在するならば、いずれのHIVアクセサリー遺伝子(例えば、vif)のATG開始コドンもまた変異させうる。
【００４２】
インビボでの細胞において、Rev制御タンパク質の非存在下でHIV GagおよびPolタンパク質を生成する能力があることに加えて、本発明のHIV gag/polおよびSIV gagクローンはまた、CTEまたはCTE様エレメント(ひとまとめにして本明細書ではRNA輸送エレメント(RTE)と呼ぶ)のような、任意の追加のシス作用輸送エレメントの非存在下で、HIV GagおよびPolタンパク質を生成する能力もある。SIV gagについての本発明の変異したベクターは、CTEを付加したものよりはるかに優れていることを実験は示している(Qiuら、J Virol. 73:9145-9152(1999)を参照)。
【００４３】
ヒト細胞へのトランスフェクション後にこれらのベクターによりコードされるタンパク質の発現は、RNAおよびタンパク質生成の両方のレベルでモニターされうる。RNAレベルは、当技術分野において公知の方法、例えば、ノーザンブロット法、S1マッピング法またはPCR法により定量される。タンパク質レベルもまた、当技術分野において公知の方法、例えば、ウェスタンブロット法またはELISAまたは蛍光検出方法により定量されうる。高速非放射性ELISAプロトコールは、gagタンパク質を検出するために使用されうる(DUPONTまたはCOULTER gag抗原捕捉アッセイ法)。
【００４４】
遺伝子治療での使用のための、および/またはワクチンとしての本発明のgag/pol遺伝子に基づくレンチウイルスベクターの少なくとも3つの型が構想される、すなわち、以下のものを有するレンチウイルスベクター：
a)複製のラウンドをもたない(すなわち、ゼロ複製系)
b)複製の1ラウンド

c)完全複製系。

【００４５】

複製のラウンドをもたない系について、gag/pol遺伝子、もしくは別々のgag遺伝子およびpol遺伝子、またはこれらの遺伝子の断片は、適当な転写ユニット、例えば、CMVプロモーターおよびBGHポリ(A)部位を用いて発現される。これは、ワクチンを目的とするgag/polユニット(もしくはgagもしくはpolまたはそれの断片)の発現を可能にすると考えられる。この発現は、もし適切な変異、例えば、ミスセンス変異が導入されるとすれば、いずれの機能しうるレトロウイルス酵素の生成もなく、達成されうる。ゼロ複製系において、ウイルス貯蔵物は、対象となる細胞または動物に投与されるだろう。例えば、パッケージングベクターPCMVgagpolBNKan、転移構築物pmBCwCNluciまたはpmBCmCNluci、およびエンベロープ含有ベクターpHCMV-Gを用いる例示的系でウイルス貯蔵物を作製かつ使用すれば、ゼロ複製系を得る。そのような系により生成されたウイルス粒子は細胞を感染させることができ、逆転写された転移構築物DNAは、核へと進むだろうが、ウイルスの構造タンパク質についてのコード領域が存在しないため、ウイルスの発現および複製はない(0ラウンド)。同じ3個のDNAでインビボの細胞をトランスフェクションすれば、それらは核へ進み、ウイルスタンパク質を発現させ、感染性ウイルス粒子を作製し、そして外へ出て、別の細胞を感染させる(1ラウンド)。3個のプラスミドのインビボでの送達は、結果として、低い方の発現になる可能性があるため、少なくとも2つの異なる態様が構想される。第一として、2つのプラスミドは、例えば、図5に示されるMV1およびpHCMV-Gのようなエンベロープ発現プラスミドが使用されうる。HIV、SIV、または他のレトロウイルス由来の機能しうるエンベロープをコードする他のプラスミドも使用されうる。その2つのプラスミドによるトランスフェクションは、新しい細胞へ感染させて組み込むことができる感染性ウイルスを生じる(1ラウンド)。感染した細胞は、gagpolを生成するが、envの非存在下ではウイルス伝播は不可能である。

【００４６】

複製の1ラウンドをもつ系について、少なくとも2つの追加の態様が構想される。第一の方法において、遺伝子、例えば、gag/pol遺伝子、envコード遺伝子および、好ましくは、レポータータンパク質または対象となる他のポリヌクレオチドもしくはタンパク質をコードする遺伝子の組み合わせがインビボで対象となる細胞へ送達される。例示的系について上記で考察されているように、同じ3個のDNAでインビボの細胞をトランスフェクションすれば、それらは、核へ進み、ウイルスタンパク質を発現させ、感染性ウイルス粒子を作製し、放出され、そして別の細胞を感染させる(1ラウンド)。

【００４７】

もう一つの態様において、3'LTRにおいて欠失を有し、かつ異種性プロモーター(例えば、CMVプロモーター、または誘導性プロモーター、または組織特異的プロモーター)が3'LTRプロモーターの代わりに使用される転移ベクターを用いることにより、同じ結果(すなわち、1ラウンドのみの複製)が得られうる。3'LTRにおける変異は、逆転写および組み込みについて不活性にさせる。これは、組み込まれたプロウイルスがそれの5'LTRおよびそれの3'LTRの両方を出発(転移)構築物の3'LTRから引き出すためである。(これはすべてのレトロウイルスのよく知られた性質であり、自己不活化ベクター(SIN)を作製するために用いられている。)入ってくるLTRプロモーターを不活化することを望みうるいくつかの理由があるが、その一つは、組み込まれたプロウイルスにおいて対象となる遺伝子の発現のために、異なる組織特異的または制御されるプロモーターを使用するためである。SINについて、インビトロで細胞へのトランスフェクションおよび感染性ウイルスの収集後に生成されたウイルス貯蔵物を使用する場合には、複製のラウンドはないだろうことを留意されたい。インビボでそのDNAで細胞をトランスフェクションする場合には、複製の1ラウンドがある。機能しうるgag、pol、またはenvがそのDNA混合物に含まれない場合には、全く感染はない(すなわち、感染性ウイルスは生成されない)。

【００４８】

完全に複製するRev非依存性系はまだ構築されていないが、Rev非依存性gag/polおよびe

nv配列を用いて機能しうる系が構築されうることが予想される。望ましい場合には、Revに代わり感染性ウイルスを与えうる、CTEエレメントのような余分の転写後制御エレメントが含まれる(例えば、Zolotukhinら、J. Virol. 68:944-7952(1994)を参照)。完全に複製する系は、LTR、パッケージングシグナル、gag/pol、スプライス部位、env、tat、1つもしくは複数のCTEまたはCTE様エレメント(最適の結果のために望ましい場合には)、およびLTRを含み、一体となっているべきである。tatは、この構築物、少なくとも非許容的細胞に必要とされるものと考えられる。そのような系は図5、(構築物MV2)に描かれている。この系において、対象となる細胞または動物(好ましくはヒト)がその後増殖するウイルス貯蔵物に感染すると考えられる。CTEまたはCTE様エレメント(RTE(RNA輸送エレメント)として構築物MV2に描かれる)は、それらが発現を向上させることが示されたこと、および多くのレトロウイルスが転写後制御エレメントの存在を必要とすることから、望ましい。CTEおよびCTE様エレメントのいくつかの型があり、これらのエレメントはRev-RRE経路とは異なる経路により働くように考えられる。例えば、Tabernerоら、J. Virol. 71:95-101(1997)を参照されたい。CTEおよびHIV RRE/Revに取って代わることができる転写後制御エレメントの新しい型を記載している、1999年5月22日に出願され、1999年12月2日に国際公開公報第99/61596号として公表された(かつ参照として本明細書に組み入れられている)PavlakisおよびNappi、PCT/US99/11082もまた参照されたい。Pavlakis-NappiエレメントはCTEと同じ様式で働かず、かつ配列または構造上の相同性を全くもたない。

【００４９】

好ましい態様において、本発明のレンチウイルス系は、以下の3つの構成要素を含む：

1．ベクター粒子を生成するために必要とされる構造タンパク質(HIV envを除く)および酵素のような、ベクターパッケージングに必要なエレメントをコードする核酸配列を含むパッケージングベクターであり、そのパッケージングベクターは少なくとも本発明の変異したHIVまたはSIV gag/pol遺伝子を含む；

2．標的細胞を感染させるためのベクターに、および対象となる治療的またはレポーターまたは他の遺伝子の転移に必要な遺伝的シス作用配列を含む転移ベクターであり、その転移ベクターはキャプシド形成シグナルおよび対象となる遺伝子または対象となる遺伝子を挿入するためのクローニング部位を含む；ならびに

3．意図されるレシピエント細胞へウイルス粒子をターゲットするために必要なエレメントをコードする配列、好ましくは、水疱性口内炎ウイルスのG糖タンパク質(VSV-G)をコードする遺伝子、または両種指向性MuLVもしくはレンチウイルスenvを含むベクター。

【００５０】

パッケージングベクターにおいてHIV-1 LTRプロモーターの代わりにCMVプロモーターまたは他の強い高効率的プロモーターを用いて、gag、pol、またはgag/polの高発現が、他のいずれのウイルスタンパク質も全く存在しない条件下で達成されうる。HIV-1 LTRプロモーターの他のプロモーターとの交換は、構成的発現が望ましい場合、およびまた、HIV-1プロモーターが弱いマウス細胞のような他の哺乳動物細胞における発現のために、ベクターまたは他のベクターをパッケージングするのに有益である。本発明の配列を含むベクターは、HIV-1 Gag/Pol、HIV-1 Gag、HIV-1 Pol、およびSIV Gagタンパク質の、Rev非依存性生成のために使用されうる。ある特定の態様において、異種性プロモーターの存在はまた、転移ベクターおよびエンベロープをコードするベクターにおいて、そのようなベクターが使用される場合、望ましいと考えられる。

【００５１】

対象となる遺伝子は、達成されるよう求められる効果に従って選択される。遺伝子治療の目的として、治療するまたは予防することが望ましい状態に対して有効である遺伝子産物をコードする、少なくとも1つの治療遺伝子が存在する。代わりに、または追加として、検出可能産物をコードすることによりマーカーとして作用する遺伝子が存在しうる。治療遺伝子は、例えば、アンチセンスRNA、リボザイム、標的タンパク質のトランスドミナントネガティブな変異体、毒素、条件的毒素、抗体もしくはヘルパーT細胞もしくは細胞障害性T細胞を誘導する抗原、単鎖抗体または腫瘍抑制タンパク質をコードしうる。例え

ば、国際公開公報第98/17816号を参照されたい。

【００５２】

レンチウイルスベクターにおける使用としての対象となる遺伝子のよりいっそう広範囲なリストは、例えば、国際公開公報第99/04026号の10ページ、20行目～12ページ、7行目に記載されている。Klimatchevaら(1999)の表2もまた、遺伝子治療に関する疾患および標的細胞のリスト、加えて別のものに使用される多数のレンチウイルスベクターを提供している。このリストは、遺伝性/代謝性欠損症、ウイルス感染症および癌を含む。アデノシンデアミナーゼ欠乏症、家族性高コレステロール血症、嚢胞性線維症、ムコ多糖症VII型、I型およびII型糖尿病、古典的フェニルケトン尿症ならびにゴーシェ病のような遺伝によって受け継がれた遺伝的欠陥は、関与する遺伝子が既知である単一遺伝子の欠損を構成しているため、レンチウイルスベクター媒介型遺伝子治療により克服することが可能であるものとして位置づけられている疾患である。ウイルス性疾患もまた、レンチウイルスの遺伝子送達としての適切な標的を構成しているものとして位置づけられている。特に、多数の遺伝子治療方法がHIV感染の治療のために提案されており、これらの方策のいくつかについては、第一相研究が、最近ヒトにおいて開始された。その論文は、予備的研究がHIV複製に対するアンチセンスRNA、リボザイムおよびトランスドミナントタンパク質の送達のために欠陥マウスオンコウイルスを扱ったと述べている。

【００５３】

任意のベクターにおいて、好ましくは転移ベクターにおいて、挿入される遺伝子は、例えば、ピコルナウイルスRNA由来の内部リボソーム侵入部位(IRES)を有しうるものと考えられる。IRESは、同じプロモーターから2つのタンパク質を発現させたい状況において使用される。例えば、対象となる1つのタンパク質およびマーカー遺伝子、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)、または例えば、国際公開公報第99/04026号の58ページに記載されているようなマーカー遺伝子および薬剤耐性遺伝子(例えば、ホタルルシフェラーゼ遺伝子およびネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子)。IRESを用いて、2つのタンパク質の発現が協調される。さらなる遺伝子もまた、別途のプロモーターの制御下において存在しうる。そのような遺伝子は、例えば、選択マーカー、または上記に挙げられた治療薬剤の中にありうるさらなる治療薬剤をコードしうる。この遺伝子の発現は構成的でありうる；選択マーカーの場合、これは、成功裡にトランスフェクションされたパッケージング細胞、または特に高力価のレトロウイルスベクター粒子を生成しているパッケージング細胞を選択するために有用でありうる。代わりになるべきものとして、または追加として、選択マーカーは、レンチウイルスベクターに成功裡に感染して、それ自身のゲノムへ組み込まれたプロウイルスを有する細胞を選択するために有用でありうる。

【００５４】

遺伝子治療を行う一つの方法は、患者から細胞を抽出し、抽出された細胞をレンチウイルスベクターに感染させ、そしてその細胞を患者へ再導入することである。選択マーカーは、細胞を患者へ再導入する前に、感染したもしくは形質導入された細胞について濃縮する、または感染したもしくは形質導入されたそれらの細胞のみについて積極的に選択するための手段を提供するために用いられうる。この工程は、治療の成功の可能性を増加させうる。選択マーカーは、例として、薬剤耐性遺伝子、代謝酵素遺伝子、または当技術分野において公知の他のいずれの選択マーカーでもありうる。典型的な選択遺伝子は、抗生物質および他の毒性物質、例えば、ヒスチジノール、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ネオマイシン、メトトレキサートに対する耐性を与えるタンパク質、ならびに細胞表面マーカーをコードする。

【００５５】

しかしながら、多くのレンチウイルスベクターの遺伝子治療適用にとって、マーカー遺伝子の発現についての選択は、可能または必然ではない場合がある。実際に、選択マーカーの発現は、インビトロでの研究には都合がよいのに、外来マーカータンパク質に対して向けられた細胞障害性Tリンパ球(CTL)の不適当な誘導のためにインビボで有害でありうるものと考えられる。また、インビボでの適用について、いずれの内部プロモーターも含ま

ないベクターが好ましい可能性がある。内部プロモーターの存在は、例えば、パッケージング細胞系から得られる形質導入力価および組み込まれたベクターの安定性に影響を及ぼしうる。このように、1つまたは2つまたはそれ以上の治療遺伝子についてコードする、二シストロン性または多シストロン性でありうる単一転写ユニットベクターが、インビボでの使用のために設計された好ましいベクターでありうる。例えば、国際公開公報第98/17816号を参照されたい。

【００５６】

本発明における使用のために適した宿主細胞または産生細胞は、当技術分野においてよく知られている。多くのレンチウイルスはすでに、複製欠陥ゲノムおよびパッケージング構成要素へと分割された。分割されていないものについて、それを行うための技術は利用可能である。産生細胞は、Gag、PolおよびEnvタンパク質のようなベクターゲノムによりコードされないウイルス構成要素をコードする。gag、polおよびenv遺伝子は、一過性に産生細胞へ導入されうる、または細胞ゲノムへと安定的に組み込まれて、パッケージング細胞系を与えうる。レンチウイルスベクターゲノムは、その後、トランスフェクションまたは形質導入によりパッケージング細胞系へ導入されて、レンチウイルスベクター粒子を生成するために必要とされるすべてのDNA配列を有する安定な細胞系を作製する。もう一つの方法は、レンチウイルスベクター粒子を生成するために必要とされる異なるDNA配列、例えば、envコード構築物、gag-polコード構築物および転移構築物を一過性三重トランスフェクションにより同時に細胞へ導入することである。

【００５７】

Klimatchevaら(1999)、およびそこに引用された参照文献により同定された標的細胞は、嚢胞性線維症についての気管上皮細胞；色素性網膜炎についての網膜光受容体細胞；造血性疾患、鎌状赤血球貧血、β-地中海貧血症、リソソーム貯蔵疾患、ムコ多糖症、および重症複合免疫不全症候群についての赤血球、マクロファージおよびリンパ球のための前駆体；ゴーシェ病についての骨髄細胞およびマクロファージ；家族性高コレステロール血症についての肝細胞；HIV感染症についてのTリンパ球およびマクロファージ；パーキンソン病およびアルツハイマー病のような神経変性疾患についての脳組織、神経細胞およびグリア細胞；心血管疾患についての内皮細胞および心筋細胞；ならびに癌についての様々な組織(例えば、肝臓または脳)における癌細胞を含む。他の疾患についての標的細胞は、当業者にとって明らかであると考えられる。

【００５８】

本発明の核酸配列の少なくとも1つ、ベクター、ベクター系、または形質導入されたもしくはトランスフェクションされた宿主細胞および薬学的に許容される担体を含むワクチンならびに薬学的組成物もまた、本発明の一部である。

【００５９】

本明細書に用いられる場合、「形質導入」という用語は一般的に、感染による、例えばこの場合レンチウイルスベクターによる、宿主への遺伝物質の移入を指す。「トランスフェクション」という用語は、一般的に、細胞質膜を通過して遺伝物質のいくらかを細胞核へ送達する特定のトランスフェクション剤(例えば、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、脂質製剤、金粒子、および他の微粒子)の使用による、細胞への単離された遺伝物質の移入を指す。

【００６０】

本明細書に記載されているものと類似した系は、本明細書に記載されるHIVおよび/またはSIV遺伝子に加えて、レンチウイルスのエレメントを用いて作製されうる。

【００６１】

薬学的組成物

本発明の薬学的組成物は、本発明の核酸構築物の少なくとも1つ、ベクター、ベクター系、ウイルス粒子/ウイルス貯蔵物、または宿主細胞(すなわち、薬剤)の薬学的および/または治療的有効量を含む。本発明の一つの態様において、単位用量あたりの本発明の薬剤の有効量は、対象となる遺伝子の検出可能な発現を誘導するのに十分な量である。本発明

のもう一つの態様において、単位用量あたりの薬剤の有効量は、治療されることになっている状態の有害作用(症状の重症度、持続期間、または範囲を含む)に対して防ぐ、治療するまたは保護するのに十分な量である。単位用量あたりの薬剤の有効量は、当技術分野においてよく知られているが、特に、接種される哺乳動物の種、哺乳動物の体重および選択された接種療法に依存する。予防または治療に最も適していると考えられる治療薬剤の用量はまた、投与の形、選択された特定の薬剤および治療を受けている特定の患者の生理学的特徴によっても異なるものである。用量は少なくとも1回投与される。その後の用量は指示されるとおりに投与されうる。

【００６２】

本発明の組成物を投与される個体の応答をモニターするために、mRNAまたはタンパク質の発現レベルが測定されうる。多くの例において、そのような固体から得られた血清または血漿における発現レベルを評価することで十分であると考えられる。もう一回の用量を投与するかまたは個体に投与される組成物の量を変えるかどうかについての決定は、少なくとも部分的には、発現レベルに基づきうる。

【００６３】

接種物に関係する場合の「単位用量」という用語は、各単位が必要とされる希釈剤に結合して所望の効果を生じるために計算された、活性物質(例えば、核酸、ウイルス貯蔵物または宿主細胞)の所定の量を含む、哺乳動物のための単位投薬量として適する、物理的に別々の単位を指す。細胞または動物へ投与されうるウイルス貯蔵物の力価は、適用および送達の型(例えば、インビボまたはエキソビボ)に依存するものである。ウイルス貯蔵物は、遠心分離のような方法を用いて濃縮されうる。エキソビボで投与されうる力価は、好ましくは、0.001感染単位/細胞～1感染単位/細胞の範囲である。ウイルス貯蔵物を生成するもう一つの方法は、標的細胞と共にウイルスを発現する安定的な細胞系を共培養することである。この方法は、細胞をより長い時間に渡って感染させることができ、それらがベクターの多数のコピーに感染する可能性をもつため、伝統的なレトロウイルスベクターを使用する場合、より良好な結果を達成するために用いられた。

【００６４】

エキソビボで形質導入またはトランスフェクションされた核酸構築物、ベクター、ベクター系、ウイルス貯蔵物、または細胞のインビボでの投与について、用量は、高い方の用量が容認できない副作用の発生により制限される、用量段階的増大により決定されるべきである。予備の開始用量は、当技術分野において公知の方法により、動物モデルにおいてレンチウイルスベクターを使用する実験から推定されうる、または既知のレトロウイルスの(例えば、アデノウイルスの)用量との比較から外挿されうる。一般的に、最初は少ない投薬量を用い、必要ならば、その環境下での最適効果が達せられるまで少しずつ増加させる。例示的な投薬量は、10^8粒子～約5×10^{15}粒子の範囲内である。

【００６５】

接種物は典型的には、水性薬学的組成物を形成するように、食塩水、リン酸緩衝食塩水などの生理学的に許容される担体中の溶液として調製される。

【００６６】

本発明の薬剤は、一般的に、それらのための生理学的に許容される担体または媒体と共に投与される。生理学的に許容される担体は、投与に対して有害な肉体的反応を引き起こさないもの、および化合物の薬学的または治療的有効量を送達しうる活性を保持するのに十分な核酸を溶解できるものである。本発明の薬剤の薬学的または治療的有効量および投与の方法は、個々の患者、治療しようとしている徴候、および当業者にとって明らかな他の基準に基づき異なりうる。本発明の核酸の治療的有効量は、有意な副作用を引き起こすことなく治療しようとしている状態の有害作用の重症度、範囲もしくは持続期間を防ぐか、または弱めるのに十分なものである。特定の適用に有用な投与の経路は、当業者にとって明らかである。

【００６７】

本発明の薬剤の投与の経路は、限定されるものではないが、非経口の、患部への直接的

注射を含む。投与の非経口経路は、限定されるものではないが、静脈内、筋肉内、腹膜内および皮下を含む。本発明の薬剤の投与の経路は、典型的には非経口であり、好ましくは、骨髄内、CSF筋肉内、皮下、皮内、眼内、頭蓋内、鼻腔内などである。例えば、処方および投与経路の例として、国際公開公報第99/04026号を参照されたい。

【００６８】

本発明は、限定されるものではないが、薬学的に許容される滅菌等張液を含む非経口経路に適した上記の薬剤の組成物を含む。そのような溶液は、限定されるものではないが、鼻、静脈内、筋肉内、腹膜内、皮下または関節もしくは他の領域への直接的注射のための、食塩水およびリン酸緩衝食塩水を含む。

【００６９】

本発明の薬剤をレシピエント哺乳動物、好ましくは霊長類、最も好ましくはヒトへ供給するにおいて、投与される用量は、哺乳動物の年齢、体重、身長、性別、一般的な医学的状態、以前の病歴などのような要素に依存して異なるものである。

【００７０】

本発明の薬学的組成物の投与は、「予防」または「治療」目的のどちらのためにでもありうる。予防的に供給される場合、組成物は、任意の症状に先立って供給される。組成物の予防的投与は、治療しようとしている状態の任意の続いて起こる有害作用(症状の重症度、持続期間、または範囲を含む)を防ぐかまたは改善する役割を果たす。治療的に供給される場合、組成物は、治療されることになっている状態の症状の始まりの時点に(またはすぐ後に)供給される。

【００７１】

すべての治療的、予防的および診断的使用のために、本発明の薬剤の1つまたは複数、加えて抗体および他の必要な試薬ならびに適切な装置および付属品が、すぐに利用可能でかつ容易に使用されるようにキットの形で提供されうる。

【００７２】

免疫アッセイが含まれる所において、そのようなキットは、標的分子に特異的な抗体のような受容体が結合することになる膜(例えば、ニトロセルロース)、ビーズ、球、試験管、棒などのような固体支持体を含みうる。そのようなキットはまた、標識抗体のような第二の受容体を含む。そのようなキットは、毒素を検出するためのサンドイッチアッセイのために使用されうる。競合的アッセイのためのキットもまた、構想される。

【００７３】

VI. 産業的適用

本発明の変異した遺伝子は、本来の宿主細胞もしくは生物体または異なる細胞もしくは生物体において発現しうる。変異した遺伝子は、当技術分野においてよく知られた方法により、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスまたはミニ染色体のようなベクターへ導入されて、宿主細胞または生物体へ挿入されうる。一般的に、変異した遺伝子またはこれらの変異した遺伝子を含む構築物は、哺乳動物細胞(例えば、ヒト細胞(例えば、HeLa)、サル細胞(例えば、Cos)、ウサギ細胞(例えば、ウサギ網状赤血球)、ラット細胞、ハムスター細胞(例えば、CHOおよびベビーハムスター腎臓細胞)またはマウス細胞(例えば、L細胞))、植物細胞、酵母細胞、昆虫細胞または細菌細胞(例えば、大腸菌)を含む、任意の細胞、真核細胞または原核細胞のどちらにおいても利用されうる。これらの変異した遺伝子をクローニングおよび/または発現させるために利用されうるベクターは、変異した遺伝子が複製されるおよび/もしくは発現することが望ましい宿主細胞において、変異した遺伝子を複製するならびに/または発現させる能力があるベクターである。宿主細胞の様々な型について適切なベクターの例として、例えば、F. Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience(1992)、およびSambrookら、(1989)を参照されたい。そのような遺伝子についての本来のプロモーターは、その遺伝子が挿入される宿主と適合性のある強いプロモーターに取って代わられうる。これらのプロモーターは誘導性でありうる。これらの変異した遺伝子を含む宿主細胞は、酵素調製、薬剤、診断試薬、ワクチンおよび治療に有用な大量のタンパク質

を発現させるために使用されうる。

【００７４】

変異した遺伝子または変異した遺伝子を含む構築物はまた、インビボまたはインビトロの遺伝子治療のために使用されうる。例えば、本発明の変異した遺伝子は、インサイチューでmRNAを生成し、最終的に発現するタンパク質の量を増加させる。そのような遺伝子は、ウイルスの遺伝子および/または細胞の遺伝子を含む。そのような変異した遺伝子は、例えば、ワクチンおよび/または遺伝子治療の開発において有用であると期待される。

【００７５】

変異したgag、envおよびpol遺伝子をコードする構築物を用いることにより生成された構築物および/またはタンパク質は、例えば、AIDSおよびAIDS関連疾患についての診断試薬、ワクチンの作製および治療において用いられうる。HIV-1gag遺伝子における抑制性/不安定性エレメントは、宿主において、低いウイルス生成の状態の確立に関与しうる。HIV-1および残りのレンチウイルスは、免疫系により一掃されない慢性活性感染症を引き起こす。レンチウイルスゲノムからの抑制性/不安定性配列エレメントの完全な除去が、結果として構成的発現を生じる可能性がある。これは、ウイルスが潜伏感染を確立し、かつ免疫系監視から逃れるのを防ぎうると考えられる。抑制性配列エレメントを除去することによる全gag/pol遺伝子の発現を増加させることにおける成功は、いずれの負のエレメントも含有しないレンチウイルスを作製することができることを示唆している。そのようなレンチウイルスは、弱毒ワクチンに向けての新規な方法を提供するものと考えられる。

【００７６】

例えば、高レベルのGagを発現させるベクターは、ヒトにおける発現後、免疫療法および免疫予防に用いられうる。そのようなベクターは、レトロウイルスベクターを含み、また例えば、Wolffら、Science 247:1465-1468(1990)、Wolffら、Human Molecular Genetics 1(6):363-369(1992)、およびUlmerら、Science 259:1745-1749(1993)に記載される技術を用いて、結果としてgagの効率的発現を生じる、筋肉細胞または他の受容性細胞へのDNAの直接的注射も含む。さらにgag構築物は、ヒトへの導入後、HIV発現のトランスドミナントな抑制において用いられうると考えられる。この適用について、例えば、Tronoら、Cell 59:113-120(1989)に記載されているように、例えば、高レベルの$p55^{gag}$もしくは$p37^{gag}$を発現させる適切なベクターまたはDNA分子が、トランスドミナントgag変異体を生じるように改変されると考えられる。ベクターはヒトへ導入され、結果としてgagトランスドミナントな抑制の機構および生成されたgagタンパク質による免疫刺激の機構の結合による、HIV生成の抑制を生じるものと考えられる。加えて、本発明のgag構築物は、レンチウイルスgagタンパク質の発現に基づく新規なレトロウイルスベクターの作製に用いられうると考えられる。レンチウイルスは、非分裂細胞にターゲットしかつ効率的な感染を可能にしうる特有の特徴をもつ。類似した適用が高レベルのenvを発現させるベクターについて期待される。

【００７７】

SIVにおける類似した抑制性/不安定性エレメントの同定より、このウイルスはこれらの仮説を試験するのに都合の良いモデルであることが示されている。同様に改変されたSIVは、感染性HIVの発生へ導くであろう再編成事象の可能性をさらに最小化する試みにおいて、HIVの代わりに用いられうるものと考えられる。

【００７８】

以下の実施例は、本発明のある特定の態様を例証するが、決してその範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。ある特定の改変および変異は、前記の開示および以下の実施例の教示から当業者にとって明らかであり、これらは、本発明の意図および範囲に含まれるものとする。

【００７９】

実施例1

Rev非依存性HIV-1 Gag/Pol分子クローン

図1は、Rev非依存性HIV-1 gag/pol分子クローンのDNA配列を示す。示されるこのDNA配

列は、HIV-1の完全なGagおよびPolをコードし、プロモーターへ機能的に連結される場合、Rev非依存性様式で発現することができる。Rev非依存性gag配列は、米国特許第6,174,666号、第5,972,596号および第5,965,726号に記載され、Rev非依存性pol配列は、それらの特許に記載される方法を用いて抑制性/不安定性配列を除去することにより作製された。伝える所によれば、ヒト細胞のためにコドンの利用を最適化することにより、Rev非依存性gag配列が作製された(例えば、国際公開公報第98/34640号を参照されたい)。

【００８０】

図2は、野生型およびpCMVgagpolBNkanにおける変異型pol領域の、配列のアラインメントを示す。図の位置#1は、プラスミドpCMVgagpolBNkanにおける2641位である。

【００８１】

gag、polおよびenv領域におけるINSの除去は、HIV-1のRev制御因子の非存在下において高レベルの標準HIV-1構造タンパク質の発現を可能にする。

【００８２】

実施例2

Rev非依存性SIV Gag分子クローン

図3は、Rev非依存性SIV gag分子クローン、SIVgagDXのDNA配列を示す。図4は、野生型(WT)配列および変異体(SIVgagDX)配列の比較を示す。野生型SIV配列は、サル(マカーク)免疫不全ウイルス分離239、クローンλsiv 239-1(GenBankアクセッション番号M33262)由来である。

【００８３】

実施例3

Rev非依存性SIV Env分子クローン

いずれのSIVまたはHIV制御因子にも依存せず発現する能力がある変異したレンチウイルスのenv遺伝子配列を含むベクターの例である、「envコード」ベクターCMVkan/R-R-SIVgp160CTEの模式図を図16に示し、DNA配列は図17に示す。「CMV」は、サイトメガロウイルスプロモーターを表す；「SRV-CTE」は、サルレトロウイルス1型の構成的輸送エレメント(CTE)を表す；「全停止」は、すべての3つの読み枠において翻訳停止を与える配列を表す；「BGHターミネーター」は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを表す。表示されているSRV-CTEの代わりに他の転写後制御エレメントを使用してもよく、例えば、1999年12月2日に国際公開公報第99/61596号として公表された(および参照として本明細書に組み入れられている)、1999年5月22日に出願されたPavlakisおよびNappi、PCT/US99/11082により記載されているものである。

【００８４】

上ですでに言及されているように、ベクターが$CD4^+$T細胞を感染させることが望ましい場合には、レンチウイルスのenv遺伝子をコードするそのようなベクターが使用されうる。また、上ですでに言及されているように、CTEエレメント(すなわち、ベクターCMVkan/R-R-SIVgp160CTEの場合におけるSRV-CTEエレメント)は、CTEおよびHIV RRE/Revに取って代わることができるPavlakis-Nappiエレメントのような、別の転写後制御エレメントに置換されうる。1999年12月2日に国際公開公報第99/61596号として公表された(および参照として本明細書に組み入れられている)、1999年5月22日に出願されたPavlakisおよびNappi、PCT/US99/11082を参照されたい。

【００８５】

実施例4

レンチウイルスのベクター系

図5は、使用されうるパッケージング構築物および3つの異なる転移ベクターを含む、本明細書に例示されるRev非依存性レンチウイルスのベクター系の予備的バージョンのいくつかの構成要素の概略図である。本明細書に例示されるレンチウイルス系において、パッケージング構築物はまた、カナマイシン耐性についての遺伝子を含む。本明細書に例示されるレンチウイルス系はまた、図5に示されているベクターpHCMV-Gを含む。

【００８６】

図5に示されるパッケージング構築物において、「CMV」はサイトメガロウイルスプロモーターを表し、「Gag」はビリオンコアの構成要素を生成するgag遺伝子を表し、「Pro」は「プロテアーゼ」を表し、「RT」は「逆転写酵素」を表し、「Int」は「インテグラーゼ」を表し、かつ「BGHポリ(A)」はウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを表す。プロテアーゼ、逆転写酵素およびインテグラーゼ遺伝子は、「pol」遺伝子を構成する。転移構築物1において、「LTR」はHIVプロモーターを含むHIV「末端反復配列」を表し、「mSD」はRNA転写物のスプライシングが起こらないように構築物に存在している「変異したスプライス供与部位」を表し；「Ψ」はキャプシド形成シグナルを表し；「wGA」はキャプシド形成に必要であると考えられる配列を含む野生型gag遺伝子の部分を表し；「X」はこの遺伝子の翻訳が起こらないように一部分のgag遺伝子配列のATGコドンが変異していることを示し；「CMV」はサイトメガロウイルスプロモーターを表し、かつルシフェラーゼがレポーター遺伝子として用いられる。ルシフェラーゼは、対象となるいずれの遺伝子とも交換されうる。もう一つのHIV LTRが転移構築物1の3'末端に存在している。転移構築物1、2、または3のような構築物におけるこのLTRの、プロモーター-エンハンサー欠失型HIV LTRとの置換は、組み込み後のLTRの不活化へと導く。転移構築物2は、転移構築物1と類似しており、その違いは、gag遺伝子の野生型部分の代わりにgag遺伝子の変異した部分が用いられていることである。転移構築物3(pm2BCwCNluci)は、5'スプライス部位に異なる変異をもち、かつ変異したgag遺伝子の部分の翻訳が起こるように無傷のATGコドンを有する。転移構築物3はまた、5'LTRプロモーターの代わりに5'CMVプロモーターを有する。この構築物はHIV Tatタンパク質の存在に依存しないで発現する。LTRプロモーターから発現した転移構築物は、Tatタンパク質に部分的に依存している。293細胞において有意な発現は、Tatの非存在下で達成されうる。例えば、Valentinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:8886-8891(1988)を参照。

【００８７】

実施例5

パッケージング構築物pCMVgagpolBNkanの作製

図6は、パッケージング構築物pCMVgagpolBNKanの概略的地図を示す。ヌクレオチドの番号付けは、HXB2R配列(GenBankアクセッション番号K03455およびM38432)のものであり、+1が転写の開始点である。

【００８８】

HIV-1 gag/pol領域における配列は、すべてのINSを除去するために変異させた。Schneiderら、J Virol. 71:4892-4903(1997)および米国特許第6,174,666号、第5,972,596号および第5,965,726号に記載されている、polにおけるgagの最初からBsrGI部位までの断片、および断片KE[KpnI(3700)-EcoRI(4194)]は、以前に変異させた。

【００８９】

pCMVgagpolBNkanを作製するために、HIV-1 pol領域内の3つの断片を変異させた。それらは、断片BP[BsrGI(2207)-PflMI(3032)]、断片PK[PflMI(3032)-KpnI(3700)]および断片EN[EcoRI(4194)-NdeI(4668)]である。突然変異誘発は、Hoら、Gene 77:51-59(1989)により記載されている方法の改変版、およびDNAシャフリング(ZhaoおよびArnold、Nucl. Acid Res. 25(6)、1307-1308(1997))を用いて行われた。その3つの断片の完全配列にわたる16個のオリゴヌクレオチドが設計された。断片BPに対応した6個のオリゴ、断片PKに対応した6個、および断片ENに対応した4個(長さが130塩基から195塩基までの範囲であるオリゴヌクレオチド；20ヌクレオチドが重複している隣接オリゴ)。各断片は2段階で構築された：

1)PCR；反応は、50 μl最終容量において、各精製された大オリゴの10 pmol、各dNTPの0.2 mMおよび2.5 u pfu DNAポリメラーゼ酵素(Stratagene)を含有する標準pfu緩衝液で行われた。PCRプログラムは次のとおりであった：3分96℃、続いて、1分94℃、1分55℃、および1分 + 5秒/サイクル 72℃の50サイクル、72℃で7分で終了させた。PCR後、大オリゴヌクレオチドを構築された変異型断片から除去した。

2)第二段階は、各変異型断片の5'末端および3'末端に配置させた30 merプライマーで構築された産物を特異的に増幅することであった。構築されたPCR産物の1マイクロリットル

が、50 μl最終容量における各プライマー50 pmol、1×pfu緩衝液、各dNTPの0.2 mMおよび2.5 u pfu DNAポリメラーゼでの25サイクルのPCR反応において鋳型として使用された。PCRプログラムは次のとおりであった：3分96℃；30秒94℃、30秒55℃、45秒72℃の10サイクル、続いて、別の30秒94℃、30秒55℃、45秒 + 20秒/サイクル 72℃の14サイクル、および最後に7分72℃。このプログラムは、正しいサイズの単一PCR産物を供給する。増幅されたBP、PKおよびEN断片は、PCR-script(商標)Amp SK(+)クローニングキット(Stratagene)を用いるPCR-script(商標)へ個々にクローニングされた。クローンは、ランダムに選択されかつ配列決定された。Schneiderらにより以前に変異させた断片KEと共に正しいBP、PKおよびEN断片は、p55AM1-R5(Schneiderら、J. Virol. 71:4892-4903(1997)において以前に記載された)のBsrGI部位とKpnI部位との間にライゲーションして、完全に変異したgag/polORFを作製した。完全に変異したgag/polを含む新しいプラスミドは、pLTRgagpolBNと名付けられた。BNは、BsrGIとNdeI間の断片の改変を表す。変異したgag/polは、その後、サイトメガロウイルスの主要な後期プロモーター(GenBankアクセッション番号X17403)およびカナマイシン耐性遺伝子を含むCMVkanベクターへとクローニングされ、結果としてpCMVgagpolBNkanを生じた。プラスミドバックボーンは、Vical社により提供され、かつHartikkaら、Hum Gene Ther. 7:1205-1217(1996)に記載されているpVR1332由来である。

【００９０】

例えば、インビボで例として、DNA注射の場合において、良好な発現を提供するために異なるプラスミドバックボーンが使用されうることは理解される。

【００９１】

実施例6

転移ベクターpmBCwCNluciおよびpmBCmCNluciの構築

BssHII(257)とClaI(376)間のHIV-1配列BCは、主要なスプライス供与部位およびキャプシド形成シグナルを含む。6個のオリゴ(33塩基～46塩基)は、スプライス供与部位およびgagのAUG開始コドンに変異を導入するように設計された。BC断片は、pCMVgagpolBNの構築物に関する項に記載されているように構築、増幅かつ配列決定された。

【００９２】

変異型BC断片およびClaI(376)とNsi(793)間の野生型gagの断片をp55RRE(Schneiderら、J. Virol. 71:4892-4903(1997))のBssHII部位とNsi部位の間に置き、pmBCwCNを作製した。並行して、p55BM1-10SD+由来の変異型gagのClaI(376)部位とNsiI部位間の断片を用いてpmBCmCNを作製した。(p55BM1-10SD+は、Schneiderら(1997)に記載されているp55BM1-10に類似しているが、さらにgag上流に無傷のスプライス供与およびキャプシド形成部位を含む。)pmBCwCNおよびpmBCmCNにおける、gagの3'部分およびRREを含むNsiIとXhoI間の領域は、pHR'-CMVluci(D. Tronoからのベクター)由来のCMVプロモーターおよびルシフェラーゼ遺伝子を含むClaI-XhoI断片により置換され、pmBCwCNluciおよびpmBCmCNluci(図5において転移構築物1および転移構築物2として示され、それぞれ、図7および図8において模式的に描かれている)が作製された。これらのプラスミドの配列は、それぞれ、図10および図11に示されている。これらのプラスミドの異なるバージョンもまた、キャプシド形成部位、第一スプライス供与部位、およびイニシエーターgagAUGの領域における変化をもって、標準的方法により作製された。例えば、転移構築物pm2BCwCNluci(図5において転移構築物3として示されている)は、5'スプライス部位領域に異なる変異をもち、かつ無傷のATGを有する。転移構築物1および2(mBCwCN frag)、転移構築物3(m2BCwCN frag)、HXB2ならびにNL43のBssHII-ClaI領域における配列の比較は、図12に示されている。

【００９３】

実施例7

ウイルス粒子の調製

レンチウイルス粒子は、3つのプラスミド：pCMVgagpolBNkan、pmBCwCNluciまたはpmBCmCNluci(転移ベクター)、およびpHCMV-G(Yeeら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:9564-9568(1994)エンベロープVSV-G(水疱性口内炎ウイルスの糖タンパク質)をコードするプラスミド)の組み合わせを用いて、293ヒト腎臓細胞の一過性共トランスフェクションにより

生成された。

【００９４】

トランスフェクションの前日、293細胞を60 mmのプレート上に10^6細胞/プレートの密度で蒔いた。プラスミドDNAは、以下の割合でCa-リン酸沈殿法によりトランスフェクションさせた：3 μg パッケージング構築物、6 μg 転移構築物および100 ng VSV-Gコード構築物、pHCMV-G。[LTRプロモーターは、Tatの非存在下で、効率が中程度に減少して293細胞に発現しうることに留意されたい。転移構築物は、CMV(例えば、図5における転移構築物3を参照)またはmRNA開始部位がLTR R領域の最初にあるような様式における他のプロモーターによる、LTRプロモーターの交換後に完全にTat非依存性でありうる。] ウイルス粒子の調製のための本実験において、Tat発現プラスミドの500 ngがトランスフェクションに含まれた。

【００９５】

トランスフェクションの翌日、細胞を洗浄し、上清を収集する前に、さらに48時間、DMEM培地に維持した。いずれの浮遊細胞も除去するために上清を1,200 rpmで7分間、回転させた。pCMVgagpolBNkanは、細胞から効率的に放出される高レベルのGagタンパク質を生成し(図13)、また、完全HIV-1の発現において見出されるものと類似した逆転写酵素のレベルにより判断される、高レベルの機能しうるPolを生成する(図14)。

【００９６】

293トランスフェクションされた細胞からの上清は、いくつかのヒト細胞系(293、ジャーカット(Jurkat)、U937)および非分裂ヒト初代マクロファージを形質導入するために使用された。

【００９７】

実施例8

細胞形質導入

形質導入は、レトロウイルスベクターを含む上清の1 ml～2 mlと共に標的細胞を37℃で3時間～4時間、インキュベートすることにより行われた。上清に存在するレトロウイルスベクターの量は、p24含有量(ELISAにより測定される)により規準化された。p24 gagタンパク質の等量を細胞の感染に使用した。このようにして、異なる調製の生成における差異を最小化した。

【００９８】

形質導入のために使用されるマクロファージは、プラスチックへの付着により健康な供与者の末梢血から単離された。細胞をRPMI + 20% ウシ胎児血清(FCS) + 10% ヒト血清(HS)において培養した。1週間後、非付着細胞をPBSで洗い落とし、マクロファージをヒト血清の非存在下で、さらに1週間～2週間、培養し続けた。形質導入前に、細胞をPBSで2回～4回、洗浄した。

【００９９】

形質導入の48時間(初代マクロファージについては7日間)後、細胞を収集し、形質導入効率は、培養物からの細胞抽出物におけるルシフェラーゼ活性を測定することにより測定された。293、ジャーカット、U937および初代マクロファージにおける形質導入実験の結果は図15A～図15Dに示されている。これらの結果は、Rev非依存性gag-HIV-1基盤レトロウイルスベクターが(A)293細胞、(B)ヒトリンパ球様細胞、(C)ヒト骨髄細胞(U937)、ならびに(D)初代ヒトマクロファージのような、非分裂細胞において高形質導入効率を示すことを実証している。

【０１００】

実施例9

免疫予防または免疫療法における本発明の核酸の使用

出生後の遺伝子治療において、身体から標的細胞を取り出し、それらを新しい遺伝情報をもつウイルスベクターに感染させ、その後、それらを身体へ再移植するような間接的手段により；またはDNAの製剤をリポソーム内にカプセル化する；ウイルスエンベロープ受容体タンパク質を含むタンパクリポソーム内にDNAを包括する；DNAをリン酸カルシウム共

沈殿させる；およびDNAをポリリシン-糖タンパク質担体複合体へカップリングさせるような直接的手段により、組織へ導入させた。さらに、リン酸カルシウム共沈澱物の形成があるまたはない場合の直接的肝臓内注射後のクローニングされたウイルスDNA配列のインビボでの感染力もまた記載されていた。安定性を増強するエレメントを含むmRNA配列はまた、陽イオン脂質小胞の使用で、アフリカツメガエル(Xenopus laevis)胚において効率的に翻訳されることが示された。例えば、J. A. Wolffら、Science 247:1465-1468(1990)、およびそこに引用された参照文献を参照されたい。

【０１０１】

最近、純粋なRNAまたはDNAの骨格筋への直接的注射が、結果として、筋肉細胞内での遺伝子の有意な発現を生じることも示された。J. A. Wolffら、Science 247:1465-1468(1990)。粒子加速による(N. -S. Yangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9568-9572(1990); S. R. Williamsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-2730(1991))またはウイルス形質導入によるような他の手段により、RNAまたはDNAを筋肉細胞へ導入されるように強いることもまた、DNAまたはRNAが安定的に維持されかつ発現することを可能にする。Wolffらに報告された実験において、RNAベクターまたはDNAベクターは、マウス骨格筋細胞、特に四頭筋の細胞において、レポーター遺伝子を発現させるために用いられた。タンパク質発現は容易に検出され、これらの効果のために特別の送達系を必要としなかった。注射液の組成および容量ならびに注入の方法が、記載されるプロトコールから改変された場合にもポリヌクレオチド発現が得られた。例えば、レポーター酵素活性は、低浸透圧、等浸透圧、および高浸透圧のショ糖溶液、Opti-MEM、または2 mM $CaCl_2$を含むショ糖溶液の10μl～100 μlで観察され、また10μl～100μlの注入が1分以内でなくポンプで20分を超えて行われた場合にも観察されることが報告された。

【０１０２】

レポーター遺伝子によりコードされるタンパク質由来の酵素活性はまた、RNAベクターまたはDNAベクターで注入された腹筋においても検出され、他の筋肉がポリヌクレオチドを取り上げかつ発現させることができることを示している。RNAベクターおよびDNAベクターで注入された他の組織(肝臓、脾臓、皮膚、肺、脳および血液)においても低量のレポーター酵素が検出された。筋内注射されたプラスミドDNAはまた、非ヒト霊長類の筋肉において安定的に発現することが実証された。S. Jiaoら、Hum. Gene Therapy 3:21-33(1992)。

【０１０３】

インサイチューでのヒト筋肉への遺伝子の直接的移入には、いくつかの潜在的な臨床的適用がありうることが提案された。筋肉は、筋肉が関与するものに加えて、筋肉が主としては関与しない疾患状態を改変すると考えられる導入遺伝子の異種性発現のために適した組織である可能性がある。例えば筋肉組織は、免疫できる、血液中に分泌されうる、または循環する毒性代謝物を一掃できるタンパク質の、異種性発現のために用いられうる。繰り返して接触されうるRNAおよび組織の使用は、通常の薬学的治療のようにしばしば投与される可逆型の遺伝子移入にとって有用であるものと考えられる。J. A. Wolffら、Science 247:1465-1468(1990)、およびS. Jiaoら、Hum. Gene Therapy 3:21-33(1992)を参照。

【０１０４】

J. A. Wolffら、前記により、抗原をコードする遺伝子の細胞内発現がワクチン開発に代わる方法を提供する可能性があることが提案された。この仮説は、BALB/cマウスの四頭筋へ注射されたインフルエンザA核タンパク質をコードするプラスミドDNAが、ウイルスの肺力価（lung titer）の減少、体重減少の抑制、および生存率の増加により測定されるように、結果としてインフルエンザA核タンパク質特異的細胞障害性Tリンパ球(CTL)を生成し、かつインフルエンザAウイルスの異種性系統によるその後の攻撃からの保護をもたらしたという最近の報告により裏付けられた。J. B. Ulmerら、Science 259:1745-1749(1993)。

【０１０５】

それゆえに、ウイルス抗原をコードするRNAベクターまたはDNAベクターの直接的注入は

、自己複製剤またはアジュバントの必要なしに免疫系への提示のためのウイルス抗原を産生し、結果として、抗原特異的CTLの発生およびウイルスの同一源または異種性の系統によるその後の攻撃からの保護を生じる、抗原の内因的発現のために用いられうる。

【０１０６】

マウスおよびヒトの両方におけるCTLは、保存された内部ウイルスタンパク質由来のエピトープを認識する能力があり、ウイルスに対する免疫応答において重要であると考えられる。保存されたウイルスタンパク質由来のエピトープの認識により、CTLは交雑系統保護を提供しうる。保存されたウイルス抗原に特異的なCTLは、一般的に系統特異的である抗体と対照的に、ウイルスの異なる系統に応答できる。

【０１０７】

このように、ウイルス抗原をコードするRNAまたはDNAの直接的注入は、直接的なペプチド送達またはウイルスベクターのいくつかの制限を含まないという利点を有する。Ｊ．Ａ．Ulmerら、前記、およびその中の考察および参照文献を参照されたい。さらになお、DNAの注入後の発現したタンパク質に対する高力価の抗体の生成は、これが、保存されたまたは保存されていない抗原に向けて標的化される抗体に基づくワクチンを、保存された抗原に向けて標的化されるCTLワクチンと別々にまたは組み合わせてのいずれかで生成する、容易かつ効果的な手段でありうることを示している。これらはまた、組み合わせワクチンの生成のために、伝統的なペプチドワクチンと共に用いられうる。さらになお、タンパク質発現はDNA注入後維持されるため、B細胞およびT細胞の記憶の持続を増強することができ、それにより長持ちする体液性および細胞性免疫を生じる。例えば、Shriverら(1996)は、Rev非依存性HIV gagベクターおよびHIV gagベクターを含む、ワクチン組成物で処理されたマウスおよび非ヒト霊長類における、長持ちするT細胞応答を記載し、Helら、Ｊ．Immunol.，167:7180-7181(2001)は、参照として本明細書に明確に組み入れられているが、Rev非依存性発現SIV gagベクターおよびSIV envベクター、ならびにナイーブのマカークザルとDNA-SIVおよびNYVAC-SIV初回抗原刺激/追加免疫療法により感染したマカークザルの両方における、SIV特異的$CD4^+$および$CD8^+$T細胞応答のそれらの増強を記載している。

【０１０８】

1．HIV-1に対する免疫予防または免疫療法のためのベクター

変異したgag、polまたはgag/pol配列は、CMVもしくはRSVのような強い構成的プロモーター、またはHIV-1のような誘導性プロモーターを用いる発現ベクターに挿入される。

【０１０９】

ベクターは、ヒト組織への直接的DNAの注射；培養中の初代ヒト細胞(エキソビボ)へのDNAのエレクトロポレーションもしくはトランスフェクション、望ましい性質についての細胞の選択およびそのような細胞の身体への再導入(この選択は、適切に前もって選ばれたゲノム領域への入ってくるDNAの、成功した相同的組換えについてでありうる)；gag遺伝子を含む感染性粒子の生成、エキソビボでの細胞の感染およびそのような細胞の身体への再導入；またはインビボでのその粒子による直接的感染のようないくつかの技術の一つを用いて、薬学的に許容される担体中において動物またはヒトへ導入される。

【０１１０】

実質的なレベルのタンパク質が生成され、免疫系の効率的な刺激がもたらされる。

【０１１１】

本発明のもう一つの態様において、記載される構築物は、ウイルス粒子形成に関与することができない、変異したGagタンパク質を発現させるように改変される。そのようなGagタンパク質は、野生型Gagタンパク質と同じ程度まで免疫系を刺激するが、HIV-1生成の増加に寄与する能力がないことが予測される。この改変は、結果として、免疫療法および免疫予防のためのより安全なベクターを生じる。

【０１１２】

実施例10

トランスドミナントな(TD)-TD-Gag-TD RevまたはTd Gag-Pro-TD Rev遺伝子を用いるHIV-1発現の抑制

DNAの直接的注入またはレトロウイルス以外のベクターの使用は、細胞においてトランスドミナントなGag(TDgag)の高レベルを恒常的に可能にする。加えて、B. K. Felberら、Science 239:184-187(1988)によりとられた方法は、レトロウイルスベクターによるヒト細胞の感染を妨げない、HIV-1 TDgagをコードするレトロウイルスベクター、例えば、マウス由来レトロウイルスベクターの作製を可能にする。Felberら、前記の方法において、プロモーターおよびポリAシグナルの一部を含むHIV-1 LTRの断片は、マウスレトロウイルスベクター内に有害な作用無しに組み入れられ、転写的にサイレントなままでありうることが示された。Tatタンパク質の存在は、HIV-1 LTRからの転写を刺激し、結果としてHIV-1 LTRに連結された遺伝子の高レベルな発現をもたらした。

【０１１３】

ハイブリッドTDgag-TDRevまたはTDgag-pro-TDRev遺伝子の作製およびヒト細胞における発現ベクターの導入は、HIV-1発現を抑制する2つのタンパク質の、効率的生成を可能にする。同じベクター内での2つのTDタンパク質の組み込みは、ウイルス複製へのそれぞれの効果を増幅することが予測される。B. K. Felberら、前記、に記載されるものと類似した状況でのHIV-1プロモーターの使用は、感染した細胞において、高レベルのGagおよびRev発現を可能にする。感染の非存在下において、発現は実質的により低い。または、他の強いプロモーターの使用は、そのようなタンパク質の構成的発現を可能にする。感染性ウイルスの生成に関与することができない、それどころか、そのような生成に拮抗する、高度に免疫原性のgagの生成のために、この方法は大いに有益でありうる。これは、AIDSに対する効率的な免疫予防または免疫療法の方法として用いられうる。

【０１１４】

トランスドミナントな変異体の例は、Tronoら、Cell 59:112-120(1989)に記載されている。

【０１１５】

1. トランスドミナントなGag変異体タンパク質をコードする構築物の作製

例えば、Tronoら、前記、に記載されているような、トランスドミナントな変異体として働くことができるGag変異体タンパク質は、高い恒常的レベルでトランスドミナントなGagタンパク質を生成するようにベクターp37M1-10DまたはP55M1-13P0を改変することにより産生される。

【０１１６】

トランスドミナントなGagタンパク質は、免疫系を刺激し、かつ感染性ウイルスの生成を抑制するが、感染性ウイルスの生成に寄与しない。

【０１１７】

この方法の追加された安全性により、この方法はヒトへの適用としてより許容できるものになっている。

【０１１８】

VII. 参照文献

U.S. Patent No. 6,174,666 issued January 16, 2001 (Pavlakis and Felber)

U.S. Patent No. 5,972,596 issued October 26, 1999 (Pavlakis and Felber)

U.S. Patent No. 5,965,726 issued October 12, 1999 (Pavlakis and Felber)

WO 98/17816 Lentiviral Vectors (Kingsman & Kingsman) (Oxford Biomedica Ltd)

WO 98/34640 (Shiver, J.W., Davies, M-E M., Freed, D.C., Liu, M.A. and Perry,H.C. - Merck & Co., Inc.)

WO 98/46083 Use of Lentiviral Vectors for Antigen Presentation in Dendritic Cells (Wong-Staal, Li; Kan-Mitchell) (Univ. of Cal.)

WO 99/04026 Lentiviral Vectors (Chen, Gasmi, Yee and Jolly) (Chiron)

WO 99/15641 Non-Primate Lentiviral Vectors and Packaging Systems (Poeschia, Looney and Wong-Staal) (Univ. of Cal.)

WO 99/30742 Therapeutic Use of Lentiviral Vectors (Naldini and Song)

WO 99/51754 Infectious Pseudotyped Lentiviral Vectors Lacking Matrix Protein and Uses Thereof (Goettlinger, Reil and Bukovsky) (Dana Farber Cancer Inst Inc)

PCT/US99/11082 Post-Transcriptional Regulatory Elements and Uses Thereof (Pavlakis and Nappi), filed May 22, 1999, published as WO 99/61596 on December 2, 1999

Akkina, R.K., Walton, R.W., Chen, M.L., Li, Q-X, Planelles, V and Chen, I.S.Y., "High-efficiency gene transfer into $CD34^+$ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G," *J. Virol.* 70:2581-2585 (1996)

Amado, R.G. & Chen, I.S.Y., "Letinviral vectors—the promise of gene therapy within reach?," *Science* 285:674-676 (July 1999)

Donahue, R.E., An, D.S., Wersto, R.P., Agricola, B.A., Metzger, M.E. and Chen, I.S.Y., "Transplantation of immunoselected $CD34^+$ cells transduced with a EGFP-expressing lentiviral vector in non-human primates," *Blood* 92(suppl. 1):383b, Abstract #4648.5 (1998)

Fox, J.L., "Researchers wary of fear-based ban on lentivirus gene therapy," *Nature Biotechnology* 16:407-408 (1998)

Goldman, M.J., Lee, P.S., Yang, J.S. & Wilson, J.M., "Lentiviral vectors for gene therapy of cystic fibrosis," *Hum Gene Ther.* 8, 2261-2268 (1997)

Hartikka J., Sawdey M., Cornefert-Jensen F., Margalith M., Barnhart K., Nolasco M., Vahlsing H.L., Meek J., Marquet M., Hobart P., Norman J., and Manthorpe M., "An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle," *Hum Gene Ther.* 7:1205-17 (1996)

Hel Z., Tsai W.P., Thornton A., Nacsa J., Giuliani L., Tryniszewska E., Poudyal M., Venzon D., Wang X., Altman J., Watkins D.I., Lu W., von Gegerfelt A., Felber B.K., Tartaglia J., Pavlakis G.N., and Franchini G.,

"Potentiation of simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T cell responses by a DNA-SIV and NYVAC-SIV prime/boost regimen," *J. Immunol.* 167(12):7180-91 (2001)

Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D.A., Gage, F.H. & Verma, I.M., "Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors," *Nat Genet.* 17, 314-317 (1997)

Kafri, T., van Praag, H., Ouyang, L., Gage, F.G. and Verma, I.M., "A packaging cell line for lentivirus vectors," *J. Virol.* 73:576-584 (1999)

Kim, V.N., Mitrophanous, K., Kingsman, S.M., and Kingsman, A.J., "Minimal Requirement for a Lentivirus Vector Based on Human Immunodeficiency Virus Type 1", *J. Virol.* 72:811-816 (1998)

Klimatcheva, E., Rosenblatt, JD. and Planelles, V., "Lentiviral vectors and gene therapy," *Frontiers in Bioscience* 4:d481-496 (June 1999)

Miyoshi, H., Takahashi, M., Gage, F.H. & Verma, I.M., "Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector," *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 10319-10323 (1997)

Miyoshi, H., Blomer,U., Takahashi, M., Gage, F.H., and Verma, I.M., "Development of self-inactivating lentivirus vector," ," *J Virol.* 72:8150-8157 (1998)

Miyoshi, H., Smith, K.A., Mosier, D.E., Verma, I.M. and Torbett, B.E., "Transduction of human $CD34^+$ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors," *Science* 283:682-686 (1999)

Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M. & Trono, D., "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector," *Science*. 272, 263-267 (1996)

Naviaux, R.K, Costanzi, E., Haas, M. and Verma, I., "The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses," *J. Virol.* 70:5701-5705 (1996)

Pavlakis, G.N., Schneider, R.; Song, S., Nasioulas, G., Zolotukhin, A., Felber, B.K., Trauger, R., Cox, J., and Manthorpe, M., "Use of simple Rev-independent HIV-1 gag expression vectors in gene therapy and gene vaccine applications," *Natl Conf Hum Retroviruses Relat Infect (2nd),* Jan 29-Feb 2 (1995); 91.

Poeschla, E.M., Wong-Staal, F. & Looney, D.J., "Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors," *Nature Med.* 4:354-357 (1998)

Qiu, J. T., R. Song, M. Dettenhofer, C. Tian, T. August, B. K. Felber, G. N. Pavlakis and X. F. Yu, "Evaluation of novel human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA vaccines for protein expression in mammalian cells and induction of immune responses," *J Virol.* 73: 9145-52 (Nov. 1999)

Reynolds, P.N. and Curiel, D.T., "Viral vectors show promise in Colorado," *Nature Biotechnology* 16:422-423 (1998)

Schneider, R., Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, B.K., and Pavlakis, G.N., Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation, "*J. Virol.* 71:4892-4903 (1997)

Schwartz, S., M. Campbell, G. Nasioulas, J. Harrison, B. K. Felber and G. N. Pavlakis, "Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type-1 results in Rev-independent *gag* expression," *J. Virol.* 66:7176-7182 (1992)

Shiver, J.W., Yasutomi, Y., Free, D.C., Davies, M.-E., Perry, H.C., Pavlakis, G.N., Letvin, N.L., and Liu, M.A., "DNA Vaccine-Mediated Cellular Immunity Against HIV-1 *gag* and *env*", presented at the Conference on Advances in AIDS Vaccine Development: 8th Annual Meeting of the National Cooperative Vaccine Development Groups for AIDS (NCVDGs) from February 11-15, 1996.

Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ransdale, E.E., Griffiths, J.C., Romano, G., Kingsman, S.M. and Kingsman, A.J., "A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors," *Nuc. Acids Res.* 23:628-633 (1995).

Srinivasakumar, N., Chazal, N., Helga-Maria, C., Prasad, S., Hammarskjöld, M.-L., and Rekosh, D., "The Effect of Viral Regulatory Protein Expression on Gene Delivery by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vectors Produced in Stable Packaging Cell Lines," *J. Virol.*, 71:5841-5848 (1997)

Sutton, R.E., Wu, H.T., Rigg, R., Bohnlein, E. & Brown, P.O., "Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells," *J. Virol.* 72, 5781-5788 (1998)

Tabernero, C., A. S. Zolotukhin, J. Bear, R. Schneider, G. Karsenty and B. K. Felber, "Identification of an RNA sequence within an intracisternal-A particle element able to replace Rev-mediated posttranscriptional regulation of human immunodeficiency virus type 1," J Virol. 71:95-101 (1997). . (see also my email message)

Takahashi, M.; Miyoshi, H.; Verma, I.M.; Gage, F.H., "Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer," *J. Virol.* 73: 7812-7816 (Sept. 1999)

Uchida, N., Sutton, R.E., Friera, A.M., He, D., Reitsma, M.J., Chang, W.C., Veres, G., Scollay, R. & Weissman, I.L., "HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells," *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 95, 11939-11944 (1998)

Valentin, A., W. Lu, M. Rosati, R. Schneider, J. Albert, A. Karlsson and G. N. Pavlakis. "Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: Implications for viral phenotypic switch and disease progression," *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 95: 8886-91 (1998)

White, S.M., Renda, M, Nam, N-Y, Klimatcheva, E., Hu, Y, Fisk, J, Halterman, M, Rimel, B.J., Federoff, H, Pandya, S., Rosenblatt, J.D. and Planelles, V, "Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements," *J. Virol.* 73:2832-2840 (Apr. 1999)

Wolff, J.A. and Trubetskoy, V.S., "The Cambrian period of nonviral gene delivery," *Nature Biotechnology* 16:421-422 (1998)

Zolotukhin, J., Valentin, A., Pavlakis, G. N. and Felber, B. K. "Continuous propagation of RRE(-)and Rev(-)RRE(-) human immunodeficiency virus type 1 molecular clones containing a *cis*-acting element of Simian retrovirus type 1 in human peripheral blood lymphocytes," *J. Virol.* 68:7944-7952 (1994)

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L. and Trono, D., "Multiply Attenuated Lentiviral Vector Achieves Efficient Gene-Delivery In Vivo", *Nature Biotechnology* 15:871-875 (1997)

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L. & Trono, D., "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery," *J. Virol.* 72:9873-9880 (1998)

【０１１９】

抑制性/不安定性配列を含むmRNAをコードするいずれの遺伝子も、本発明の例示された方法またはそれらの機能的に等価であるものに従って改変されうることを、当業者は認識している。

【０１２０】
遺伝子工学、ウイルス学、免疫学、医学の分野、および関連分野における当業者にとって明らかである、本発明を行うための上記の様式の改変は、特許請求の範囲内であるものとする。
【０１２１】
本出願を通して上に引用されたあらゆる参照文献は、参照として本明細書により完全に組み入れられている。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The Government of the United States of America, as represented by the Secretary, Department of Health and Human Services
<120> Molecular Clones With Mutated HIV gag/pol, SIV gag and SIV env Genes
<130> TO-A0324
<140> JP 2003-502211
<141> 2002-05-31
<150> US 09/872,733
<151> 2001-06-01
<160> 19
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 4338
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:mutated HIV-1 gag/pol molecular clone
<400> 1
atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgatggga aaaaattcgg 60
ttaaggccag ggggaaagaa gtacaagcta aagcacatcg tatgggcaag cagggagcta 120
gaacgattcg cagttaatcc tggcctgtta gaaacatcag aaggctgtag acaaatactg 180
ggacagctac aaccatccct tcagacagga tcagaggagc ttcgatcact atacaacaca 240
gtagcaaccc tctattgtgt gcaccagcgg atcgagatca aggacaccaa ggaagcttta 300
gacaagatag aggaagagca aaacaagtcc aagaagaagg cccagcaggc agcagctgac 360
acaggacaca gcaatcaggt cagccaaaat taccctatag tgcagaacat ccaggggcaa 420
atggtacatc aggccatatc acctagaact ttaaatgcat gggtaaaagt agtagaagag 480
aaggctttca gcccagaagt gatacccatg ttttcagcat tatcagaagg agccacccca 540
caggacctga acacgatgtt gaacaccgtg gggggacatc aagcagccat gcaaatgtta 600
aaagagacca tcaatgagga agctgcagaa tgggatagag tgcatccagt gcatgcaggg 660
cctattgcac caggccagat gagagaacca aggggaagtg acatagcagg aactactagt 720
acccttcagg aacaaatagg atggatgaca aataatccac ctatcccagt aggagagatc 780
tacaagaggt ggataatcct gggattgaac aagatcgtga ggatgtatag ccctaccagc 840
attctggaca taagacaagg accaaaggaa ccctttagag actatgtaga ccggttctat 900
aaaactctaa gagctgagca agcttcacag gaggtaaaaa attggatgac agaaaccttg 960
ttggtccaaa atgcgaaccc agattgtaag accatcctga aggctctcgg cccagcggct 1020
acactagaag aaatgatgac agcatgtcag ggagtaggag gacccggcca taaggcaaga 1080
gttttggccg aggcgatgag ccaggtgacg aactcggcga ccataatgat gcagagaggc 1140
aacttccgga accagcggaa gatcgtcaag tgcttcaatt gtggcaaaga agggcacacc 1200
gccaggaact gccgggcccc ccggaagaag ggctgttgga aatgtggaaa ggaaggacac 1260
caaatgaaag attgtactga gagacaggct aatttttag ggaagatctg gccttcctac 1320

aagggaaggc cagggaattt tcttcagagc agaccagagc caacagcccc accagaagag 1380
agcttcaggt ctggggtaga gacaacaact ccccctcaga agcaggagcc gatagacaag 1440
gaactgtatc ctttaacttc cctcagatca ctctttggca acgacccctc gtcacagtaa 1500
ggatcggggg gcaactcaag gaagcgctgc tcgatacagg agcagatgat acagtattag 1560
aagaaatgag tttgccagga agatggaaac caaaaatgat agggggggatc gggggcttca 1620
tcaaggtgag gcagtacgac cagatactca tagaaatctg tggacataaa gctataggta 1680
cagtattagt aggacctacc tacacctgtc aacataattg gaagaaatct gttgacccag 1740
atcggctgca ccttgaactt ccccatcagc cctattgaga cggtgcccgt gaagttgaag 1800
ccgggggatgg acggccccaa ggtcaagcaa tggccattga cgaaagagaa gatcaaggcc 1860
ttagtcgaaa tctgtacaga gatggagaag gaagggaaga tcagcaagat cgggcctgag 1920
aacccctaca acactccagt cttcgcaatc aagaagaagg acagtaccaa gtggagaaag 1980
ctggtggact tcagagagct gaacaagaga actcaggact tctgggaagt tcagctgggc 2040
atcccacatc ccgctgggtt gaagaagaag aagtcagtga cagtgctgga tgtgggtgat 2100
gcctacttct ccgttccctt ggacgaggac ttcaggaagt acactgcctt cacgatacct 2160
agcatcaaca acgagacacc aggcatccgc taccagtaca acgtgctgcc acagggatgg 2220
aagggatcac cagccatctt tcaaagcagc atgaccaaga tcctggagcc cttccgcaag 2280
caaaacccag acatcgtgat ctatcagtac atggacgacc tctacgtagg aagtgacctg 2340
gagatcgggg cagcacagga ccaagatcga ggagctgaga cagcatctgt tgaggtgggg 2400
actgaccaca ccagacaaga agcaccagaa ggaacctccc ttcctgtgga tgggctacga 2460
actgcatcct gacaagtgga cagtgcagcc catcgtgctg cctgagaagg acagctggac 2520
tgtgaacgac atacagaagc tcgtgggcaa gttgaactgg gcaagccaga tctacccagg 2580
catcaaagtt aggcagctgt gcaagctgct tcgaggaacc aaggcactga cagaagtgat 2640
cccactgaca gaggaagcag agctagaact ggcagagaac cgagagatcc tgaaggagcc 2700
agtacatgga gtgtactacg acccaagcaa ggacctgatc gcagagatcc agaagcaggg 2760
gcaaggccaa tggacctacc aaatctacca ggagcccttc aagaacctga agacaggcaa 2820
gtacgcaagg atgaggggtg cccacaccaa cgatgtgaag cagctgacag aggcagtgca 2880
gaagatcacc acagagagca tcgtgatctg gggcaagact cccaagttca agctgcccat 2940
acagaaggag acatgggaga catggtggac cgagtactgg caagccacct ggatccctga 3000
gtgggagttc gtgaacaccc ctcccttggt gaaactgtgg tatcagctgg agaaggaacc 3060
catcgtggga gcagagacct tctacgtgga tggggcagcc aacagggaga ccaagctggg 3120
caaggcaggc tacgtgacca accgaggacg acagaaagtg gtgaccctga ctgacaccac 3180
caaccagaag actgagctgc aagccatcta cctagctctg caagacagcg gactggaagt 3240
gaacatcgtg acagactcac agtacgcatg ggcatcatcc aagcacaacc agaccaatcc 3300
gagtcagagc tggtgaacca gatcatcgag cagctgatca agaaggagaa agtgtacctg 3360
gcatgggtac cagcacacaa aggaattgga ggaaatgaac aagtagataa attagtcagt 3420
gctgggatcc ggaaggtgct gttcctggac gggatcgata aggcccaaga tgaacatgag 3480
aagtaccact ccaactggcg cgctatggcc agcgacttca acctgccacc tgtagtagca 3540
aaagaaatag tagccagctg tgataaatgt cagctaaaag gagaagccat gcatggacaa 3600
gtagactgta gtccaggaat atggcagctg gactgcacgc acctggaggg gaaggtgatc 3660
ctggtagcag ttcatgtagc cagtggatat atagaagcag aagttatccc tgctgaaact 3720
gggcaggaaa cagcatattt tcttttaaaa ttagcaggaa gatggccagt aaaaacaata 3780
cacacggaca acggaagcaa cttcactggt gctacggtta aggccgcctg ttggtgggcg 3840
ggaatcaagc aggaatttgg aattccctac aatccccaat cgcaaggagt cgtggagagc 3900
atgaacaagg agctgaagaa gatcatcgga cagtgaggga tcaggctgag cacctgaaga 3960
cagcagtgca gatggcagtg ttcatccaca acttcaaaag aaaaggggggg attgggggggt 4020
acagtgcagg ggaaaggatc gtggacatca tcgccaccga catccaaacc aaggagctgc 4080
agaagcagat caccaagatc cagaacttcc gggtgtacta ccgcgacagc cgcaacccac 4140
tgtggaaggg accagcaaag ctcctctgga agggagaggg ggcagtggtg atccaggaca 4200
acagtgacat caaagtggtg ccaaggcgca aggccaagat catccgcgac tatggaaaac 4260
agatggcagg tgatgattgt gtggcaagta gacaggatga ggattagaac ctggaagagc 4320

ctggtgaagc accatatg 4338

<210> 2
<211> 2507
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:wild-type pol region in plasmid pCMVgagpolBNkan
<400> 2

tgtacagaga tggaaaagga agggaaaatt tcaaaaattg ggcctgaaaa tccatacaat 60
actccagtat ttgccataaa gaaaaaagac agtactaaat ggagaaaatt agtagatttc 120
agagaactta ataagagaac tcaagacttc tgggaagttc aattaggaat accacatccc 180
gcagggttaa aaaagaaaaa atcagtaaca gtactggatg tgggtgatgc atatttttca 240
gttcccttag atgaagactt caggaaatat actgcattta ccatacctag tataaacaat 300
gagacaccag ggattagata ccatacctag tataaacaat gagacaccag ggatttgata 360
tcagtacaat gtgcttccac agggatggaa aggatcacca gcaatattcc aaagtagcat 420
gacaaaaatc ttagagcctt ttagaaaaca aaatccagac atagttatct atcaatacat 480
ggatgatttg tatgtaggat ctgacttaga aatagggcag catagaacaa aaatagagga 540
gctgagacaa catctgttga ggtggggact taccacacca gacaaaaaac atcagaaaga 600
acctccattc ctttggatgg gttatgaact ccatcctgat aaatggacag tacagcctat 660
agtgctgcca gaaaaagaca gctggactgt caatgacata cagaagttag tggggaaatt 720
gaattgggca agtcagattt acccagggat taaagtaagg caattatgta aactccttag 780
aggaaccaaa gcactaacag aagtaatacc actaacagaa gaagcagagc tagaactggc 840
agaaaacaga gagattctaa aagaaccagt acatggagtg tattatgacc catcaaaaga 900
cttaatagca gaaatacaga agcaggggca aggccaatgg acatatcaaa tttatcaaga 960
gccatttaaa aatctgaaaa caggaaaata tgcaagaatg aggggtgccc acactaatga 1020
tgtaaaacaa ttaacagagg cagtgcaaaa aataaccaca gaaagcatag taatatgggg 1080
aaagactcct aaatttaaac tgcccataca aaaggaaaca tgggaaacat ggtggacaga 1140
gtattggcaa gccacctgga ttcctgagtg ggagtttgtt aatacccctc ctttagtgaa 1200
attatggtac cagttagaga aagaacccat agtaggagca gaaaccttct atgtagatgg 1260
ggcagctaac agggagacta aattaggaaa agcaggatat gttactaata gaggaagaca 1320
aaaagttgtc accctaactg acacaacaaa tcagaagact gagttacaag caatttatct 1380
agctttgcag gattcgggat tagaagtaaa catagtaaca gactcacaat atgcattagg 1440
aatcattcaa gcacaaccag atcaaagtga atcagagtta gtcaatcaaa taatagagca 1500
gttaataaaa aaggaaaagg tctatctggc atgggtacca gcacacaaag gaattggagg 1560
aaatgaacaa gtagataaat tagtcagtgc tggaatcagg aaagtactat ttttagatgg 1620
aatagataag gcccaagatg aacatgagaa atatcacagt aattggagag caatggctag 1680
tgattttaac ctgccacctg tagtagcaaa agaaatagta gccagctgtg ataaatgtca 1740
gctaaaagga gaagccatgc atggacaagt agactgtagt ccaggaatat ggcaactaga 1800
ttgtacacat ttagaaggaa aagttatcct ggtagcagtt catgtagcca gtggatatat 1860
agaagcagaa gttattccag cagaaacagg gcaggaaaca gcatattttc ttttaaaatt 1920
agcaggaaga tggccagtaa aaacaataca tacagacaat ggcagcaatt tcaccagtgc 1980
tacggttaag gccgcctgtt ggtgggcggg aatcaagcag gaatttggaa ttccctacaa 2040
tccccaaagt caaggagtag tagaatctat gaataaagaa ttaaagaaaa ttataggaca 2100
ggtaagagat caggctgaac atcttaagac agcagtacaa atggcagtat tcatccacaa 2160
ttttaaaaga aaaggggga ttgggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat 2220
agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttcg 2280
ggtttattac agggacagca gaaatccact ttggaaagga ccagcaaagc tcctctggaa 2340
aggtgaaggg gcagtagtaa tacaagataa tagtgacata aaagtagtgc caagaagaaa 2400
agcaaagatc attagggatt atggaaaaca gatggcaggt gatgattgtg tggcaagtag 2460

acaggatgag gattagaaca tggaaaagtt tagtaaaaca ccatatg 2507

<210> 3
<211> 2467
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:mutated pol region in plasmid pCMVgagpolBNkan
<400> 3

tgtacagaga tggagaagga agggaagatc agcaagatcg ggcctgagaa cccctacaac 60
actccagtct tcgcaatcaa gaagaaggac agtaccaagt ggagaaagct ggtggacttc 120
agagagctga acaagagaac tcaggacttc tgggaagttc agctgggcat cccacatccc 180
gctgggttga agaagaagaa gtcagtgaca gtgctggatg tgggtgatgc ctacttctcc 240
gttcccttgg acgaggactt caggaagtac actgccttca cgatacctag catcaacaac 300
gagacaccag gcatccgcta ccagtacaac gtgctgccac agggatggaa gggatcacca 360
gccatctttc aaagcagcat gaccaagatc ctggagccct tccgcaagca aaacccagac 420
atcgtgatct atcagtacat ggacgacctc tacgtaggaa gtgacctgga gatcgggcag 480
cacaggacca agatcgagga gctgagacag catctgttga ggtggggact gaccacacca 540
gacaagaagc accagaagga acctcccttc ctgtggatgg gctacgaact gcatcctgac 600
aagtggacag tgcagcccat cgtgctgcct gagaaggaca gctggactgt gaacgacata 660
cagaagctcg tgggcaagtt gaactgggca agccagatct acccaggcat caaagttagg 720
cagctgtgca agctgcttcg aggaaccaag gcactgacag aagtgatccc actgacagag 780
gaagcagagc tagaactggc agagaaccga gagatcctga aggagccagt acatggagtg 840
tactacgacc caagcaagga cctgatcgca gagatccaga agcaggggca aggccaatgg 900
acctaccaaa tctaccagga gcccttcaag aacctgaaga caggcaagta cgcaaggatg 960
aggggtgccc acaccaacga tgtgaagcag ctgacagagg cagtgcagaa gatcaccaca 1020
gagagcatcg tgatctgggg caagactccc aagttcaagc tgcccataca gaaggagaca 1080
tgggagacat ggtggaccga gtactggcaa gccacctgga tccctgagtg ggagttcgtg 1140
aacacccctc ccttggtgaa actgtggtat cagctggaga aggaacccat cgtgggagca 1200
gagaccttct acgtggatgg ggcagccaac agggagacca agctgggcaa ggcaggctac 1260
gtgaccaacc gaggacgaca gaaagtggtg accctgactg acaccaccaa ccagaagact 1320
gagctgcaag ccatctacct agctctgcaa gacagcggac tggaagtgaa catcgtgaca 1380
gactcacagt acgcactggg catcatccaa gcacaaccag accaatccga gtcagagctg 1440
gtgaaccaga tcatcgagca gctgatcaag aaggagaaag tgtacctggc atgggtacca 1500
gcacacaaag gaattggagg aaatgaacaa gtagataaat tagtcagtgc tgggatccgg 1560
aaggtgctgt tcctggacgg gatcgataag gcccaagatg aacatgagaa gtaccactcc 1620
aactggcgcg ctatggccag cgacttcaac ctgccacctg tagtagcaaa agaaatagta 1680
gccagctgtg ataaatgtca gctaaaagga gaagccatgc atggacaagt agactgtagt 1740
ccaggaatat ggcagctgga ctgcacgcac ctggagggga aggtgatcct ggtagcagtt 1800
catgtagcca gtggatatat agaagcagaa gttatccctg ctgaaactgg gcaggaaaca 1860
gcatattttc ttttaaaatt agcaggaaga tggccagtaa aaacaataca cacggacaac 1920
ggaagcaact tcactggtgc tacggttaag gccgcctgtt ggtgggcggg aatcaagcag 1980
gaatttggaa ttccctacaa tccccaatcg caaggagtcg tggagagcat gaacaaggag 2040
ctgaagaaga tcatcggaca agtgagggat caggctgagc acctgaagac agcagtgcag 2100
atggcagtgt tcatccacaa cttcaaaaga aaaggggga ttgggggta cagtgcaggg 2160
gaaaggatcg tggacatcat cgccaccgac atccaaacca aggagctgca gaagcagatc 2220
accaagatcc agaacttccg ggtgtactac cgcgacagcc gcaacccact gtggaaggga 2280
ccagcaaagc tcctctggaa gggagagggg gcagtggtga tccaggacaa cagtgacatc 2340
aaagtggtgc caaggcgcaa ggccaagatc atccgcgact atggaaaaca gatggcaggt 2400
gatgattgtg tggcaagtag acaggatgag gattagaacc tggaagagcc tggtgaagca 2460

ccatatg 2467

<210> 4
<211> 1533
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:mutated
Rev-independent SIV gag molecular clone SIVgagDX
<400> 4
atgggcgtga gaaactccgt cttgtcaggg aagaaagcag atgaattaga aaaaattagg 60
ctacgaccca acggaaagaa aaagtacatg ttgaagcatg tagtatgggc agcaaatgaa 120
ttagatagat ttggattagc agaaagcctg ttggagaaca aagaaggatg tcaaaaaata 180
ctttcggtct tagctccatt agtgccaaca ggctcagaaa atttaaaaag cctttataat 240
actgtctgcg tcatctggtg cattcacgca gaagagaaag tgaaacacac tgaggaagca 300
aaacagatag tgcagagaca cctagtggtg gaaacaggaa ccaccgaaac catgccgaag 360
acctctcgac caacagcacc atctagcggc agaggaggaa actacccagt acagcagatc 420
ggtggtaact acgtccacct gccactgtcc ccgagaaccc tgaacgcttg ggtcaagctg 480
atcgaggaga agaagttcgg agcagaagta gtgccaggat tccaggcact gtcagaaggt 540
tgcacccccct acgacatcaa ccagatgctg aactgcgttg gagaccatca ggcggctatg 600
cagatcatcc gtgacatcat caacgaggag gctgcagatt gggacttgca gcacccacaa 660
ccagctccac aacaaggaca acttagggag ccgtcaggat cagacatcgc aggaaccacc 720
tcctcagttg acgaacagat ccagtggatg taccgtcagc agaacccgat cccagtaggc 780
aacatctacc gtcgatggat ccagctgggt ctgcagaagt gcgtccgtat gtacaacccg 840
accaacattc tagatgtaaa acaagggcca aaagagccat ttcagagcta tgtagacagg 900
ttctacaaaa gtttaagagc agaacagaca gatgcagcag taaagaattg gatgactcaa 960
acactgctga ttcaaaatgc taacccagat tgcaagctag tgctgaaggg gctgggtgtg 1020
aatcccaccc tagaagaaat gctgacggct tgtcaaggag taggggggcc gggacagaag 1080
gctagattaa tggcagaagc cctgaaagag gccctcgcac cagtgccaat ccctttgca 1140
gcagcccaac agaggggacc aagaaagcca attaagtgtt ggaattgtgg gaaagaggga 1200
cactctgcaa ggcaatgcag agccccaaga agacagggat gctggaaatg tggaaaaatg 1260
gaccatgtta tggccaaatg cccagacaga caggcgggtt ttttaggcct tggtccatgg 1320
ggaaagaagc cccgcaattt ccccatggct caagtgcatc aggggctgat gccaactgct 1380
cccccagagg acccagctgt ggatctgcta aagaactaca tgcagttggg caagcagcag 1440
agagaaaagc agagagaaag cagagagaag ccttacaagg aggtgacaga ggatttgctg 1500
cacctcaatt ctctctttgg aggagaccag tag 1533

<210> 5
<211> 1533
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:consensus
sequence of mutated SIVgagDX and wild type
Simian (macaque) immunodeficiency virus
isolate 239, clone lambda siv 239-1 in Fig. 4
<400> 5
atgggcgtga gaaactccgt cttgtcaggg aagaaagcag atgaattaga aaaaattagg 60
ctacgaccca acggaaagaa aaagtacatg ttgaagcatg tagtatgggc agcaaatgaa 120
ttagatagat ttggattagc agaaagcctg ttggagaaca aagaaggatg tcaaaaaata 180
ctttcggtct tagctccatt agtgccaaca ggctcagaaa atttaaaaag cctttataat 240
actgtctgcg tcatctggtg cattcacgca gaagagaaag tgaaacacac tgaggaagca 300

aaacagatag tgcagagaca cctagtggtg gaaacaggaa cmacmgaaac yatgccraar 360
acmwstmgac caacagcacc atctagcggc agaggaggaa aytacccagt acarcaratm 420
ggtggtaact aygtccacct gccaytrwsc ccgagaacmy traaygcytg ggtmaarytg 480
atmgaggara agaarttygg agcagaagta gtgccaggat tycaggcact gtcagaaggt 540
tgcacccccct aygacatyaa ycagatgytr aaytgygtkg gagaccatca rgcggctatg 600
cagatyatcm gwgayatyat maacgaggag gctgcagatt gggacttgca gcacccacaa 660
ccagctccac aacaaggaca acttagggag ccgtcaggat cagayatygc aggaacmacy 720
wsytcagtwg aygaacarat ccagtggatg tacmgwcarc agaacccsat mccagtaggc 780
aacatytacm gkmgatggat ccarctgggk ytgcaraart gygtymgwat gtayaacccr 840
acmaacattc tagatgtaaa acaagggcca aaagagccat ttcagagcta tgtagacagg 900
ttctacaaaa gtttaagagc agaacagaca gatgcagcag taaagaattg gatgactcaa 960
acactgctga ttcaaaatgc taacccagat tgcaagctag tgctgaaggg gctgggtgtg 1020
aatcccaccc tagaagaaat gctgacggct tgtcaaggag taggggggcc gggacagaag 1080
gctagattaa tggcagaagc cctgaaagag gccctcgcac cagtgccaat ccctttgca 1140
gcagcccaac agaggggacc aagaaagcca attaagtgtt ggaattgtgg gaaagaggga 1200
cactctgcaa ggcaatgcag agccccaaga agacagggat gctggaaatg tggaaaaatg 1260
gaccatgtta tggccaaatg cccagacaga caggcgggtt ttttaggcct tggtccatgg 1320
ggaaagaagc cccgcaattt ccccatggct caagtgcatc aggggctgat gccaactgct 1380
cccccagagg acccagctgt ggatctgcta aagaactaca tgcagttggg caagcagcag 1440
agagaaaagc agagagaaag cagagagaag ccttacaagg aggtgacaga ggatttgctg 1500
cacctcaatt ctctctttgg aggagaccag tag 1533

<210> 6
<211> 8366
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:packaging construct pCMVgagpolBNkan
<400> 6

cctggccatt gcatacgttg tatccatatc ataatatgta catttatatt ggctcatgtc 60
caacattacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 120
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc 180
cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 240
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg 300
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 360
acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 420
ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca 480
tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg 540
tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact 600
ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag 660
ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata 720
gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg ggcgcgcgtc gacagagaga tgggtgcgag 780
agcgtcagta ttaagcgggg gagaattaga tcgatgggaa aaaattcggt taaggccagg 840
gggaaagaag aagtacaagc taaagcacat cgtatgggca agcagggagc tagaacgatt 900
cgcagttaat cctggcctgt tagaaacatc agaaggctgt agacaaatac tgggacagct 960
acaaccatcc cttcagacag gatcagagga gcttcgatca ctatacaaca cagtagcaac 1020
cctctattgt gtgcaccagc ggatcgagat caaggacacc aaggaagctt tagacaagat 1080
agaggaagag caaaacaagt ccaagaagaa ggcccagcag gcagcagctg acacaggaca 1140
cagcaatcag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac atccaggggc aaatggtaca 1200
tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa gtagtagaag agaaggcttt 1260

cagcccagaa gtgataccca tgttttcagc attatcagaa ggagccaccc cacaggacct 1320
gaacacgatg ttgaacaccg tgggggggaca tcaagcagcc atgcaaatgt taaaagagac 1380
catcaatgag gaagctgcag aatgggatag agtgcatcca gtgcatgcag ggcctattgc 1440
accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca ggaactacta gtacccttca 1500
ggaacaaata ggatggatga caaataatcc acctatccca gtaggagaga tctacaagag 1560
gtggataatc ctgggattga acaagatcgt gaggatgtat agccctacca gcattctgga 1620
cataagacaa ggaccaaagg aacccttag agactatgta gaccggttct ataaaactct 1680
aagagctgag caagcttcac aggaggtaaa aaattggatg acagaaacct tgttggtcca 1740
aaatgcgaac ccagattgta agaccatcct gaaggctctc ggcccagcgg ctacactaga 1800
agaaatgatg acagcatgtc agggagtagg aggacccggc cataaggcaa gagttttggc 1860
cgaggcgatg agccaggtga cgaactcggc gaccataatg atgcagagag gcaacttccg 1920
gaaccagcgg aagatcgtca agtgcttcaa ttgtggcaaa gaagggcaca ccgccaggaa 1980
ctgccgggcc ccccggaaga agggctgttg gaaatgtgga aaggaaggac accaaatgaa 2040
agattgtact gagagacagg ctaatttttt agggaagatc tggccttcct acaagggaag 2100
gccagggaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc ccaccagaag agagcttcag 2160
gtctggggta gagacaacaa ctccccctca gaagcaggag ccgatagaca aggaactgta 2220
tcctttaact tccctcagat cactctttgg caacgacccc tcgtcacagt aaggatcggg 2280
gggcaactca aggaagcgct gctcgataca ggagcagatg atacagtatt agaagaaatg 2340
agtttgccag gaagatggaa accaaaaatg ataggggggа tcgggggctt catcaaggtg 2400
aggcagtacg accagatact catagaaatc tgtggacata aagctatagg tacagtatta 2460
gtaggaccta cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt tgacccagat cggctgcacc 2520
ttgaacttcc ccatcagccc tattgagacg gtgcccgtga agttgaagcc ggggatggac 2580
ggccccaagg tcaagcaatg gccattgacg aaagagaaga tcaaggcctt agtcgaaatc 2640
tgtacagaga tggagaagga agggaagatc agcaagatcg ggcctgagaa cccctacaac 2700
actccagtct tcgcaatcaa gaagaaggac agtaccaagt ggagaaagct ggtggacttc 2760
agagagctga acaagagaac tcaggacttc tgggaagttc agctgggcat cccacatccc 2820
gctgggttga agaagaagaa gtcagtgaca gtgctggatg tgggtgatgc ctacttctcc 2880
gttcccttgg acgaggactt caggaagtac actgccttca cgatacctag catcaacaac 2940
gagacaccag gcatccgcta ccagtacaac gtgctgccac agggatggaa gggatcacca 3000
gccatctttc aaagcagcat gaccaagatc ctggagccct tccgcaagca aaacccagac 3060
atcgtgatct atcagtacat ggacgacctc tacgtaggaa gtgacctgga gatcgggcag 3120
cacaggacca agatcgagga gctgagacag catctgttga ggtggggact gaccacacca 3180
gacaagaagc accagaagga acctcccttc ctgtggatgg gctacgaact gcatcctgac 3240
aagtggacag tgcagcccat cgtgctgcct gagaaggaca gctggactgt gaacgacata 3300
cagaagctcg tgggcaagtt gaactgggca agccagatct acccaggcat caaagttagg 3360
cagctgtgca agctgcttcg aggaaccaag gcactgacag aagtgatccc actgacagag 3420
gaagcagagc tagaactggc agagaaccga gagatcctga aggagccagt acatggagtg 3480
tactacgacc caagcaagga cctgatcgca gagatccaga agcaggggca aggccaatgg 3540
acctaccaaa tctaccagga gcccttcaag aacctgaaga caggcaagta cgcaaggatg 3600
aggggtgccc acaccaacga tgtgaagcag ctgacagagg cagtgcagaa gatcaccaca 3660
gagagcatcg tgatctgggg caagactccc aagttcaagc tgcccataca gaaggagaca 3720
tgggagacat ggtggaccga gtactggcaa gccacctgga tccctgagtg ggagttcgtg 3780
aacacccctc ccttggtgaa actgtggtat cagctggaga aggaacccat cgtgggagca 3840
gagaccttct acgtggatgg ggcagccaac agggagacca agctgggcaa ggcaggctac 3900
gtgaccaacc gaggacgaca gaaagtggtg accctgactg acaccaccaa ccagaagact 3960
gagctgcaag ccatctacct agctctgcaa gacagcggac tggaagtgaa catcgtgaca 4020
gactcacagt acgcactggg catcatccaa gcacaaccag accaatccga gtcagagctg 4080
gtgaaccaga tcatcgagca gctgatcaag aaggagaaag tgtacctggc atgggtacca 4140
gcacacaaag gaattggagg aaatgaacaa gtagataaat tagtcagtgc tgggatccgg 4200
aaggtgctgt tcctggacgg gatcgataag gcccaagatg aacatgagaa gtaccactcc 4260

aactggcgcg ctatggccag cgacttcaac ctgccacctg tagtagcaaa agaaatagta 4320
gccagctgtg ataaatgtca gctaaaagga gaagccatgc atggacaagt agactgtagt 4380
ccaggaatat ggcagctgga ctgcacgcac ctggagggga aggtgatcct ggtagcagtt 4440
catgtagcca gtggatatat agaagcagaa gttatccctg ctgaaactgg gcaggaaaca 4500
gcatattttc ttttaaaatt agcaggaaga tggccagtaa aaacaataca cacggacaac 4560
ggaagcaact tcactggtgc tacggttaag gccgcctgtt ggtgggcggg aatcaagcag 4620
gaatttggaa ttccctacaa tccccaatcg caaggagtcg tggagagcat gaacaaggag 4680
ctgaagaaga tcatcggaca agtgagggat caggctgagc acctgaagac agcagtgcag 4740
atggcagtgt tcatccacaa cttcaaaaga aaaggggga ttgggggta cagtgcaggg 4800
gaaaggatcg tggacatcat cgccaccgac atccaaacca aggagctgca gaagcagatc 4860
accaagatcc agaacttccg ggtgtactac cgcgacagcc gcaacccact gtggaaggga 4920
ccagcaaagc tcctctggaa gggagagggg gcagtggtga tccaggacaa cagtgacatc 4980
aaagtggtgc caaggcgcaa ggccaagatc atccgcgact atggaaaaca gatggcaggt 5040
gatgattgtg tggcaagtag acaggatgag gattagaacc tggaagagcc tggtgaagca 5100
ccatatggcg ttcgaagcta gcctcgagat ccagatctgc tgtgccttct agttgccagc 5160
catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg 5220
tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc 5280
tgggggggtgg ggtggggcag cacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg 5340
ctggggatgc ggtgggctct atgggtaccc aggtgctgaa gaattgaccc ggttcctcct 5400
gggccagaaa gaagcaggca catccccttc tctgtgacac accctgtcca cgcccctggt 5460
tcttagttcc agccccactc ataggacact catagctcag gagggctccg ccttcaatcc 5520
cacccgctaa agtacttgga gcggtctctc cctccctcat cagcccacca aaccaaacct 5580
agcctccaag agtgggaaga aattaaagca agataggcta ttaagtgcag agggagagaa 5640
aatgcctcca acatgtgagg aagtaatgag agaaatcata gaatttcttc cgcttcctcg 5700
ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag 5760
gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 5820
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc 5880
cgccccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca 5940
ggactataaa gataccaggc gtttcccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg 6000
accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct 6060
caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt 6120
gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag 6180
tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc 6240
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 6300
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga 6360
gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc 6420
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg 6480
gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gagattatca 6540
aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt 6600
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca 6660
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc gggggggggg ggcgctgagg 6720
tctgcctcgt gaagaaggtg ttgctgactc ataccaggcc tgaatcgccc catcatccag 6780
ccagaaagtg agggagccac ggttgatgag agctttgttg taggtggacc agttggtgat 6840
tttgaacttt tgctttgcca cggaacggtc tgcgttgtcg ggaagatgcg tgatctgatc 6900
cttcaactca gcaaaagttc gatttattca acaaagccgc cgtcccgtca agtcagcgta 6960
atgctctgcc agtgttacaa ccaattaacc aattctgatt agaaaaactc atcgagcatc 7020
aaatgaaact gcaatttatt catatcagga ttatcaatac catatttttg aaaaagccgt 7080
ttctgtaatg aaggagaaaa ctcaccgagg cagttccata ggatggcaag atcctggtat 7140
cggtctgcga ttccgactcg tccaacatca atacaaccta ttaatttccc ctcgtcaaaa 7200
ataaggttat caagtgagaa atcaccatga gtgacgactg aatccggtga gaatggcaaa 7260

agcttatgca tttctttcca gacttgttca acaggccagc cattacgctc gtcatcaaaa 7320
tcactcgcat caaccaaacc gttattcatt cgtgattgcg cctgagcgag acgaaatacg 7380
cgatcgctgt taaaaggaca attacaaaca ggaatcgaat gcaaccggcg caggaacact 7440
gccagcgcat caacaatatt ttcacctgaa tcaggatatt cttctaatac ctggaatgct 7500
gttttcccgg ggatcgcagt ggtgagtaac catgcatcat caggagtacg gataaaatgc 7560
ttgatggtcg gaagaggcat aaattccgtc agccagttta gtctgaccat ctcatctgta 7620
acatcattgg caacgctacc tttgccatgt ttcagaaaca actctggcgc atcgggcttc 7680
ccatacaatc gatagattgt cgcacctgat tgcccgacat tatcgcgagc ccatttatac 7740
ccatataaat cagcatccat gttggaattt aatcgcggcc tcgagcaaga cgtttcccgt 7800
tgaatatggc tcataacacc ccttgtatta ctgtttatgt aagcagacag ttttattgtt 7860
catgatgata tatttttatc ttgtgcaatg taacatcaga gattttgaga cacaacgtgg 7920
ctttcccccc ccccccatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac 7980
atatttgaat gtatttagaa aaataaacaa atagggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa 8040
gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt 8100
atcacgaggc cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg 8160
cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt 8220
cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcatcagag 8280
cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga 8340
aaataccgca tcagattggc tattgg 8366

<210> 7
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:translation of complementary strand positions 7814-7002 of packaging construct pCMVgagpolBNkan (SEQ ID NO:6)

<400> 7

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

Gln Val Trp Lys Glu Met His Lys Leu Leu Pro Phe Ser Pro Asp Ser
180 185 190
Val Val Thr His Gly Asp Phe Ser Leu Asp Asn Leu Ile Phe Asp Glu
195 200 205
Gly Lys Leu Ile Gly Cys Ile Asp Val Gly Arg Val Gly Ile Ala Asp
210 215 220
Arg Tyr Gln Asp Leu Ala Ile Leu Trp Asn Cys Leu Gly Glu Phe Ser
225 230 235 240
Pro Ser Leu Gln Lys Arg Leu Phe Gln Lys Tyr Gly Ile Asp Asn Pro
245 250 255
Asp Met Asn Lys Leu Gln Phe His Leu Met Leu Asp Glu Phe Phe
260 265 270

<210> 8
<211> 8937
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:transfer construct 1, pmBCwCNluci
<400> 8

tggaagggct aatttggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
tgacctttgg atggtgcttc aagttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca 180
aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggacccgg 240
agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccgag 300
agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg 360
ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat 420
gctacatata agcagctgct ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga 480
gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta agcctcaata aagcttgcct 540
tgagtgctca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc 600
agacccttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag 660
cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg 720
caagaggcga ggggcggcgc ctgacgagga cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga 780
aggagagagc tcggtgcgag agcgtcagta ttaagcgggg gagaattaga tcgatgggaa 840
aaaattcggt taaggccagg gggaaagaaa aaatataaat taaaacatat agtatgggca 900
agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggcctgt tagaaacatc agaaggctgt 960
agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca 1020
ttatataata cagtagcaac cctctattgt gtgcatcaaa ggatagagat aaaagacacc 1080
aaggaagctt tagacaagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa agcacagcaa 1140
gcagcagctg acacaggaca cagcaatcag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac 1200
atccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaacga taagcttggg 1260
agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc aacgaccccc 1320
gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt 1380
gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc 1440
atatgccaag tacgcccccc attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg 1500
cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcatcg 1560
ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact 1620
cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa 1680
atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa atgggcggta 1740
ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgcct 1800

ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca ccgactctag aggatccatc 1860
taagtaagct tggcattccg gtactgttgg taaaatggaa gacgccaaaa acataaagaa 1920
aggcccggcg ccattctatc ctctagagga tggaaccgct ggagagcaac tgcataaggc 1980
tatgaagaga tacgccctgg ttcctggaac aattgctttt acagatgcac atatcgaggt 2040
gaacatcacg tacgcggaat acttcgaaat gtccgttcgg ttggcagaag ctatgaaacg 2100
atatgggctg aatacaaatc acagaatcgt cgtatgcagt gaaaactctc ttcaattctt 2160
tatgccggtg ttgggcgcgt tatttatcgg agttgcagtt gcgcccgcga acgacattta 2220
taatgaacgt gaattgctca acagtatgaa catttcgcag cctaccgtag tgtttgtttc 2280
caaaaagggg ttgcaaaaaa ttttgaacgt gcaaaaaaaa ttaccaataa tccagaaaat 2340
tattatcatg gattctaaaa cggattacca gggatttcag tcgatgtaca cgttcgtcac 2400
atctcatcta cctcccggtt ttaatgaata cgattttgta ccagagtcct ttgatcgtga 2460
caaaacaatt gcactgataa tgaattcctc tggatctact gggttaccta agggtgtggc 2520
ccttccgcat agaactgcct gcgtcagatt ctcgcatgcc agagatccta tttttggcaa 2580
tcaaatcatt ccggatactg cgattttaag tgttgttcca ttccatcacg gttttggaat 2640
gtttactaca ctcggatatt tgatatgtgg atttcgagtc gtcttaatgt atagatttga 2700
agaagagctg tttttacgat cccttcagga ttacaaaatt caaagtgcgt tgctagtacc 2760
aaccctattt tcattcttcg ccaaaagcac tctgattgac aaatacgatt tatctaattt 2820
acacgaaatt gcttctgggg gcgcacctct ttcgaaagaa gtcggggaag cggttgcaaa 2880
acgcttccat cttccaggga tacgacaagg atatgggctc actgagacta catcagctat 2940
tctgattaca cccgaggggg atgataaacc gggcgcggtc ggtaaagttg ttccattttt 3000
tgaagcgaag gttgtggatc tggataccgg gaaaacgctg ggcgttaatc agagaggcga 3060
attatgtgtc agaggaccta tgattatgtc cggttatgta aacaatccgg aagcgaccaa 3120
cgccttgatt gacaaggatg gatggctaca ttctggagac atagcttact gggacgaaga 3180
cgaacacttc ttcatagttg accgcttgaa gtctttaatt aaatacaaag gatatcaggt 3240
ggcccccgct gaattggaat cgatattgtt acaacacccc aacatcttcg acgcgggcgt 3300
ggcaggtctt cccgacgatg acgccggtga acttcccgcc gccgttgttg ttttggagca 3360
cggaaagacg atgacggaaa aagagatcgt ggattacgtc gccagtcaag taacaaccgc 3420
gaaaaagttg cgcggaggag ttgtgtttgt ggacgaagta ccgaaaggtc ttaccggaaa 3480
actcgacgca agaaaaatca gagagatcct cataaaggcc aagaagggcg gaaagtccaa 3540
attgtaactc gagggggggc ccggtacctt taagaccaat gacttacaag gcagctgtag 3600
atcttagcca ctttttaaaa gaaaaggggg gactggaagg gctaattcac tcccaaagaa 3660
gacaagatat ccttgatctg tggatctacc acacacaagg ctacttccct gattggcaga 3720
actacacacc agggccaggg gtcagatatc cactgacctt tggatggtgc tacaagctag 3780
taccagttga gccagataag gtagaagagg ccaataaagg agagaacacc agcttgttac 3840
accctgtgag cctgcatgga atggatgacc ctgagagaga agtgttagag tggaggtttg 3900
acagccgcct agcatttcat cacgtggccc gagagctgca tccggagtac ttcaagaact 3960
gctgacatcg agcttgctac aagggacttt ccgctgggga ctttccaggg aggcgtggcc 4020
tgggcgggac tggggagtgg cgagccctca gatgctgcat ataagcagct gctttttgcc 4080
tgtactgggt ctctctggtt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg ctaactaggg 4140
aacccactgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt gtgtgcccgt 4200
ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc ctcagaccct tttagtcagt gtggaaaatc 4260
tctagcaccc cccaggaggt agaggttgca gtgagccaag atcgcgccac tgcattccag 4320
cctgggcaag aaaacaagac tgtctaaaat aataataata agttaagggt attaaatata 4380
tttatacatg gaggtcataa aaatatatat atttgggctg ggcgcagtgg ctcacacctg 4440
cgcccggccc tttgggaggc cgaggcaggt ggatcacctg agtttgggag ttccagacca 4500
gcctgaccaa catggagaaa ccccttctct gtgtattttt agtagatttt attttatgtg 4560
tattttattc acaggtattt ctggaaaact gaaactgttt ttcctctact ctgataccac 4620
aagaatcatc agcacagagg aagacttctg tgatcaaatg tggtgggaga gggaggtttt 4680
caccagcaca tgagcagtca gttctgccgc agactcggcg ggtgtccttc ggttcagttc 4740
caacaccgcc tgcctggaga gaggtcagac cacagggtga gggctcagtc cccaagacat 4800

aaacacccaa gacataaaca cccaacaggt ccaccccgcc tgctgcccag gcagagccga 4860
ttcaccaaga cgggaattag gatagagaaa gagtaagtca cacagagccg gctgtgcggg 4920
agaacggagt tctattatga ctcaaatcag tctccccaag cattcgggga tcagagtttt 4980
taaggataac ttagtgtgta gggggccagt gagttggaga tgaaagcgta gggagtcgaa 5040
ggtgtccttt tgcgccgagt cagttcctgg gtgggggcca caagatcgga tgagccagtt 5100
tatcaatccg ggggtgccag ctgatccatg gagtgcaggg tctgcaaaat atctcaagca 5160
ctgattgatc ttaggtttta caatagtgat gttaccccag gaacaatttg gggaaggtca 5220
gaatcttgta gcctgtagct gcatgactcc taaaccataa tttctttttt gtttttttt 5280
ttttattttt gagacagggt ctcactctgt cacctaggct ggagtgcagt ggtgcaatca 5340
cagctcactg cagcccctag agcggccgcc accgcggtgg agctccaatt cgccctatag 5400
tgagtcgtat tacaattcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg 5460
cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga 5520
agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcga 5580
aattgtaaac gttaatattt tgttaaaatt cgcgttaaat ttttgttaaa tcagctcatt 5640
ttttaaccaa taggccgaaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaaagaat agaccgagat 5700
agggttgagt gttgttccag tttggaacaa gagtccacta ttaaagaacg tggactccaa 5760
cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggccca ctacgtgaac catcacccta 5820
atcaagtttt ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaacccta aagggagccc 5880
ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag ggaagaaagc 5940
gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc acgctgcgcg taaccaccac 6000
acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggg cgcgtcccag gtggcacttt tcggggaaat 6060
gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 6120
agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa 6180
catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac 6240
ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac 6300
atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt 6360
ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc 6420
gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca 6480
ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc 6540
ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag 6600
gagctaaccg ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa 6660
ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg 6720
gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa 6780
ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg 6840
gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt 6900
gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt 6960
caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag 7020
cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat 7080
ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct 7140
taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct 7200
tgagatcctt ttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca 7260
gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc 7320
agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc 7380
aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct 7440
gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag 7500
gcgcagcggt cgggctgaac gggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc 7560
tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg 7620
agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag 7680
cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt 7740
gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac 7800

gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttcctgcg 7860
ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc 7920
cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata 7980
cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt 8040
cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag 8100
gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga 8160
taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagctcgg aattaaccct 8220
cactaaaggg aacaaaagct gctgcagggt ccctaactgc caagccccac agtgtgccct 8280
gaggctgccc cttccttcta gcggctgccc ccactcggct ttgctttccc tagtttcagt 8340
tacttgcgtt cagccaaggt ctgaaactag gtgcgcacag agcggtaaga ctgcgagaga 8400
aagagaccag ctttacaggg ggtttatcac agtgcaccct gacagtcgtc agcctcacag 8460
ggggtttatc acattgcacc ctgacagtcg tcagcctcac agggggttta tcacagtgca 8520
cccttacaat cattccattt gattcacaat ttttttagtc tctactgtgc ctaacttgta 8580
agttaaattt gatcagaggt gtgttcccag aggggaaaac agtatataca gggttcagta 8640
ctatcgcatt tcaggcctcc acctgggtct tggaatgtgt cccccgaggg gtgatgacta 8700
cctcagttgg atctccacag gtcacagtga cacaagataa ccaagacacc tcccaaggct 8760
accacaatgg gccgccctcc acgtgcacat ggccggagga actgccatgt cggaggtgca 8820
agcacacctg cgcatcagag tccttggtgt ggagggaggg accagcgcag cttccagcca 8880
tccacctgat gaacagaacc tagggaaagc cccagttcta cttacaccag gaaaggc 8937

<210> 9
<211> 8937
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:transfer construct 2, pmBCmCNluci
<400> 9

tggaagggct aatttggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
tgacctttgg atggtgcttc aagttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca 180
aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggacccgg 240
agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccgag 300
agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg 360
ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat 420
gctacatata agcagctgct ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga 480
gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta agcctcaata aagcttgcct 540
tgagtgctca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc 600
agacccttttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag 660
cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg 720
caagaggcga ggggcggcgc ctgacgagga cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga 780
aggagagagc tcggtgcgag agcgtcagta ttaagcgggg gagaattaga tcgatgggaa 840
aaaattcggt taaggccagg gggaaagaag aagtacaagc taaagcacat cgtatgggca 900
agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggcctgt tagaaacatc agaaggctgt 960
agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagagga gcttcgatca 1020
ctatacaaca cagtagcaac cctctattgt gtgcaccagc ggatcgagat caaggacacc 1080
aaggaagctt tagacaagat agaggaagag caaaacaagt ccaagaagaa ggcccagcag 1140
gcagcagctg acacaggaca cagcaatcag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac 1200
atccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaacga taagcttggg 1260
agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc aacgacccccc 1320
gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt 1380

gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc 1440
atatgccaag tacgcccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg 1500
cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcatcg 1560
ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact 1620
cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa 1680
atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa atgggcggta 1740
ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgcct 1800
ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca ccgactctag aggatccatc 1860
taagtaagct tggcattccg gtactgttgg taaaatggaa gacgccaaaa acataaagaa 1920
aggcccggcg ccattctatc ctctagagga tggaaccgct ggagagcaac tgcataaggc 1980
tatgaagaga tacgccctgg ttcctggaac aattgctttt acagatgcac atatcgaggt 2040
gaacatcacg tacgcggaat acttcgaaat gtccgttcgg ttggcagaag ctatgaaacg 2100
atatgggctg aatacaaatc acagaatcgt cgtatgcagt gaaaactctc ttcaattctt 2160
tatgccggtg ttgggcgcgt tatttatcgg agttgcagtt gcgcccgcga acgacattta 2220
taatgaacgt gaattgctca acagtatgaa catttcgcag cctaccgtag tgtttgtttc 2280
caaaaagggg ttgcaaaaaa ttttgaacgt gcaaaaaaaa ttaccaataa tccagaaaat 2340
tattatcatg gattctaaaa cggattacca gggatttcag tcgatgtaca cgttcgtcac 2400
atctcatcta cctcccggtt ttaatgaata cgattttgta ccagagtcct ttgatcgtga 2460
caaaacaatt gcactgataa tgaattcctc tggatctact gggttaccta agggtgtggc 2520
ccttccgcat agaactgcct gcgtcagatt ctcgcatgcc agagatccta tttttggcaa 2580
tcaaatcatt ccggatactg cgattttaag tgttgttcca ttccatcacg gttttggaat 2640
gtttactaca ctcggatatt tgatatgtgg atttcgagtc gtcttaatgt atagatttga 2700
agaagagctg tttttacgat cccttcagga ttacaaaatt caaagtgcgt tgctagtacc 2760
aaccctattt tcattcttcg ccaaaagcac tctgattgac aaatacgatt tatctaattt 2820
acacgaaatt gcttctgggg gcgcacctct ttcgaaagaa gtcggggaag cggttgcaaa 2880
acgcttccat cttccaggga tacgacaagg atatgggctc actgagacta catcagctat 2940
tctgattaca cccgaggggg atgataaacc gggcgcggtc ggtaaagttg ttccattttt 3000
tgaagcgaag gttgtggatc tggataccgg gaaaacgctg ggcgttaatc agagaggcga 3060
attatgtgtc agaggaccta tgattatgtc cggttatgta aacaatccgg aagcgaccaa 3120
cgccttgatt gacaaggatg gatggctaca ttctggagac atagcttact gggacgaaga 3180
cgaacacttc ttcatagttg accgcttgaa gtctttaatt aaatacaaag gatatcaggt 3240
ggcccccgct gaattggaat cgatattgtt acaacacccc aacatcttcg acgcgggcgt 3300
ggcaggtctt cccgacgatg acgccggtga acttcccgcc gccgttgttg ttttggagca 3360
cggaaagacg atgacggaaa aagagatcgt ggattacgtc gccagtcaag taacaaccgc 3420
gaaaaagttg cgcggaggag ttgtgtttgt ggacgaagta ccgaaaggtc ttaccggaaa 3480
actcgacgca agaaaaatca gagagatcct cataaaggcc aagaaggggcg gaaagtccaa 3540
attgtaactc gagggggggc ccggtacctt taagaccaat gacttacaag gcagctgtag 3600
atcttagcca ctttttaaaa gaaaaggggg gactggaagg gctaattcac tcccaaagaa 3660
gacaagatat ccttgatctg tggatctacc acacacaagg ctacttccct gattggcaga 3720
actacacacc agggccaggg gtcagatatc cactgacctt tggatggtgc tacaagctag 3780
taccagttga gccagataag gtagaagagg ccaataaagg agagaacacc agcttgttac 3840
accctgtgag cctgcatgga atggatgacc ctgagagaga agtgttagag tggaggtttg 3900
acagccgcct agcatttcat cacgtggccc gagagctgca tccggagtac ttcaagaact 3960
gctgacatcg agcttgctac aagggacttt ccgctgggga ctttccaggg aggcgtggcc 4020
tgggcgggac tggggagtgg cgagccctca gatgctgcat ataagcagct gctttttgcc 4080
tgtactgggt ctctctggtt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg ctaactaggg 4140
aacccactgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt gtgtgcccgt 4200
ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc ctcagaccct tttagtcagt gtggaaaatc 4260
tctagcaccc cccaggaggt agaggttgca gtgagccaag atcgcgccac tgcattccag 4320
cctgggcaag aaaacaagac tgtctaaaat aataataata agttaagggt attaaatata 4380

tttatacatg gaggtcataa aaatatatat atttgggctg ggcgcagtgg ctcacacctg 4440
cgcccggccc tttgggaggc cgaggcaggt ggatcacctg agtttgggag ttccagacca 4500
gcctgaccaa catggagaaa ccccttctct gtgtattttt agtagatttt attttatgtg 4560
tattttattc acaggtattt ctggaaaact gaaactgttt ttcctctact ctgataccac 4620
aagaatcatc agcacagagg aagacttctg tgatcaaatg tggtgggaga gggaggtttt 4680
caccagcaca tgagcagtca gttctgccgc agactcggcg ggtgtccttc ggttcagttc 4740
caacaccgcc tgcctggaga gaggtcagac cacagggtga gggctcagtc cccaagacat 4800
aaacacccaa gacataaaca cccaacaggt ccaccccgcc tgctgcccag gcagagccga 4860
ttcaccaaga cgggaattag gatagagaaa gagtaagtca cacagagccg gctgtgcggg 4920
agaacggagt tctattatga ctcaaatcag tctccccaag cattcgggga tcagagtttt 4980
taaggataac ttagtgtgta gggggccagt gagttggaga tgaaagcgta gggagtcgaa 5040
ggtgtccttt tgcgccgagt cagttcctgg gtgggggcca caagatcgga tgagccagtt 5100
tatcaatccg ggggtgccag ctgatccatg gagtgcaggg tctgcaaaat atctcaagca 5160
ctgattgatc ttaggtttta caatagtgat gttaccccag gaacaatttg gggaaggtca 5220
gaatcttgta gcctgtagct gcatgactcc taaaccataa tttctttttt gtttttttt 5280
ttttatttt gagacagggt ctcactctgt cacctaggct ggagtgcagt ggtgcaatca 5340
cagctcactg cagcccctag agcggccgcc accgcggtgg agctccaatt cgccctatag 5400
tgagtcgtat tacaattcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg 5460
cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga 5520
agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcga 5580
aattgtaaac gttaatattt tgttaaaatt cgcgttaaat ttttgttaaa tcagctcatt 5640
ttttaaccaa taggccgaaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaaagaat agaccgagat 5700
agggttgagt gttgttccag tttggaacaa gagtccacta ttaaagaacg tggactccaa 5760
cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggccca ctacgtgaac catcacccta 5820
atcaagtttt ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaacccta aagggagccc 5880
ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag ggaagaaagc 5940
gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc acgctgcgcg taaccaccac 6000
acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggg cgcgtcccag gtggcacttt tcggggaaat 6060
gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 6120
agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa 6180
catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac 6240
ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac 6300
atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt 6360
ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc 6420
gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca 6480
ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc 6540
ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag 6600
gagctaaccg ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa 6660
ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg 6720
gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa 6780
ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg 6840
gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt 6900
gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt 6960
caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag 7020
cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat 7080
ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct 7140
taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct 7200
tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca 7260
gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc 7320
agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc 7380

aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct 7440
gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag 7500
gcgcagcggt cgggctgaac gggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc 7560
tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg 7620
agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag 7680
cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt 7740
gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac 7800
gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttcctgcg 7860
ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc 7920
cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata 7980
cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt 8040
cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag 8100
gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga 8160
taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagctcgg aattaaccct 8220
cactaaaggg aacaaaagct gctgcagggt ccctaactgc caagccccac agtgtgccct 8280
gaggctgccc cttccttcta gcggctgccc ccactcggct ttgctttccc tagtttcagt 8340
tacttgcgtt cagccaaggt ctgaaactag gtgcgcacag agcggtaaga ctgcgagaga 8400
aagagaccag ctttacaggg ggtttatcac agtgcaccct gacagtcgtc agcctcacag 8460
ggggtttatc acattgcacc ctgacagtcg tcagcctcac agggggttta tcacagtgca 8520
cccttacaat cattccattt gattcacaat ttttttagtc tctactgtgc ctaacttgta 8580
agttaaattt gatcagaggt gtgttcccag aggggaaaac agtatataca gggttcagta 8640
ctatcgcatt tcaggcctcc acctgggtct tggaatgtgt cccccgaggg gtgatgacta 8700
cctcagttgg atctccacag gtcacagtga cacaagataa ccaagacacc tcccaaggct 8760
accacaatgg gccgccctcc acgtgcacat ggccggagga actgccatgt cggaggtgca 8820
agcacacctg cgcatcagag tccttggtgt ggagggaggg accagcgcag cttccagcca 8880
tccacctgat gaacagaacc tagggaaagc cccagttcta cttacaccag gaaaggc 8937

<210> 10
<211> 122
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:region BssHII (711) to ClaI (830) in transfer construct 1 and 2 (pmBCwCNluci and pmBCmCNluci), sequence mBCwCN
<400> 10
cgcgcacggc aagaggcgag gggcggcgcc tgacgaggac gccaaaaatt ttgactagcg 60
gaggctagaa ggagagagct cggtgcgaga gcgtcagtat taagcggggg agaattagat 120
cg 122

<210> 11
<211> 122
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:region BssHII (711) to ClaI (830) in transfer construct 3, sequence m2BCwCN
<400> 11
cgcgcacggc aagaggcgag gggcggcgcc tggggaggac gccaaaaatt ttgactagcg 60
gaggctagaa ggagagagat gggtgcgaga gcgtcagtat taagcggggg agaattagat 120
cg 122

<210> 12
<211> 122
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:region BssHII (711) to ClaI (830) in wild-type HIV-1 molecular clone HXB2
<400> 12
cgcgcacggc aagaggcgag gggcggcgac tggtgagtac gccaaaaatt ttgactatcg 60
gaggctagaa ggagagagat gggtgcgaga gcgtcagtat taagcggggg agaattagat 120
cg 122
<210> 13
<211> 122
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:region BssHII (711) to ClaI (830) in wild-type HIV-1 molecular clone NL4-3
<400> 13
cgcgcacggc aagaggcgag gggcggcgac tggtgagtac gccaaaaatt ttgactagcg 60
gaggctagaa ggagagagat gggtgcgaga gcgtcggtat taagcggggg agaattagat 120
aa 122
<210> 14
<211> 122
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:consensus sequence for region BssHII (711) to ClaI (830) in transfer constructs 1-3 (sequences mBCwCN and m2BCwCN) and wild-type HIV-1 molecular clones HXB2 and NL4-3
<400> 14
cgcgcacggc aagaggcgag gggcggcgac tggtgagtac gccaaaaatt ttgactagcg 60
gaggctagaa ggagagagat gggtgcgaga gcgtcagtat taagcggggg agaattagat 120
cg 122
<210> 15
<211> 6978
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:SIV envelope encoding vector CMVkan/R-R-SIVenvCTE containing mutated SIV env gene
<220>
<221> CDS
<222> (764)..(3400)
<223> mutated lentiviral env from "env-coding" vector

CMVkan/R-R-SIVenvCTE, mutated SIV env

<400> 15

cctggccatt gcatacgttg tatccatatc ataatatgta catttatatt ggctcatgtc 60
caacattacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 120
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc 180
cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 240
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg 300
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 360
acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 420
ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca 480
tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg 540
tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact 600
ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag 660
ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata 720
gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg ggccgcgcta agtatgggat gtcttgggaa 780
tcagctgctt atcgccatct tgcttttaag tgtctatggg atctattgta ctctatatgt 840
cacagtcttt tatggtgtac cagcttggag gaatgcgaca attcccctct tttgtgcaac 900
caagaatagg gatacttggg gaacaactca gtgcctacca gataatggtg attattcaga 960
agtggccctt aatgttacag aaagctttga tgcctggaat aatacagtca cagaacaggc 1020
aatagaggat gtatggcaac tctttgagac ctcaataaag ccttgtgtaa aattatcccc 1080
attatgcatt actatgagat gcaataaaag tgagacagat agatggggat tgacaaaatc 1140
aataacaaca acagcatcaa caacatcaac gacagcatca gcaaaagtag acatggtcaa 1200
tgagactagt tcttgtatag cccaggataa ttgcacaggc ttggaacaag agcaaatgat 1260
aagctgtaaa ttcaacatga cagggttaaa aagagacaag aaaaaagagt acaatgaaac 1320
ttggtactct gcagatttgg tatgtgaaca agggaataac actggtaatg aaagtagatg 1380
ttacatgaac cactgtaaca cttctgttat ccaagagtct tgtgacaaac attattggga 1440
tgctattaga tttaggtatt gtgcacctcc aggttatgct ttgcttagat gtaatgacac 1500
aaattattca ggctttatgc ctaaatgttc taaggtggtg gtctcttcat gcacaaggat 1560
gatggagaca cagacttcta cttggtttgg ctttaatgga actagagcag aaaatagaac 1620
ttatatttac tggcatggta gggataatag gactataatt agtttaaata agtattataa 1680
tctaacaatg aaatgtagaa gaccaggaaa taagacagtt ttaccagtca ccattatgtc 1740
tggattggtt ttccactcac aaccaatcaa tgataggcca aagcaggcat ggtgttggtt 1800
tggaggaaaa tggaaggatg caataaaaga ggtgaagcag accattgtca aacatcccag 1860
gtatactgga actaacaata ctgataaaat caatttgacg gctcctggag gaggagatcc 1920
ggaagttacc ttcatgtgga caaattgcag aggagagttc ctctactgta aaatgaattg 1980
gtttctaaat tgggtagaag ataggaatac agctaaccag aagccaaagg aacagcataa 2040
aaggaattac gtgccatgtc atattagaca aataatcaac acttggcata aagtaggcaa 2100
aaatgtttat ttgcctccaa gagagggaga cctcacgtgt aactccacag tgaccagtct 2160
catagcaaac atagattgga ttgatggaaa ccaaactaat atcaccatga gtgcagaggt 2220
ggcagaactg tatcgattgg aattgggaga ttataaatta gtagagatca ctccaattgg 2280
cttggccccc acagatgtga agaggtacac tactggtggc acctcaagaa ataaaagagg 2340
ggtctttgtg ctagggttct tgggttttct cgcaacggca ggttctgcaa tgggagccgc 2400
cagcctgacc ctcacggcac agtcccgaac tttattggct gggatagtcc aacagcagca 2460
acagctgttg gacgtggtca agagacaaca agaattgttg cgactgaccg tctggggaac 2520
aaagaacctc cagactaggg tcactgccat cgagaagtac ttaaaggacc aggcgcagct 2580
gaatgcttgg ggatgtgcgt ttagacaagt ctgccacact actgtaccat ggccaaatgc 2640
aagtctaaca ccaaagtgga acaatgagac ttggcaagag tgggagcgaa aggttgactt 2700
cttggaagaa aatataacag ccctcctaga ggaggcacaa attcaacaag agaagaacat 2760
gtatgaatta caaaagttga atagctggga tgtgtttggc aattggtttg accttgcttc 2820
ttggataaag tatatacaat atggagttta tatagttgta ggagtaatac tgttaagaat 2880

agtgatctat atagtacaaa tgctagctaa gttaaggcag gggtataggc cagtgttctc 2940
ttccccaccc tcttatttcc agcagaccca tatccaacag gacccggcac tgccaaccag 3000
agaaggcaaa gaaagagacg gtggagaagg cggtggcaac agctcctggc cttggcagat 3060
agaatatatc cactttctta ttcgtcagct tattagactc ttgacttggc tattcagtaa 3120
ctgtaggact ttgctatcga gagtatacca gatcctccaa ccaatactcc agaggctctc 3180
tgcgacccta cagaggattc gagaagtcct caggactgaa ctgacctacc tacaatatgg 3240
gtggagctat ttccatgagg cggtccaggc cgtctggaga tctgcgacag agactcttgc 3300
gggcgcgtgg ggagacttat gggagactct taggagaggt ggaagatgga tactcgcaat 3360
ccccaggagg attagacaag ggcttgagct cactctcttg tgagggacag agaattcgga 3420
tccactagtt ctagactcga ggggggggccc ggtacgagcg cttagctagc tagagaccac 3480
ctcccctgcg agctaagctg gacagccaat gacgggtaag agagtgacat ttttcactaa 3540
cctaagacag gagggccgtc agagctactg cctaatccaa agacgggtaa aagtgataaa 3600
aatgtatcac tccaacctaa gacaggcgca gcttccgagg gatttgtcgt ctgttttata 3660
tatatttaaa agggtgacct gtccggagcc gtgctgcccg gatgatgtct tggtctagac 3720
tcgaggggggg gcccggtacg atccagatct gctgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt 3780
gtttgccccct ccccccgtgcc ttccttgacc ctggaaggtg ccactcccac tgtcctttcc 3840
taataaaatg aggaaattgc atcgcattgt ctgagtaggt gtcattctat tctgggggggt 3900
ggggtggggc agcacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat 3960
gcggtgggct ctatgggtac ccaggtgctg aagaattgac ccggttcctc ctgggccaga 4020
aagaagcagg cacatcccct tctctgtgac acaccctgtc cacgcccctg gttcttagtt 4080
ccagccccac tcataggaca ctcatagctc aggagggctc cgccttcaat cccacccgct 4140
aaagtacttg gagcggtctc tccctccctc atcagcccac caaaccaaac ctagcctcca 4200
agagtgggaa gaaattaaag caagataggc tattaagtgc agaggggagag aaaatgcctc 4260
caacatgtga ggaagtaatg agagaaatca tagaatttct tccgcttcct cgctcactga 4320
ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat 4380
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca 4440
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc 4500
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata 4560
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc 4620
gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc 4680
acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga 4740
acccccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc 4800
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 4860
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag 4920
gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag 4980
ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca 5040
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga 5100
cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 5160
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga 5220
gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 5280
tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccgggggggg ggggcgctga ggtctgcctc 5340
gtgaagaagg tgttgctgac tcataccagg cctgaatcgc cccatcatcc agccagaaag 5400
tgagggagcc acggttgatg agagctttgt tgtaggtgga ccagttggtg attttgaact 5460
tttgctttgc cacggaacgg tctgcgttgt cgggaagatg cgtgatctga tccttcaact 5520
cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc gccgtcccgt caagtcagcg taatgctctg 5580
ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa 5640
ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa 5700
tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca agatcctggt atcggtctgc 5760
gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc ccctcgtcaa aaataaggtt 5820
atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg 5880

catttctttc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc 5940
atcaaccaaa ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgct 6000
gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc 6060
atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaat acctggaatg ctgttttccc 6120
ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc atcaggagta cggataaaat gcttgatggt 6180
cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg taacatcatt 6240
ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc gcatcgggct tcccatacaa 6300
tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac attatcgcga gcccatttat acccatataa 6360
atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg 6420
gctcataaca ccccttgtat tactgtttat gtaagcagac agttttattg ttcatgatga 6480
tatatttta tcttgtgcaa tgtaacatca gagattttga gacacaacgt ggctttcccc 6540
cccccccat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga 6600
atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc 6660
tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag 6720
gccctttcgt ctcgcgcgtt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc 6780
ggagacggtc acagcttgtc tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc 6840
gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt 6900
actgagagtg caccatatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg 6960
catcagattg gctattgg 6978

<210> 16
<211> 879
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> mutated lentiviral env from "env-coding" vector
CMVkan/R-R-SIVenvCTE, mutated SIV env
<400> 16

```
Met Gly Cys Leu Gly Asn Gln Leu Leu Ile Ala Ile Leu Leu Leu Ser
  1               5                  10                  15
Val Tyr Gly Ile Tyr Cys Thr Leu Tyr Val Thr Val Phe Tyr Gly Val
             20                  25                  30
Pro Ala Trp Arg Asn Ala Thr Ile Pro Leu Phe Cys Ala Thr Lys Asn
         35                  40                  45
Arg Asp Thr Trp Gly Thr Thr Gln Cys Leu Pro Asp Asn Gly Asp Tyr
     50                  55                  60
Ser Glu Val Ala Leu Asn Val Thr Glu Ser Phe Asp Ala Trp Asn Asn
65                  70                  75                  80
Thr Val Thr Glu Gln Ala Ile Glu Asp Val Trp Gln Leu Phe Glu Thr
                 85                  90                  95
Ser Ile Lys Pro Cys Val Lys Leu Ser Pro Leu Cys Ile Thr Met Arg
            100                 105                 110
Cys Asn Lys Ser Glu Thr Asp Arg Trp Gly Leu Thr Lys Ser Ile Thr
        115                 120                 125
Thr Thr Ala Ser Thr Thr Ser Thr Thr Ala Ser Ala Lys Val Asp Met
    130                 135                 140
Val Asn Glu Thr Ser Ser Cys Ile Ala Gln Asp Asn Cys Thr Gly Leu
145                 150                 155                 160
Glu Gln Glu Gln Met Ile Ser Cys Lys Phe Asn Met Thr Gly Leu Lys
                165                 170                 175
Arg Asp Lys Lys Lys Glu Tyr Asn Glu Thr Trp Tyr Ser Ala Asp Leu
```

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

580 585 590
Val Thr Ala Ile Glu Lys Tyr Leu Lys Asp Gln Ala Gln Leu Asn Ala
595 600 605
Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys His Thr Thr Val Pro Trp Pro
610 615 620
Asn Ala Ser Leu Thr Pro Lys Trp Asn Asn Glu Thr Trp Gln Glu Trp
625 630 635 640
Glu Arg Lys Val Asp Phe Leu Glu Glu Asn Ile Thr Ala Leu Leu Glu
645 650 655
Glu Ala Gln Ile Gln Gln Glu Lys Asn Met Tyr Glu Leu Gln Lys Leu
660 665 670
Asn Ser Trp Asp Val Phe Gly Asn Trp Phe Asp Leu Ala Ser Trp Ile
675 680 685
Lys Tyr Ile Gln Tyr Gly Val Tyr Ile Val Val Gly Val Ile Leu Leu
690 695 700
Arg Ile Val Ile Tyr Ile Val Gln Met Leu Ala Lys Leu Arg Gln Gly
705 710 715 720
Tyr Arg Pro Val Phe Ser Ser Pro Pro Ser Tyr Phe Gln Gln Thr His
725 730 735
Ile Gln Gln Asp Pro Ala Leu Pro Thr Arg Glu Gly Lys Glu Arg Asp
740 745 750
Gly Gly Glu Gly Gly Gly Asn Ser Ser Trp Pro Trp Gln Ile Glu Tyr
755 760 765
Ile His Phe Leu Ile Arg Gln Leu Ile Arg Leu Leu Thr Trp Leu Phe
770 775 780
Ser Asn Cys Arg Thr Leu Leu Ser Arg Val Tyr Gln Ile Leu Gln Pro
785 790 795 800
Ile Leu Gln Arg Leu Ser Ala Thr Leu Gln Arg Ile Arg Glu Val Leu
805 810 815
Arg Thr Glu Leu Thr Tyr Leu Gln Tyr Gly Trp Ser Tyr Phe His Glu
820 825 830
Ala Val Gln Ala Val Trp Arg Ser Ala Thr Glu Thr Leu Ala Gly Ala
835 840 845
Trp Gly Asp Leu Trp Glu Thr Leu Arg Arg Gly Gly Arg Trp Ile Leu
850 855 860
Ala Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Leu Thr Leu Leu
865 870 875
<210> 17
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:translation of complementary strand positions 6426-5611 of vector CMVkan/R-R-SIVenvCTE (SEQ ID NO:15)
<400> 17
Met Ser His Ile Gln Arg Glu Thr Ser Cys Ser Arg Pro Arg Leu Asn
1 5 10 15
Ser Asn Met Asp Ala Asp Leu Tyr Gly Tyr Lys Trp Ala Arg Asp Asn
20 25 30

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

<210> 18
<211> 2637
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:coding sequence of mutated lentiviral env from "env-coding" vector CMVkan/R-R-SIVenvCTE, coding sequence of mutated SIV env in vector CMVkan/R-R-SIVgp160 CTE
<400> 18
atgggatgtc ttgggaatca gctgcttatc gccatcttgc ttttaagtgt ctatgggatc 60
tattgtactc tatatgtcac agtcttttat ggtgtaccag cttggaggaa tgcgacaatt 120
ccctctttt gtgcaaccaa gaatagggat acttggggaa caactcagtg cctaccagat 180
aatggtgatt attcagaagt ggcccttaat gttacagaaa gctttgatgc ctggaataat 240
acagtcacag aacaggcaat agaggatgta tggcaactct ttgagacctc aataaagcct 300
tgtgtaaaat tatccccatt atgcattact atgagatgca ataaaagtga gacagataga 360
tggggattga caaaatcaat aacaacaaca gcatcaacaa catcaacgac agcatcagca 420
aaagtagaca tggtcaatga gactagttct tgtatagccc aggataattg cacaggcttg 480
gaacaagagc aaatgataag ctgtaaattc aacatgacag ggttaaaaag agacaagaaa 540
aaagagtaca atgaaacttg gtactctgca gatttggtat gtgaacaagg gaataacact 600

ggtaatgaaa gtagatgtta catgaaccac tgtaacactt ctgttatcca agagtcttgt 660
gacaaacatt attgggatgc tattagattt aggtattgtg cacctccagg ttatgctttg 720
cttagatgta atgacacaaa ttattcaggc tttatgccta aatgttctaa ggtggtggtc 780
tcttcatgca caaggatgat ggagacacag acttctactt ggtttggctt taatggaact 840
agagcagaaa atagaactta tatttactgg catggtaggg ataataggac tataattagt 900
ttaaataagt attataatct aacaatgaaa tgtagaagac caggaaataa gacagtttta 960
ccagtcacca ttatgtctgg attggttttc cactcacaac caatcaatga taggccaaag 1020
caggcatggt gttggtttgg aggaaaatgg aaggatgcaa taaaagaggt gaagcagacc 1080
attgtcaaac atcccaggta tactggaact aacaatactg ataaaatcaa tttgacggct 1140
cctggaggag gagatccgga agttaccttc atgtggacaa attgcagagg agagttcctc 1200
tactgtaaaa tgaattggtt tctaaattgg gtagaagata ggaatacagc taaccagaag 1260
ccaaaggaac agcataaaag gaattacgtg ccatgtcata ttagacaaat aatcaacact 1320
tggcataaag taggcaaaaa tgtttatttg cctccaagag agggagacct cacgtgtaac 1380
tccacagtga ccagtctcat agcaaacata gattggattg atggaaacca aactaatatc 1440
accatgagtg cagaggtggc agaactgtat cgattggaat tgggagatta taaattagta 1500
gagatcactc caattggctt ggcccccaca gatgtgaaga ggtacactac tggtggcacc 1560
tcaagaaata aaagaggggt ctttgtgcta gggttcttgg gttttctcgc aacggcaggt 1620
tctgcaatgg gagccgccag cctgaccctc acggcacagt cccgaacttt attggctggg 1680
atagtccaac agcagcaaca gctgttggac gtggtcaaga gacaacaaga attgttgcga 1740
ctgaccgtct ggggaacaaa gaacctccag actagggtca ctgccatcga gaagtactta 1800
aaggaccagg cgcagctgaa tgcttgggga tgtgcgttta gacaagtctg ccacactact 1860
gtaccatggc caaatgcaag tctaacacca aagtggaaca atgagacttg gcaagagtgg 1920
gagcgaaagg ttgacttctt ggaagaaaat ataacagccc tcctagagga ggcacaaatt 1980
caacaagaga agaacatgta tgaattacaa aagttgaata gctgggatgt gtttggcaat 2040
tggtttgacc ttgcttcttg gataaagtat atacaatatg gagtttatat agttgtagga 2100
gtaatactgt taagaatagt gatctatata gtacaaatgc tagctaagtt aaggcagggg 2160
tataggccag tgttctcttc cccaccctct tatttccagc agacccatat ccaacaggac 2220
ccggcactgc caaccagaga aggcaaagaa agagacggtg gagaaggcgg tggcaacagc 2280
tcctggcctt ggcagataga atatatccac tttcttattc gtcagcttat tagactcttg 2340
acttggctat tcagtaactg taggactttg ctatcgagag tataccagat cctccaacca 2400
atactccaga ggctctctgc gaccctacag aggattcgag aagtcctcag gactgaactg 2460
acctacctac aatatgggtg gagctatttc catgaggcgg tccaggccgt ctggagatct 2520
gcgacagaga ctcttgcggg cgcgtgggga gacttatggg agactcttag gagaggtgga 2580
agatggatac tcgcaatccc caggaggatt agacaagggc ttgagctcac tctcttg___ 2637

<210> 19
<211> 813
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:coding sequence of complementary strand positions 6426-5611 of vector CMVkan/R-R-SIVenvCTE (SEQ ID NO:15)

<400> 19
atgagccata ttcaacggga aacgtcttgc tcgaggccgc gattaaattc caacatggat 60
gctgatttat atgggtataa atgggctcgc gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc 120
tatcgattgt atgggaagcc cgatgcgcca gagttgtttc tgaaacatgg caaaggtagc 180
gttgccaatg atgttacaga tgagatggtc agactaaact ggctgacgga atttatgcct 240
cttccgacca tcaagcattt tatccgtact cctgatgatg catggttact caccactgcg 300
atccccggga aaacagcatt ccaggtatta gaagaatatc ctgattcagg tgaaaatatt 360

gttgatgcgc tggcagtgtt cctgcgccgg ttgcattcga ttcctgtttg taattgtcct 420
tttaacagcg atcgcgtatt tcgtctcgct caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg 480
gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa 540
gaaatgcata agcttttgcc attctcaccg gattcagtcg tcactcatgg tgatttctca 600
cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa ttaataggtt gtattgatgt tggacgagtc 660
ggaatcgcag accgatacca ggatcttgcc atcctatgga actgcctcgg tgagttttct 720
ccttcattac agaaacggct ttttcaaaaa tatggtattg ataatcctga tatgaataaa 780
ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt ttc 813

【図面の簡単な説明】

【０１２２】

【図１】変異したHIV-1 gag/pol分子クローンのDNA配列(配列番号：1)。gagpolターミネーターは、配列番号：1の4305位～4307位に位置している。

【図２】野生型（配列番号：2）およびpCMVgagpolBNkanにおける変異したpol領域（配列番号：3）の配列の比較。図における位置#1は、プラスミドpCMVgagpolBNkanにおける2641位である。比較は、1872位のgagイニシエーターATGから始まっている。

【図３】変異したSIV gag分子クローンのDNA配列(SIVgagDX)（配列番号：4）。

【図４】SIVgagDXにおける変異したSIV gag DNA配列の、サル(マカーク)免疫不全ウイルス単離239、クローンλsiv 239-1(GenBankアクセッション番号M33262)由来の野生型SIV配列との比較。コンセンサス配列を配列番号：5に示す。

【図５】レンチウイルス系の見本版のいくつかの構成要素の模式図。BGHポリ(A)：ウシ成長ホルモンポリ(A)シグナル；MSD：変異したスプライス供与部位；Ψ：キャプシド形成シグナル；SD、スプライス供与部位；SA、スプライス受容部位；「X」はこの遺伝子の翻訳が起こらないように一部分のgag遺伝子配列のATGコドンが変異していることを示している。

【図６】パッケージング構築物pCMVgagpolBNkanの模式図。

【図７】転移構築物1：pmBCwCNluciの模式図。矢印により示されているように、パッケージングシグナル、CMVプロモーターおよびルシフェラーゼ遺伝子についてのコード領域は、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを供給している5' HIV-1 LTRおよび3' HIV-1 LTRに隣接している。3つの連続する矢印は、それぞれ、LTRのU5領域、R領域、およびU3領域を示す。LTRの転写される部分は黒で示されている。いくつかの制限エンドヌクレアーゼ切断部位もまた示されている。

【図８】転移構築物2：pmBCmCNluciの模式図。記号は上の通りである。

【図９】パッケージング構築物pCMVgagpolBNkanのDNA配列（配列番号：6）。相補鎖7814位～7002位の翻訳を配列番号：7に示す。

【図１０】転移構築物1：pmBCwCNluciのDNA配列（配列番号：8）。

【図１１】転移構築物2：pmBCmCNluciのDNA配列（配列番号：9）。

【図１２】野生型HIV-1分子クローンHXB2（配列番号：12）およびNL4-3（配列番号：13）、ならびに転移構築物における領域BssHII(711)～ClaI(830)のヌクレオチド配列。Gagタンパク質についての翻訳イニシエーターシグナル(ATG)は下線が引かれている。pmBCwCNluciおよびpmBCmCNluci(転移構築物1および転移構築物2)は、配列mBCwCN（配列番号：10）を含む。転移構築物3は、配列m2BCwCN（配列番号：11）を含む。配列mBCwCNと比較して、m2BCwCNは、5'スプライス部位領域に異なる変異をもち、かつ無傷のGag ATGを有する。コンセンサス配列を配列番号：14に示す。

【図１３】pCMVgagpolBNkan(図ではpCMVBNKanと名付けられている)での一過性トランスフェクションにより細胞から放出される、gagタンパク質のレベルを示す棒グラフ。

【図１４】Rev非依存性gag-pol HIV-1ベクターpCMVgagpolBNkan(図ではpCMVBNKanと名付けられている)由来の逆転写酵素活性を示す棒グラフ。

【図１５】pCMVgagpolBNkan Rev非依存性gag-HIV-1基盤レトロウイルスベクターで形質導入された細胞において検出される、p24 Gagタンパク質のナノグラムあたりのルシフェラーゼ量を示す棒グラフ。結果は、pCMVgagpolBNkan Rev非依存性gag-HIV-1基盤レトロウイ

ルスベクターが、(A)293細胞、(B)ヒトリンパ球様細胞、(C)ヒト骨髄細胞(U937)、ならびに（D）初代ヒトマクロファージのような非分裂細胞において、高形質導入効率を見せることを示している。

【図１６】SIVエンベロープをコードするベクターCMVkan/R-R-SIVgp160CTEの模式図。

【図１７】変異型SIV env遺伝子を含むSIVエンベロープをコードするベクターCMVkan/R-R-SIVgp160CTE（配列番号：15）のDNA配列（翻訳を配列番号：16に示す）。相補鎖6426位～5611位の翻訳を配列番号：17に示す。コード領域を配列番号：18および19にそれぞれ示す。

【図１－１】

ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAAT
TCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAGAAGTACAAGCTAAAGCACATCGTATGGGCAA
GCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGC
TGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAGGAGCT
TCGATCACTATACAACACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCACCAGCGGATCGAGA
TCAAGGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAGTCCAAG
AAGAAGGCCCAGCAGGCAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGCCAAAA
TTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAATGGTACATCAGGCCATATCACCTA
GAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTG
ATACCCATGTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCCACAGGACCTGAACACGAT
GTTGAACACCGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCA
ATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATTGCA
CCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACTACTAGTACCCT
TCAGGAACAAATAGGATGGATGACAAATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAGATCT
ACAAGAGGTGGATAATCCTGGGATTGAACAAGATCGTGAGGATGTATAGCCCTACC
AGCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAACCCTTTAGAGACTATGTAGACCG
GTTCTATAAAACTCTAAGAGCTGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAAATTGGATGA
CAGAAACCTTGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACCATCCTGAAGGCT
CTCGGCCCAGCGGCTACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTAGGAGG
ACCCGGCCATAAGGCAAGAGTTTTGGCCGAGGCGATGAGCCAGGTGACGAACTCGG
CGACCATAATGATGCAGAGGCAACTTCCGGAACCAGCGGAAGATCGTCAAGTGC
TTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCACACCGCCAGGAACTGCCGGGCCCCCCGGAAGAA
GGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATGAAAGATTGTACTGAGAGAC

【図１－２】

AGGCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTT
CTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTCTGGGGT
AGAGACAACAACTCCCCCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAACTGTATCCTT
TAACTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAGTAAGGATCGGGG
GGCAACTCAAGGAAGCGCTGCTCGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAA
ATGAGTTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGGATCGGGGGCTTCAT
CAAGGTGAGGCAGTACGACCAGATACTCATAGAAATCTGTGGACATAAAGCTATAG
GTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACC
CAGATCGGCTGCACCTTGAACTTCCCCATCAGCCCTATTGAGACGGTGCCCGTGAA
GTTGAAGCCGGGGATGGACGGCCCCAAGGTCAAGCAATGGCCATTGACGAAAGAGA
AGATCAAGGCCTTAGTCGAAATCTGTACAGAGATGGAGAAGGAAGGGAAGATCAGC
AAGATCGGGCCTGAGAACCCCTACAACACTCCAGTCTTCGCAATCAAGAAGAAGGA
CAGTACCAAGTGGAGAAAGCTGGTGGACTTCAGAGAGCTGAACAAGAGAACTCAGG
ACTTCTGGGAAGTTCAGCTGGGCATCCCACATCCCGCTGGGTTGAAGAAGAAGAAG
TCAGTGACAGTGCTGGATGTGGGTGATGCCTACTTCTCCGTTCCCTTGGACGAGGA
CTTCAGGAAGTACACTGCCTTCACGATACCTAGCATCAACAACGAGACACCAGGCA
TCCGCTACCAGTACAACGTGCTGCCACAGGGATGGAAGGGATCACCAGCCATCTTT
CAAAGCAGCATGACCAAGATCCTGGAGCCCTTCCGCAAGCAAAACCCAGACATCGT
GATCTATCAGTACATGGACGACCTCTACGTAGGAAGTGACCTGGAGATCGGGCAGC
ACAGGACCAAGATCGAGGAGCTGAGACAGCATCTGTTGAGGTGGGGACTGACCACA
CCAGACAAGAAGCACCAGAAGGAACCTCCCTTCCTGTGGATGGGCTACGAACTGCA
TCCTGACAAGTGGACAGTGCAGCCCATCGTGCTGCCTGAGAAGGACAGCTGGACTG
TGAACGACATACAGAAGCTCGTGGGCAAGTTGAACTGGGCAAGCCAGATCTACCCA
GGCATCAAAGTTAGGCAGCTGTGCAAGCTGCTTCGAGGAACCAAGGCACTGACAGA

【図１－３】

AGTGATCCCACTGACAGAGGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAGAACCGAGAGATCC

TGAAGGAGCCAGTACATGGAGTGTACTACGACCCAAGCAAGGACCTGATCGCAGAG

ATCCAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACCTACCAAATCTACCAGGAGCCCTTCAA

GAACCTGAAGACAGGCAAGTACGCAAGGATGAGGGGTGCCCACACCAACGATGTGA

AGCAGCTGACAGAGGCAGTGCAGAAGATCACCACAGAGAGCATCGTGATCTGGGGC

AAGACTCCCAAGTTCAAGCTGCCCATACAGAAGGAGACATGGGAGACATGGTGGAC

CGAGTACTGGCAAGCCACCTGGATCCCTGAGTGGGAGTTCGTGAACACCCCTCCCT

TGGTGAAACTGTGGTATCAGCTGGAGAAGGAACCCATCGTGGGAGCAGAGACCTTC

TACGTGGATGGGGCAGCCAACAGGGAGACCAAGCTGGGCAAGGCAGGCTACGTGAC

CAACCGAGGACGACAGAAAGTGGTGACCCTGACTGACACCACCAACCAGAAGACTG

AGCTGCAAGCCATCTACCTAGCTCTGCAAGACAGCGGACTGGAAGTGAACATCGTG

ACAGACTCACAGTACGCACTGGGCATCATCCAAGCACAACCAGACCAATCCGAGTC

AGAGCTGGTGAACCAGATCATCGAGCAGCTGATCAAGAAGGAGAAAGTGTACCTGG

CATGGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTAGTC

AGTGCTGGGATCCGGAAGGTGCTGTTCCTGGACGGGATCGATAAGGCCCAAGATGA

ACATGAGAAGTACCACTCCAACTGGCGCGCTATGGCCAGCGACTTCAACCTGCCAC

CTGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGAGAA

GCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGTCCAGGAATATGGCAGCTGGACTGCACGCA

CCTGGAGGGGAAGGTGATCCTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAG

CAGAAGTTATCCCTGCTGAAACTGGGCAGGAAACAGCATATTTTCTTTTAAAATTA

GCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAATACACACGGACAACGGAAGCAACTTCACTGG

TGCTACGGTTAAGGCCGCCTGTTGGTGGGCGGGAATCAAGCAGGAATTTGGAATTC

CCTACAATCCCCAATCGCAAGGAGTCGTGGAGAGCATGAACAAGGAGCTGAAGAAG

ATCATCGGACAAGTGAGGGATCAGGCTGAGCACCTGAAGACAGCAGTGCAGATGGC

【図１－４】

AGTGTTCATCCACAACTTCAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGG

AAAGGATCGTGGACATCATCGCCACCGACATCCAAACCAAGGAGCTGCAGAAGCAG

ATCACCAAGATCCAGAACTTCCGGGTGTACTACCGCGACAGCCGCAACCCACTGTG

GAAGGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAGGGAGAGGGGGCAGTGGTGATCCAGGACA

ACAGTGACATCAAAGTGGTGCCAAGGCGCAAGGCCAAGATCATCCGCGACTATGGA

AAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAGAACCT

GGAAGAGCCTGGTGAAGCACCATATG（配列番号：1）

【図２－１】

```
>野生型  TGTACAGAGA TGGAAAAGGA AGGGAAAATT TCAAAAATTG
>変異型  TGTACAGAGA TGGAGAAGGA AGGGAAGATC AGCAAGATCG
 #1      ..........  ..........  ..........  ..........
                     *           * * ***  * *

>野生型  GGCCTGAAAA TCCATACAAT ACTCCAGTAT TTGCCATAAA
>変異型  GGCCTGAGAA CCCCTACAAC ACTCCAGTCT TCGCAATCAA
 #41     ..........  ..........  ..........  ..........
           *  *  *     *           *  *  *

>野生型  GAAAAAAGAC AGTACTAAAT GGAGAAAATT AGTAGATTTC
>変異型  GAAGAAGGAC AGTACCAAGT GGAGAAAGCT GGTGGACTTC
 #81     ..........  ..........  ..........  ..........
             *  *        *  *           **  *  *  *

>野生型  AGAGAACTTA ATAAGAGAAC TCAAGACTTC TGGGAAGTTC
>変異型  AGAGAGCTGA ACAAGAGAAC TCAGGACTTC TGGGAAGTTC
 #121    ..........  ..........  ..........  ..........
           *  *  *           *

>野生型  AATTAGGAAT ACCACATCCC GCAGGGTTAA AAAAGAAAAA
>変異型  AGCTGGGCAT CCCACATCCC GCTGGGTTGA AGAAGAAGAA
 #161    ..........  ..........  ..........  ..........
          **  *  *     *           *     *  *  *

>野生型  ATCAGTAACA GTACTGGATG TGGGTGATGC ATATTTTTCA
>変異型  GTCAGTGACA GTGCTGGATG TGGGTGATGC CTACTTCTCC
 #201    ..........  ..........  ..........  ..........
          *  *  *           *              *  *  *

>野生型  GTTCCCTTAG ATGAAGACTT CAGGAAATAT ACTGCATTTA
>変異型  GTTCCCTTGG ACGAGGACTT CAGGAAGTAC ACTGCCTTCA
 #241    ..........  ..........  ..........  ..........
                *  *  *           *  *     *  *

>野生型  CCATACCTAG TATAAACAAT GAGACACCAG GGATTAGATA
>変異型  CGATACCTAG CATCAACAAC GAGACACCAG GCATCCGCTA
 #281    ..........  ..........  ..........  ..........
          *           *  *     *              *  **  *

>野生型  TCAGTACAAT GTGCTTCCAC AGGGATGGAA AGGATCACCA
>変異型  CCAGTACAAC GTGCTGCCAC AGGGATGGAA GGGATCACCA
 #321    ..........  ..........  ..........  ..........
          *           *           *              *

>野生型  GCAATATTCC AAAGTAGCAT GACAAAAATC TTAGAGCCTT
>変異型  GCCATCTTTC AAAGCAGCAT GACCAAGATC CTGGAGCCGT
 #361    ..........  ..........  ..........  ..........
            *  *  *     *           *  *  *     *

>野生型  TTAGAAAACA AAATCCAGAC ATAGTTATCT ATCAATACAT
>変異型  TCCGCAAGCA AAACCCAGAC ATCGTGATCT ATCAGTACAT
 #401    ..........  ..........  ..........  ..........
          **  *  *     *           *  *     *
```

【図２－２】

```
>野生型  GGATGATTTG TATGTAGGAT CTGACTTAGA AATAGGGCAG
>変異型  GGACGACCTC TACGTAGGAA GTGACCTGGA GATCGGGCAG
 #441    ..........  ..........  ..........  ..........
          *  **  *     *  *  *     *  *  *     *

>野生型  CATAGAACAA AAATAGAGGA GCTGAGACAA CATCTGTTGA
>変異型  CACAGGACCA AGATCGAGGA GCTGAGACAG CATCTGTTGA
 #481    ..........  ..........  ..........  ..........
            *  *  *  *  *              *

>野生型  GGTGGGGACT TACCACACCA GACAAAAAAC ATCAGAAAGA
>変異型  GGTGGGGACT GACCACACCA GACAAGAAGC ACCAGAAGGA
 #521    ..........  ..........  ..........  ..........
                    *           *  *  *  *     *

>野生型  ACCTCCATTC CTTTGGATGG GTTATGAACT CCATCCTGAT
>変異型  ACCTCCCTTC CTGTGGATGG GCTACGAACT GCATCCTGAC
 #561    ..........  ..........  ..........  ..........
             *           *           *  *        *

>野生型  AAATGGACAG TACAGCCTAT AGTGCTGCCA GAAAAAGACA
>変異型  AAGTGGACAG TGCAGCCCAT CGTGCTGCCT GAGAAGGACA
 #601    ..........  ..........  ..........  ..........
          *           *  *  *           *  *  *

>野生型  GCTGGACTGT CAATGACATA CAGAAGTTAG TGGGGAAATT
>変異型  GCTGGACTGT GAACGACATA CAGAAGCTCG TGGGCAAGTT
 #641    ..........  ..........  ..........  ..........
                *  *           *  *        *  *

>野生型  GAATTGGGCA AGTCAGATTT ACCCAGGGAT TAAAGTAAGG
>変異型  GAACTGGGCA AGCCAGATCT ACCCAGGCAT CAAAGTTAGG
 #681    ..........  ..........  ..........  ..........
          *           *  *  *           *  *  *

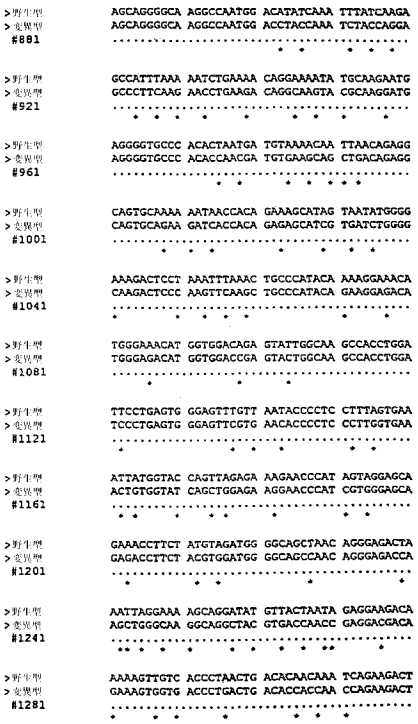
>野生型  CAATTATGTA AACTCCTTAG AGGAACCAAA GCACTAACAG
>変異型  CAGCTGTGCA AGCTGCTTCG AGGAACCAAG GCACTGACAG
 #721    ..........  ..........  ..........  ..........
             **  *  *     *  *              *

>野生型  AAGTAATACC ACTAACAGAA GAAGCAGAGC TAGAACTGGC
>変異型  AAGTGATCCC ACTGACAGAG GAAGCAGAGC TAGAACTGGC
 #761    ..........  ..........  ..........  ..........
             *  *        *  *

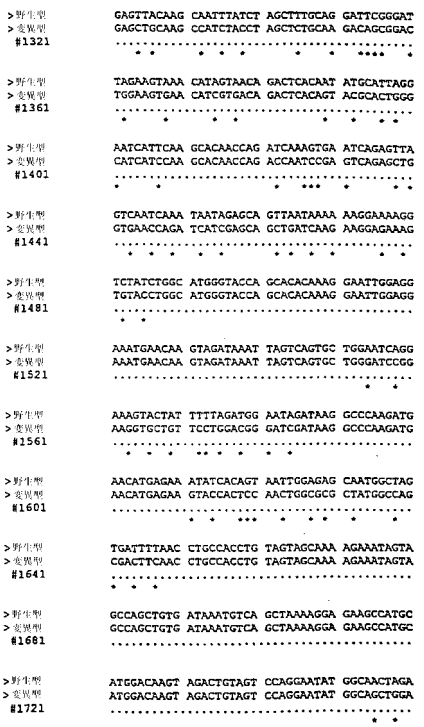
>野生型  AGAAAACAGA GAGATTCTAA AAGAACCAGT ACATGGAGTG
>変異型  AGAGAACCGA GAGATCCTGA AGGAGCCAGT ACATGGAGTG
 #801    ..........  ..........  ..........  ..........
             *  *        *  *  *  *  *

>野生型  TATTATGACC CATCAAAAGA CTTAATAGCA GAAATACAGA
>変異型  TACTACGACC CAAGCAAGGA CCTGATCGCA GAGATCCAGA
 #841    ..........  ..........  ..........  ..........
             *  *        ***  *     *  *  *     *  *
```

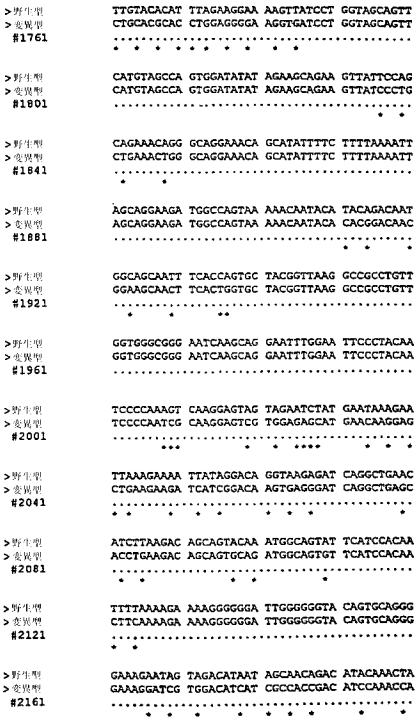
【図２－３】



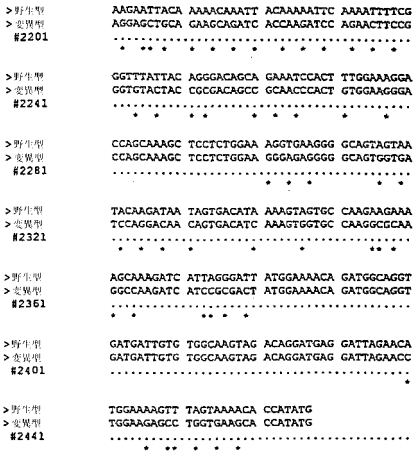
【図２－４】



【図２－５】



【図２－６】



【図３】

```
ATGGGCGTGAGAAACTCCGTCTTGTCAGGGAAGAAAGCAGATGAATTAG
AAAAAATTAGGCTACGACCCAACGGAAAGAAAAAGTACATGTTGAAGC
ATGTAGTATGGGCAGCAAATGAATTAGATAGATTTGGATTAGCAGAAAG
CCTGTTGGAGAACAAAGAAGGATGTCAAAAAATACTTTCGGTCTTAGCT
CCATTAGTGCCAACAGGCTCAGAAAATTTAAAAAGCCTTTATAATACTG
TCTGCGTCATCTGGTGCATTCACGCAGAAGAGAAAGTGAAACACACTGA
GGAAGCAAAACAGATAGTGCAGAGACACCTAGTGGTGGAAACAGGAAC
CACCGAAACCATGCCGAAGACCTCTCGACCAACAGCACCATCTAGCGGC
AGAGGAGGAAACTACCCAGTACAGCAGATCGGTGGCAACTACGTCCAC
CTGCCACTGTCCCCGAGAACCCTGAACGCTTGGGTCAAGCTGATCGAGG
AGAAGAAGTTCGGAGCAGAAGTAGTGCCAGGATTCCAGGCACTGTCAG
AAGGTTGCACCCCCTACGACATCAACCAGATGCTGAACTGCGTTGGAGA
CCATCAGGCGGCTATGCAGATCATCCGTGACATCATCAACGAGGAGGCT
GCAGATTGGGACTTGCAGCACCCACAACCAGCTCCACAACAAGGACAA
CTTAGGGAGCCGTCAGGATCAGACATCGCAGGAACCACCTCCTCAGTTG
ACGAACAGATCCAGTGGATGTACCGTCAGCAGAACCCGATCCCAGTAGG
CAACATCTACCGTCGATGGATCCAGCTGGGTCTGCAGAAATGCGTCCGT
ATGTACAACCCGACCAACATTCTAGATGTAAAACAAGGGCCAAAAGAG
CCATTTCAGAGCTATGTAGACAGGTTCTACAAAAGTTTAAGAGCAGAAC
AGACAGATGCAGCAGTAAAGAATTGGATGACTCAAACACTGCTGATTCA
AAATGCTAACCCAGATTGCAAGCTAGTGCTGAAGGGGCTGGGTGTGAAT
CCCACCCTAGAAGAAATGCTGACGGCTTGTCAAGGAGTAGGGGGGCCG
GGACAGAAGGCTAGATTAATGGCAGAAGCCCTGAAAGAGGCCCTCGCA
CCAGTGCCAATCCCTTTTGCAGCAGCCCAACAGAGGGGACCAAGAAAGC
CAATTAAGTGTTGGAATTGTGGGAAAGAGGGACACTCTGCAAGGCAATG
CAGAGCCCCAAGAAGACAGGGATGCTGGAAATGTGGAAAAATGGACCA
TGTTATGGCCAAATGCCCAGACAGACAGGCGGGTTTTTTAGGCCTTGGT
CCATGGGGAAAGAAGCCCCGCAATTTCCCCATGGCTCAAGTGCATCAGG
GGCTGATGCCAACTGCTCCCCCAGAGGACCCAGCTGTGGATCTGCTAAA
GAACTACATGCAGTTGGGCAAGCAGCAGAGAGAAAAGCAGAGAGAAAG
CAGAGAGAAGCCTTACAAGGAGGTGACAGAGGATTTGCTGCACCTCAAT
TCTCTCTTTGGAGGAGACCAGTAG
```

【図４－１】

```
SIV gag  ----------------------------------------
 #1      ........................................
         ATGGGCGTGAGAAACTCCGTCTTGTCAGGGAAGAAAGCAG

SIV gag  ----------------------------------------
 #41     ........................................
         ATGAATTAGAAAAAATTAGGCTACGACCCAACGGAAAGAA

SIV gag  ----------------------------------------
 #81     ........................................
         AAAGTACATGTTGAAGCATGTAGTATGGGCAGCAAATGAA

SIV gag  ----------------------------------------
 #121    ........................................
         TTAGATAGATTTGGATTAGCAGAAAGCCTGTTGGAGAACA

SIV gag  ----------------------------------------
 #161    ........................................
         AAGAAGGATGTCAAAAAATACTTTCGGTCTTAGCTCCATT

SIV gag  ----------------------------------------
 #201    ........................................
         AGTGCCAACAGGCTCAGAAAATTTAAAAAGCCTTTATAAT

SIV gag  ----------------------------------------
 #241    ........................................
         ACTGTCTGCGTCATCTGGTGCATTCACGCAGAAGAGAAAG

SIV gag  ----------------------------------------
SIVgagDX..                          ----------
 #281    ........................................
         TGAAACACACTGAGGAAGCAAAACAGATAGTGCAGAGACA

SIV gag  ----------A--A-----T-----A--A
SIVgagDX..---------C--C-----C-----G--G
 #321    ........................................
         CCTAGTGGTGGAAACAGGAACMACMGAAACYATGCCRAAR

SIV gag  --AAG-A-----------------------------------
SIVgagDX..--CTC-C-----------------------------------
 #361    ........................................
         ACMWSTMGACCAACAGCACCATCTAGCGGCAGAGGAGGAA
```

【図４－２】

```
SIV gag  -T----------A--A--A----------T--------
SIVgagDX..-C----------G--G--C----------C--------
 #401    ........................................
         AYTACCCAGTACARCARATMGGTGGTAACTAYGTCCACCT

SIV gag  ----T-AAG---------AT-A--T--C-----A--AT--
SIVgagDX..----C-GTC---------CC-G--C--T-----C--GC--
 #441    ........................................
         GCCAYTRWSCCCGAGAACMYTRAAYGCYTGGGTMAARYTG

SIV gag  --A-----A-----A--T----------------------
SIVgagDX..--C-----G-----G--C----------------------
 #481    ........................................
         ATMGAGGARAAGAARTTYGGAGCAGAAGTAGTGCCAGGAT

SIV gag  -T------------------------------T-----T--
SIVgagDX..-C------------------------------C-----C--
 #521    ........................................
         TYCAGGCACTGTCAGAAGGTTGCACCCCCTAYGACATYAA

SIV gag  T------T-A--T--T--G----------A---------
SIVgagDX..C------C-G--C--C--T----------G---------
 #561    ........................................
         YCAGATGYTRAAYTGYGTKGGAGACCATCARGCGGCTATG

SIV gag  -----T---A-A--T--T--A----------------------
SIVgagDX..-----C---C-T--C--C--C----------------------
 #601    ........................................
         CAGATYATCMGWGAYATYATMAACGAGGAGGCTGCAGATT

SIV gag  ----------------------------------------
SIVgagDX..----------------------------------------
 #641    ........................................
         GGGACTTGCAGCACCCACAACCAGCTCCACAACAAGGACA

SIV gag  ----------T--T--------A--T
SIVgagDX..----------C--C--------C--C
 #681    ........................................
         ACTTAGGGAGCCGTCAGGATCAGAYATYGCAGGAACMACY

SIV gag  AGT-----A--T-----A----------A-A--A-
SIVgagDX..TCC-----T--C-----G----------C-T--G-
 #721    ........................................
         WSYTCAGTWGAYGAACARATCCAGTGGATGTACMGWCARC
```

【図４－３】

```
SIV gag  -------C--A----------T---A-GA-------
SIVgagDX..-------G--C----------C---C-TC-------
 #761    ........................................
         AGAACCCSATMCCAGTAGGCAACATYTACMGKMGATGGAT

SIV gag  ---A-----GT----A--A--T--CA-A-----T-----A
SIVgagDX..---G-----TC----G--G--C--TC-T-----C-----G
 #801    ........................................
         CCARCTGGGKYTGCARAARTGYGTYMGWATGTAYAACCCR

SIV gag  --A-------------------------------------
SIVgagDX..--C--------------------
 #841    ........................................
         ACMAACATTCTAGATGTAAAACAAGGGCCAAAAGAGCCAT

SIV gag  ----------------------------------------
 #881    ........................................
         TTCAGAGCTATGTAGACAGGTTCTACAAAAGTTTAAGAGC

SIV gag  ----------------------------------------
 #921    ........................................
         AGAACAGACAGATGCAGCAGTAAAGAATTGGATGACTCAA

SIV gag  ----------------------------------------
 #961    ........................................
         ACACTGCTGATTCAAAATGCTAACCCAGATTGCAAGCTAG

SIV gag  ----------------------------------------
 #1001   ........................................
         TGCTGAAGGGGCTGGGTGTGAATCCCACCCTAGAAGAAAT

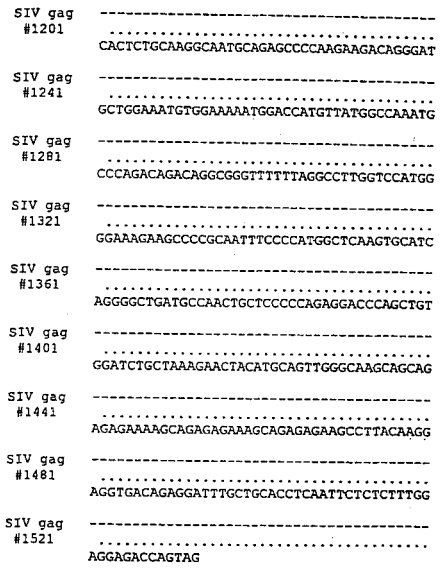
SIV gag  ----------------------------------------
 #1041   ........................................
         GCTGACGGCTTGTCAAGGAGTAGGGGGGCCGGGACAGAAG

SIV gag  ----------------------------------------
 #1081   ........................................
         GCTAGATTAATGGCAGAAGCCCTGAAAGAGGCCCTCGCAC

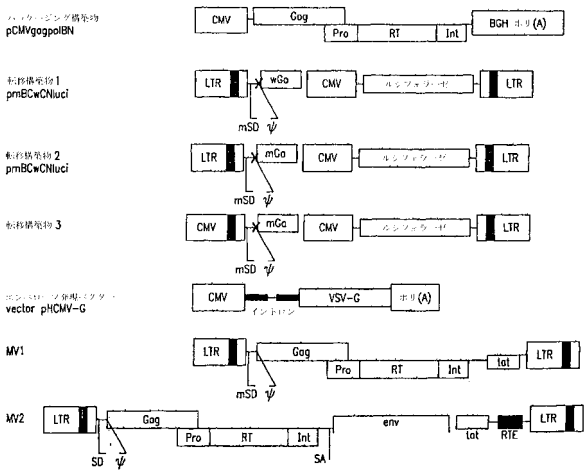
SIV gag  ----------------------------------------
 #1121   ........................................
         CAGTGCCAATCCCTTTTGCAGCAGCCCAACAGAGGGGACC

SIV gag  ----------------------------------------
 #1161   ........................................
         AAGAAAGCCAATTAAGTGTTGGAATTGTGGGAAAGAGGGA
```

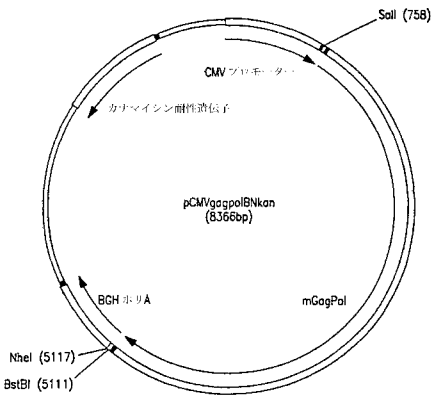
【図４－４】



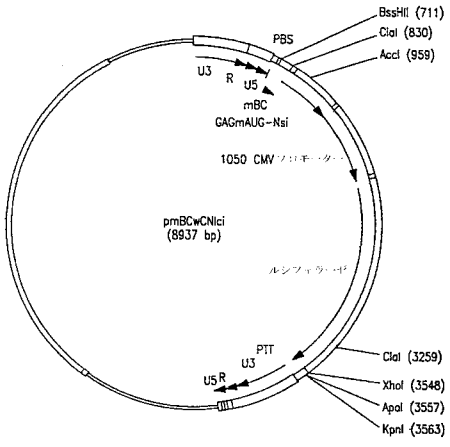
【図５】



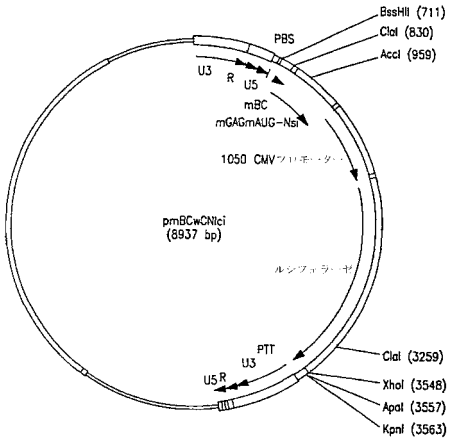
【図６】



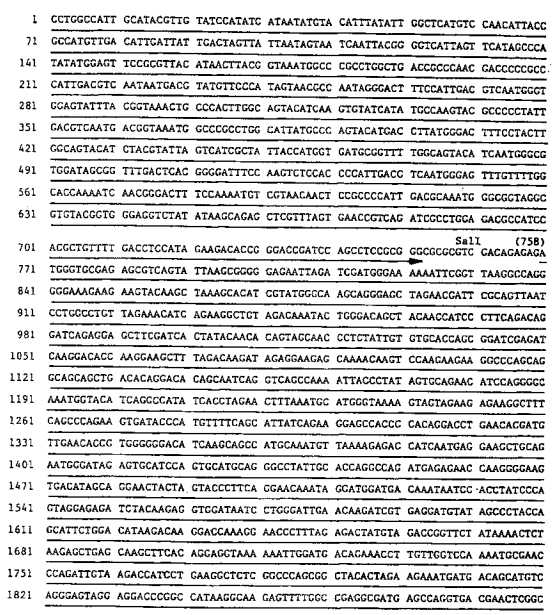
【図７】



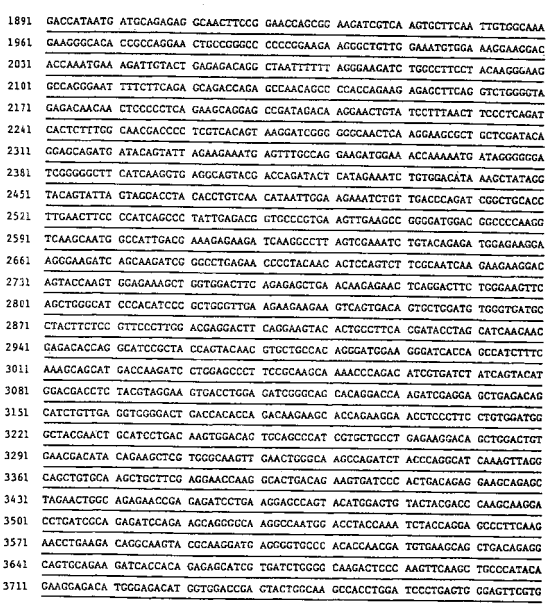
【図８】



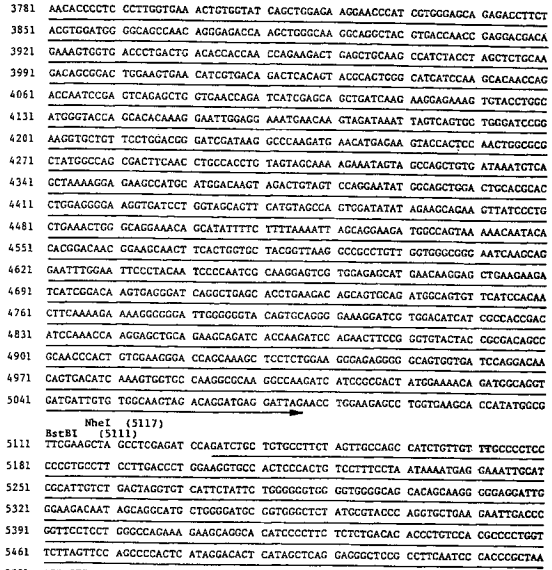
【図９－１】



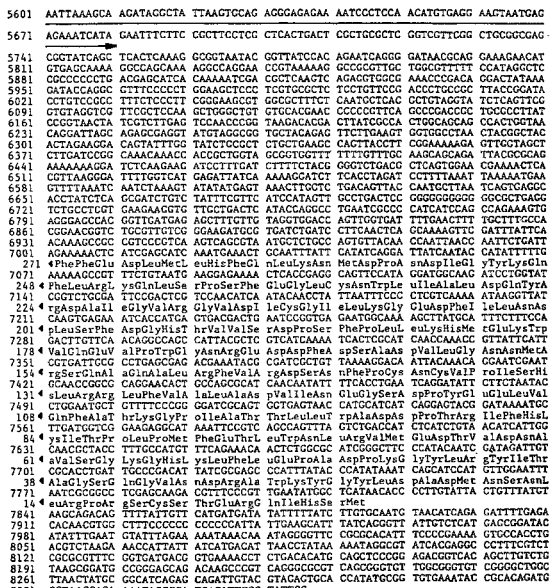
【図９－２】



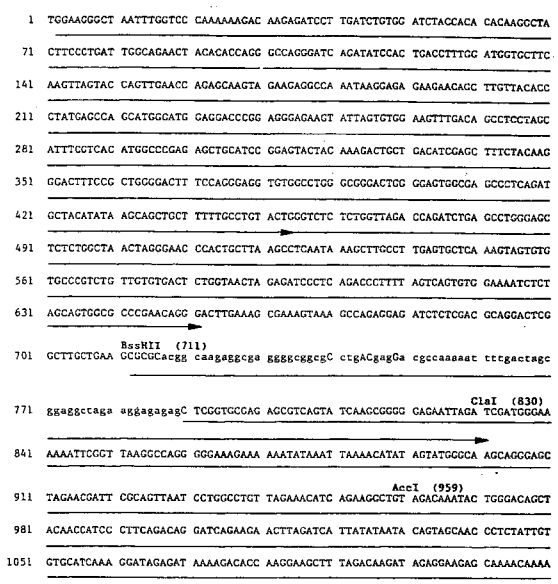
【図９－３】



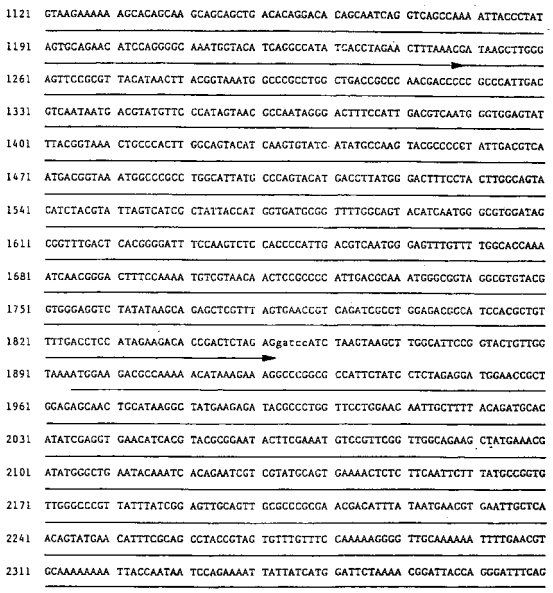
【図９－４】



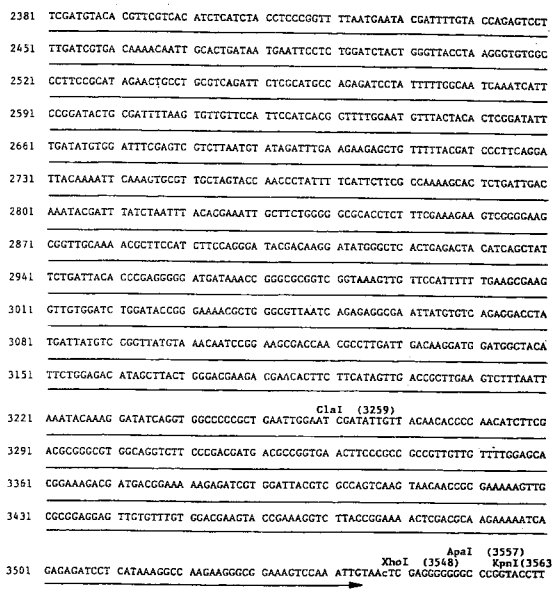
【図１０－１】



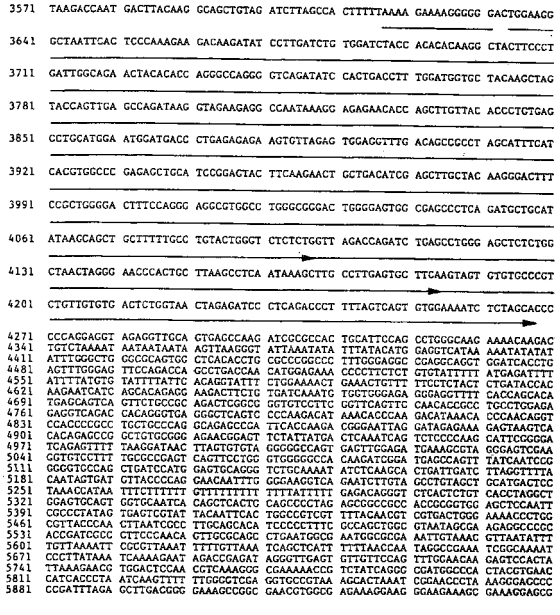
【図１０－２】



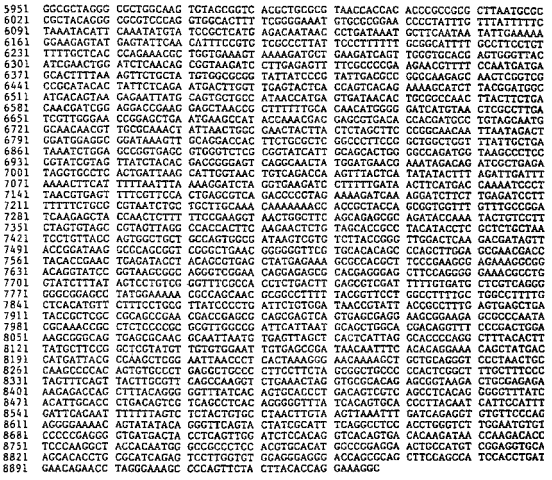
【図１０－３】



【図１０－４】



【図１０－５】



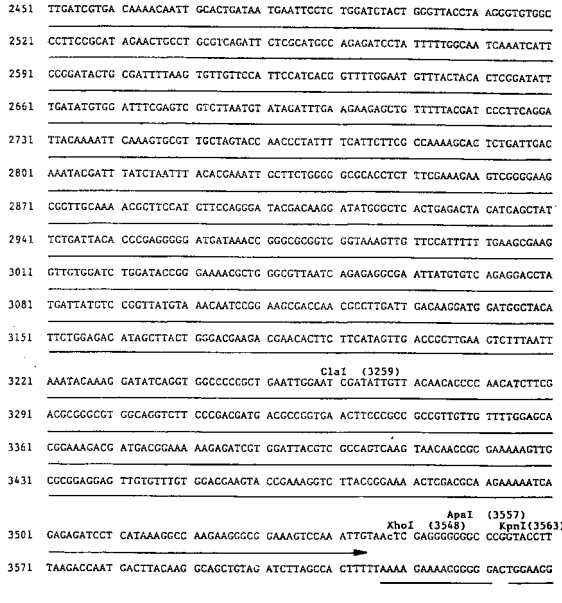
【図１１－１】



【図１１－２】



【図１１－３】



【図１１－４】

```
3641  GCTAATTCAC TCCCAAAGAA GACAAGATAT CCTTGATCTG TGGATCTACC ACACACAAGG CTACTTCCCT

3711  GATTGGCAGA ACTACACACC AGGGCCAGGG GTCAGATATC CACTGACCTT TGGATGGTGC TACAAGCTAG

3781  TACCAGTTGA GCCAGATAAG GTAGAAGAGG CCAATAAAGG AGAGAACACC AGCTTGTTAC ACCCTGTGAG

3851  CCTGCATGGA ATGGATGACC CTGAGAGAGA AGTGTTAGAG TGGAGGTTTG ACAGCCGCCT AGCATTTCAT

3921  CACGTGGCCC GAGAGCTGCA TCCGGAGTAC TTCAAGAACT GCTGACATCG AGCTTGCTAC AAGGGACTTT

3991  CCGCTGGGGA CTTTCCAGGG AGGCGTGGCC TGGGCGGGAC TGGGGAGTGG CGAGCCCTCA GATGCTGCAT

4061  ATAAGCAGCT GCTTTTTGCC TGTACTGGGT CTCTCTGGTT AGACCAGATC TGAGCCTGGG AGCTCTCTGG

4131  CTAACTAGGG AACCCACTGC TTAAGCCTCA ATAAAGCTTG CCTTGAGTGC TTCAAGTAGT GTGTGCCGT

4201  CTGTTGTGTG ACTCTGGTAA CTAGAGATCC CTCAGACCCT TTTAGTCAGT GTGGAAAATC TCTAGCACCC

4271  CCCAGGAGGT ACAGGTTGCA GTGAGCCAAG ATCGCGCCAC TGCATTCCAG CCTGGGCAAG AAAACAAGAC
4341  TGTCTAAAAT AATAATAATA AGTTAAGGGT ATTAAATATA TTTATACATG GAGGTCATAA AAATATATAT
4411  ATTTGGGCTG GGCGCAGTGG CTCACACCTG CGCCCGGGCC TTTGGGAGGC CGAGGCAGGT GGATCACCTG
4481  AGTTTGGGAG TTCGAGACCA GCCTGACCAA CATGGAGAAA CCCCTCTCTC GTGTATTTTT AGTAGATTTT
4551  ATTTTATGTG TATTTTATTC ACAGGTATTT CTGGAAAACT GAAACTGTTT TTCCTCTACT CTGATACCAC
4621  AAGAATCATC AGCACAGAGG AAGACTTCTC TCATCAAATG TGGTGGGAGA GGGAGGTTTT CACCAGCACA
4691  TGAGCAGTCA GTTCTGCCGC AGACTCGGCG GGTGTCCTTC GGTTCAGTTC CAACACCGCC TGCCTGGAGA
4761  GAGGTCAGAC CACAGGGTCA CGGCTCAGTC CCCAAGACAT AAACACCCAA GACATAAACA CCCAACAGCT
4831  CCACCCCGGC TGCTGCCCAG GCAGAGCCGA TTCACCAAGA CGGGAATTAG GATAGAGAAA GAGTAAGTCA
4901  CACAGAGCCG GCTGTGCGGG AGAACGGAGT TCTATTATGA CTCAAATCAG TCTCCCCAAG CATTCGGGGA
4971  TCAGAGTTTT TAAGGATAAC TTAGTGTGTA GGGGGCCAGT GAGTTGGAGA TGAAAGCGTA GGGAGTCGAA
5041  GCTGTCCTTT TGCGCCGAGT CAGTTCCTGG GTGGGGGCCA GAAGATCGGA TGAGGCAGTT TATCAATCCG
5111  GGGGTGCCAG CTGATCGATG GAGTGCAGGG TCTGCAAAAT ATCTCAAGCA CTGATTGATC TTAGGTTTTA
5181  CAATAGTGAT GTTACCCCAG GAACAATTTG GGGAAGGTCA GAATCTTGTA GCCTGTAGCT GCATGACTCC
5251  TAAACCATAA TTTCTTTTTT GTTTTTTTTT TTTTATTTTT GAGACAGGGT CTCACTGTGT CACGTAGGCT
5321  GGAGTGCAGT GGTGCAATCA CAGCTCACTG CAGCCCCTAG AGCGGCCGGC ACCGGCGGTGG AGCTCCAATT
5391  CGCGCTATAG TGAGTCCTAT TAGAATTCAG TGGCCGTCGT TTTACAACGT CGTGACTGGG AAAACCCTGG
5461  CGTTACCCAA CTTAATCGCC TTGCAGCACA TCCCCCTTTC GCCAGCTGGC GTAATAGCGA AGAGGCCCGC
5531  ACCGATCGCC CTTCCCAACA GTTGCGCAGC CTGAATGGCG AATGGGCGGA AATTGTAAAC GTTAATATTT
5601  TGTTAAAATT CGCGTTAAAT TTTTGTTAAA TCAGCTCATT TTTTAACCAA TAGGGCGAAA TCGGCAAAAT
5671  CCCTTATAAA TCAAAAGAAT AGACCGAGAT AGGGTTGAGT GTTGTTCCAG TTTGGAACAA GAGTCCACTA
5741  TTAAAGAACG TGGACTCCAA CGTCAAAGGG CGAAAAACCG TCTATCAGGG CGATGGCCCA CTACGTGAAC
5811  CATCACCCTA ATCAAGTTTT TTGGGGTCGA GGTGCCGTAA AGCACTAAAT CGGAACCCTA AAGGGAGCCC
5881  CCGATTTAGA GCTTGACGGG GAAAGCCGGC GAACGTGGCG AGAAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGGAGCG
5951  GGCGCTAGGG CGCTGGCAAG TGTAGCGGTC ACGCTGCGCG TAACCACCAC ACCCGCCGCG CTTAATGCGC
6021  CGCTACAGGG CGCGTCCGAG GTGGCAGTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTC
6091  TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA
```

【図１１－５】

```
6161  GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT GCCTTCCTGT
6231  TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTTAC
6301  ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA
6371  GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG TATTATCCGC GGGCAAGAGC AACTCGGTCG
6441  CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC
6511  ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC TTACTTCTGA
6581  CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATCGGG GATCATGTAA CTCGCCTTGA
6651  TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGTAGCAATG
6721  GCAACAACGT TGCGCAAACT ATTAACTGGC GAACTACTTA CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATAGACT
6791  GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA
6861  TAAATCTGGA GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC
6931  CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA
7001  TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT AGATTGATTT
7071  AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC CAAAATCCCT
7141  TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT
7211  TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT GTTTGCCGGA
7281  TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAAA TACTGTCCTT
7351  CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA
7421  TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTCGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA GACGATAGTT
7491  ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGA GCGAACGACC
7561  TACACCGAAC TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG
7631  ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG
7701  GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG
7771  GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG
7841  CTCACATGTT CTTTCCTGCG TTATCCCCTG ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG AGTGAGCTGA
7911  TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA GCGCCCAATA
7981  CGCAAACCGC CTCTCCCCGC GCGTTGGCCG ATTCATTAAT GCAGCTGGCA CGACAGGTTT CCCGACTGGA
8051  AAGCGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATG TGAGTTAGCT CACTCATTAG GCACCCCAGG CTTTACACTT
8121  TATGCTTCCG GCTCGTATGT TGTGTGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC
8191  CATGATTACG CCAAGCTCGG AATTAACCCT CACTAAAGGG AACAAAAGCT GCTGCAGGGT CCCTAACTGC
8261  CAAGCCCCAC AGTGTGCCCT GAGGCTGCCC CTTCCTCTTA GCGGCTGCCC CCACTCGGCT TTGCTTTCCC
8331  TAGTTTCAGT TACTTGCGTT CAGCCAAGGT CTGAAACTAG GTGCCCACAG AGCGGTAAGA CTGCGAGAGA
8401  AAGAGACCAG CTTTACAGGG GGTTTATCAC AGTGCACCCT GACAGTGCTC AGCCTCACAG GCGGTTTATC
8471  ACATTGCACC CTGACAGTCC TCAGCCTCAC AGGGGGTTTA TCACAGTGCA CCCTTACAAT CATTCCATTT
8541  GATTCACAAT TTTTTTAGTC TCTACTGTGC CTAACTTGTA AGTTAAATTT GATCAGAGGT GTGTTCCCAG
8611  AGGGCAAAAC AGTATATACA GGGTTCAGTA CTATCGCATT TCAGGCCTCC AGCTGGGTCT TGGAATGTGT
8681  CCGCCGAGGG GTGATGACTA CCTCAGTTGG ATCTCCACAG GTCACAGTGA CACAAGATAA CCAAGACACC
8751  TCCCAAGGCT ACCACAATGG GCCGCCCTCC ACCTGCACAT GGCCGGAGGA ACTGCCATCT CGGAGGTGCA
8821  AGCACACCTG CGCATCAGAG TCCTTGGTGT GGAGGGAGGG ACCAGCGCAG CTTCCAGCCA TCCACCTGAT
8891  GAACAGAACC TAGGGAAAGC CCCAGTTCTA CTTACACCAG GAAAGGC
```

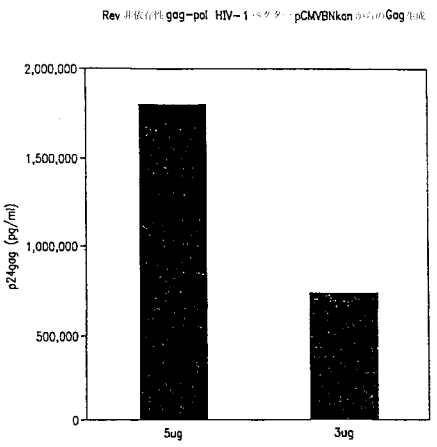
【図１２】

```
mBCwCN 断片   ---------- ---------- --------C- --AC---G-- ----------
m2BCwCN 断片  ---------- ---------- --------C- ---G---G-- ----------
BC/HXB2       ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BC/NL43       ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
#1            ..........................................................
              CGCGCACGGC AAGAGGCGAG GGGCGGCGAC TGGTGAGTAC GCCAAAAATT

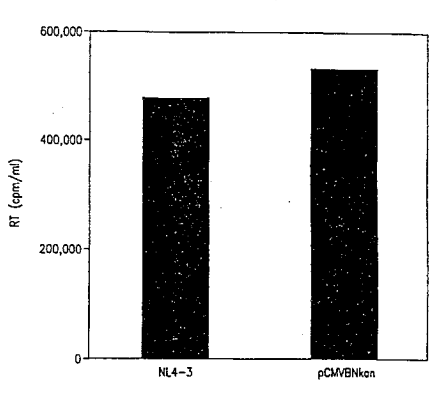
mBCwCN 断片   ---------- ---------- ---------C- C---------- ----------
m2BCwCN 断片  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BC/HXB2       -------T-- ---------- ---------- ---------- ----------
BC/NL43       ---------- ---------- ---------- ---------- -----G----
#51           ..........................................................
              TTGACTAGCG GAGGCTAGAA GGAGAGAGAT GGGTGCGAGA GCGTCAGTAT

mBCwCN 断片   ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
m2BCwCN 断片  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BC/HXB2       ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BC/NL43       ---------- ---------- AA-------- ---------- ----------
#101          ..........................................................
              TAAGCGGGGG AGAATTAGAT CG
```

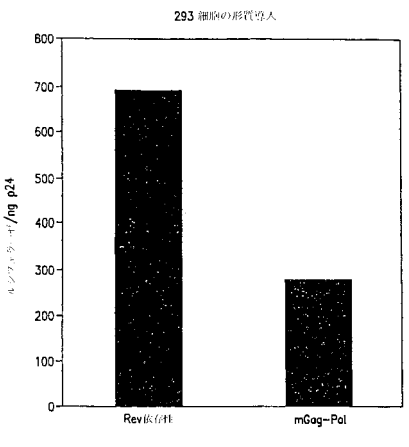
【図１３】



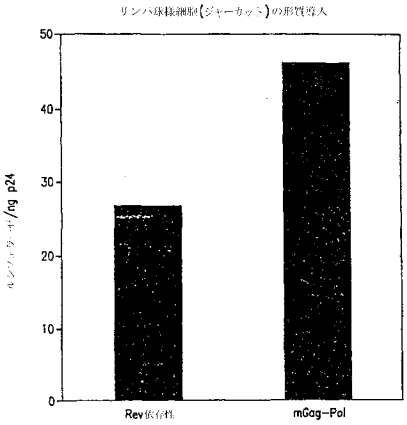
【図１４】



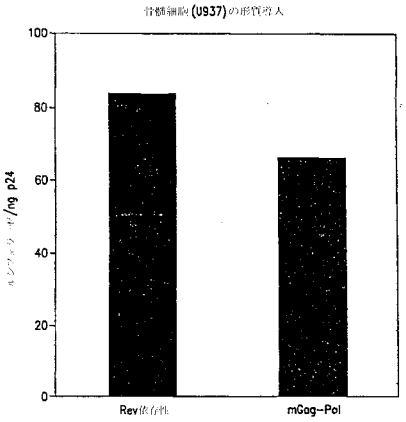
【図１５Ａ】



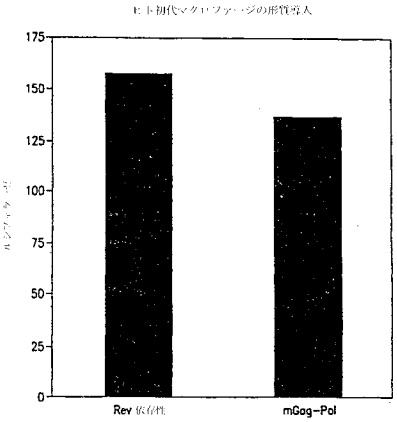
【図１５Ｂ】



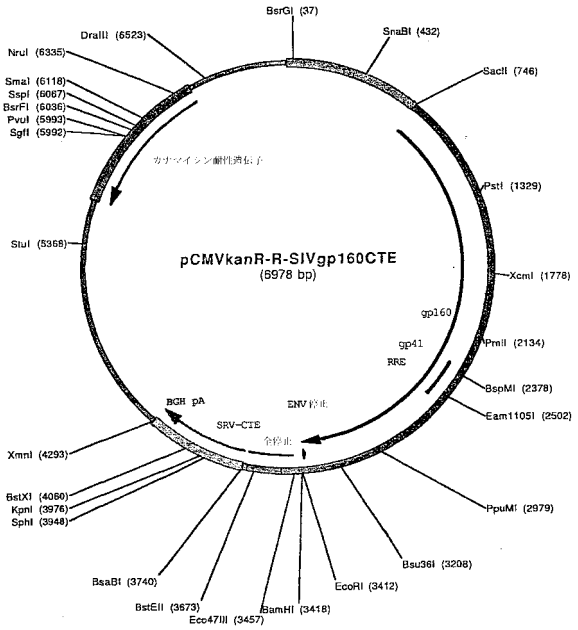
【図１５Ｃ】



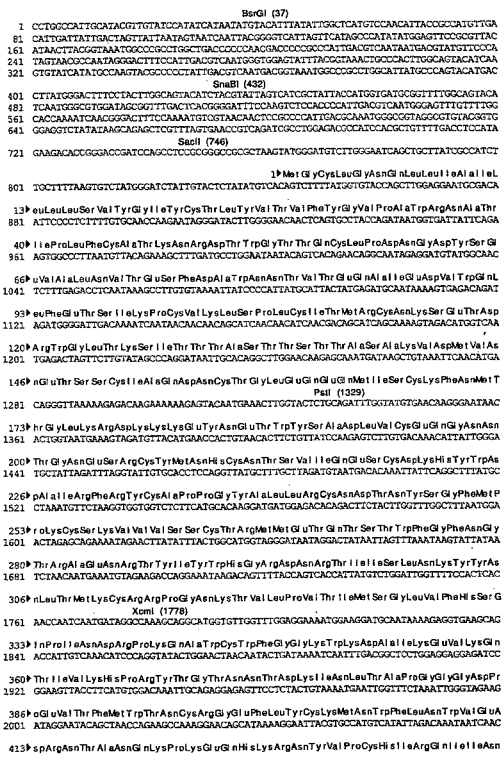
【図１５Ｄ】



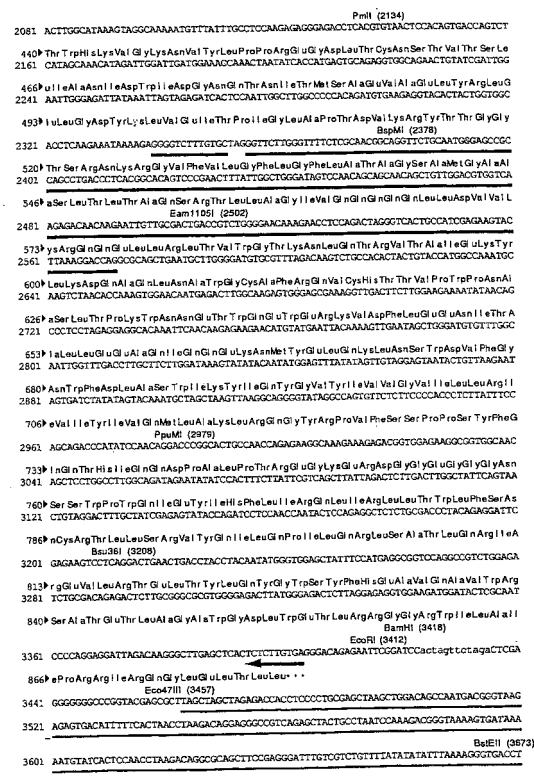
【図１６】



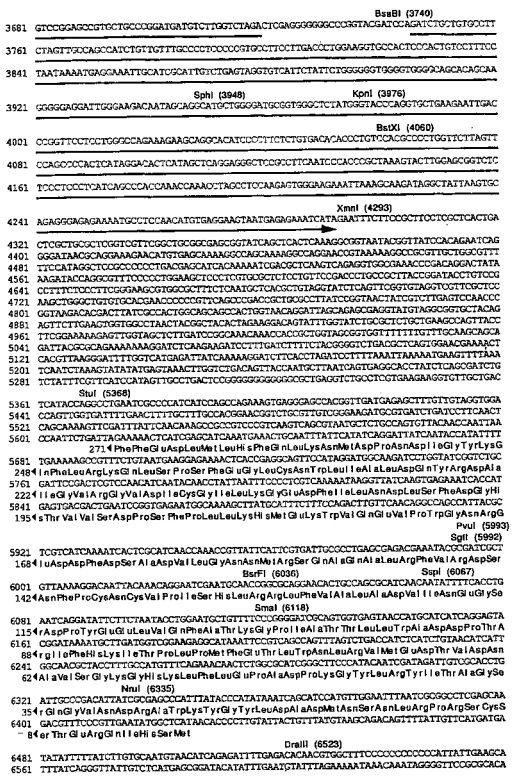
【図１７－１】



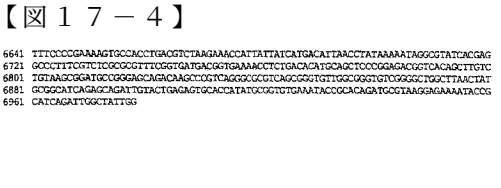
【図１７－２】



【図１７－３】



【図１７－４】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
Ａ６１Ｐ 37/04 (2006.01) Ａ６１Ｐ 37/04

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表平０７－５０９１２１（ＪＰ，Ａ）
特表２００３－５１７８３９（ＪＰ，Ａ）
J. Virol., １９９９年, vol.73, no.11, p.9145-9152
J. Virol., １９９７年, vol.71, no.7, p.4892-4903
IXth Int. Conf. AIDS and IVth STD World Cong. Abst. Book, １９９３年, p.19 [WS-A03-5]
Natl. Conf. Hum. Retrovirus Relat. Infect.(2nd), １９９５年, p.91 [201]
Hum. Gene Ther., ２０００年, vol.11, no.17, p.2403-2413
Science, １９９６年, vol.272, no.5259, p.263-267
Nucleic Acids Res., １９９５年, vol.23, no.4, p.628-633
J. Virol., １９９８年, vol.72, no.11, p.8873-8883
J. Virol., １９９１年, vol.65, no.10, p.5305-5313
J. Virol., １９９２年, vol.66, no.12, p.7176-7182

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-15/90
UniProt/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed