

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4601956号
(P4601956)

(45) 発行日 平成22年12月22日(2010.12.22)

(24) 登録日 平成22年10月8日(2010.10.8)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 07 K	14/16	(2006.01)	C 07 K	14/16	
C 07 K	19/00	(2006.01)	C 07 K	19/00	
A 61 K	39/21	(2006.01)	A 61 K	39/21	
A 61 P	31/18	(2006.01)	A 61 P	31/18	

請求項の数 21 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2003-528849 (P2003-528849)
(86) (22) 出願日	平成14年9月18日 (2002.9.18)
(65) 公表番号	特表2005-511019 (P2005-511019A)
(43) 公表日	平成17年4月28日 (2005.4.28)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2002/010592
(87) 國際公開番号	W02003/025003
(87) 國際公開日	平成15年3月27日 (2003.3.27)
審査請求日	平成17年9月13日 (2005.9.13)
(31) 優先権主張番号	PCT/GB01/04207
(32) 優先日	平成13年9月20日 (2001.9.20)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)
(31) 優先権主張番号	0129604.5
(32) 優先日	平成13年12月11日 (2001.12.11)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)

(73) 特許権者	397009934 グラクソ グループ リミテッド G LAXO G R O U P L I M I T E D イギリス ミドルセックス ユービー6 Oエヌエヌ グリーンフォード バークレー アベニュー グラクソ ウエルカム ハウス (番地なし) G l a x o W e l l c o m e H o u s e , B e r k e l e y A v e n u e G r e e n f o r d , M i d d l e s e x U B 6 O N N , G r e a t B r i t a i n
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIV-GAGのコドン最適化DNAワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

HIV-1のgagタンパク質又は少なくとも8アミノ酸長を有し抗原性を有するその断片、HIV-1 Nefタンパク質又は少なくとも8アミノ酸長を有し抗原性を有するその断片、及びRTタンパク質又は少なくとも8アミノ酸長を有し抗原性を有するその断片をコードし、かつそのコード配列をRT、Nef、gagの順番で含む、異種プロモーターに機能し得る形で連結されたヌクレオチド配列からなる核酸。

【請求項 2】

gagタンパク質がp17を含む、請求項1に記載の核酸。

【請求項 3】

gagタンパク質がさらにp24を含む、請求項2に記載の核酸。

【請求項 4】

gag配列が、高度に発現されるヒト遺伝子におけるコドン使用に類似するようにコドン最適化されており、前記ヌクレオチド配列が0.5を上回るRSCU値を有する、請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸。

【請求項 5】

RT配列又はその断片が、高度に発現されるヒト遺伝子に類似するようにコドン最適化されている、請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸。

【請求項 6】

高度に発現されるヒト遺伝子に類似するようにコドン最適化されたRT、Nefトランケー

10

20

ト、高度に発現されるヒト遺伝子におけるコドン使用に類似するようにコドン最適化されたgag p17、p24をこの順番で含むヌクレオチド配列からなる核酸であって、Nefトラン��ートはNefのN末端の65個のアミノ酸をコードするヌクレオチドが除去されているNef遺伝子の断片である、核酸。

【請求項 7】

異種プロモーターがHCMV IE遺伝子に由来するプロモーターである、請求項1～6のいずれか1項に記載の核酸。

【請求項 8】

前記プロモーターの5'がエキソン1を含む、請求項7に記載の核酸。

【請求項 9】

RTが、逆転写酵素活性を不活性化する突然変異をコードする、請求項1～8のいずれか1項に記載の核酸。

【請求項 10】

RTが、トリプトファン229がリジンへと置換されることによって突然変異している、請求項9に記載の核酸。

【請求項 11】

請求項1～10のいずれか1項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 12】

ウイルスベクターである、請求項11に記載のベクター。

【請求項 13】

複製欠陥型アデノウイルスである、請求項12に記載のウイルスベクター。

【請求項 14】

二本鎖DNAプラスミドである請求項11に記載のベクター。

【請求項 15】

請求項1～10のいずれか1項に記載の核酸によってコードされるタンパク質。

【請求項 16】

請求項1～10のいずれか1項に記載の核酸又は請求項11～14のいずれか1項に記載のベクター、及び製薬上許容し得る賦形剤、希釈剤、担体もしくはアジュバントを含む医薬組成物。

【請求項 17】

筋肉内又は皮内送達に適合させた請求項16に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記担体が金ビーズである請求項16又は17に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

請求項16、17又は18に記載の医薬組成物を含む皮内送達デバイス。

【請求項 20】

医療における使用のための、請求項1～10のいずれか1項に記載の核酸、請求項11～14のいずれか1項に記載のベクター、又は請求項16～18のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 21】

HIV-1のgagタンパク質又は少なくとも8アミノ酸長を有し抗原性を有するその断片、HIV-1 Nefタンパク質又は少なくとも8アミノ酸長を有し抗原性を有するその断片、及びRTタンパク質又は少なくとも8アミノ酸長を有し抗原性を有するその断片をコードし、かつそのコード配列をRT、Nef、gagの順番で含むヌクレオチド配列からなる核酸を、異種プロモーターに機能し得る形で連結することを含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の核酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸構築物、かかる構築物を含む宿主細胞及び核酸ワクチンにおけるその使

10

20

30

40

50

用に関する。本発明はさらに、そのような構築物を含むワクチン製剤及び医薬におけるそのような製剤の使用に関する。本発明は特に、HIV感染の予防及び治療において、より具体的には粒子を介する送達により投与される場合に、有用であるDNAワクチンに関する。

【背景技術】

【0002】

HIV-1は世界の主要な健康問題の1つとして見なされている後天性免疫不全症候群(AIDS)の主要な原因である。ワクチンを製造するために世界中で徹底的な研究が行われているが、そのような努力はこれまで成功していない。

【0003】

HIV-1の非エンベロープタンパク質が記載されており、例えば、gag及びpol遺伝子の産物などの内部構造タンパク質並びに、Rev、Nef、Vif及びTat(Greenら、New England J. Med, 324, 5, 308 et seq(1991)及びBryantら(Pizzo編)、Pediatr. Infect. Dis. J., 11, 5, 390 et seq(1992))などの他の非構造タンパク質が挙げられる。

【0004】

Gag遺伝子は全長RNAから翻訳されて、前駆体ポリタンパク質になり、続いて、3~5個のキャプシドタンパク質；マトリックスタンパク質、キャプシドタンパク質及び核酸結合タンパク質及びプロテアーゼ(1. Fundamental Virology, Fields BN, Knipe DM及びHowley M, 1996、2. Fields Virology vol 2, 1996)へと切断される。

【0005】

gag遺伝子は、スプライシングされていないウイルスmRNAから発現される、p55とも呼ばれる55キロダルトン(kD)のGag前駆体タンパク質を生じる。翻訳中に、p55のN末端がミリストイル化され、それによって細胞膜の細胞質面との結合が引き起こされる。膜結合したGagポリタンパク質は、感染細胞の表面からのウイルス粒子の発芽の引き金を弾く他のウイルスタンパク質及び細胞タンパク質と共に2コピーのウイルス遺伝子RNAを収集する。発芽後、p55は、ウイルス成熟のプロセス中に、ウイルスによりコードされたプロテアーゼ(pol遺伝子の産物)により、MA(マトリックス[p17])、CA(キャプシド[p24])、NC(ヌクレオキャプシド[p9])、及びp6と呼ばれる4つのより小さいタンパク質へと切断される(4)。

【0006】

3つの主要なGagタンパク質に加えて、全てのGag前駆体はいくつかの他の領域を含み、それらは切り出されて、様々な大きさのペプチドとしてビリオン中に残存する。これらのタンパク質は異なる役割を有し、例えば、p2タンパク質はプロテアーゼの活性の調節において役割を果し、タンパク質分解の正確なタイミングに寄与することが提唱されている。

【0007】

MAポリペプチドはp55のN末端のミリストイル化された末端から誘導される。ほとんどのMA分子はビリオンの脂質二重層の内部表面に結合したままであり、それによって粒子が安定化している。MAのサブセットはビリオンのより深い層の内部に収集され、そこでウイルスDNAを核にエスコートする複合体の一部となる(5)。これらのMA分子は、MA上の核親和性シグナルが細胞の核輸送機構により認識されるため、ウイルスゲノムの核輸送を容易にする。この現象により、HIVは非分裂細胞に感染することが可能になり、これはレトロウイルスにとっては通常でない特性である。

【0008】

p24(CA)タンパク質はウイルス粒子の円錐コアを形成する。シクロフィリンAはp55のp24領域と相互作用してHIV粒子へのその組込みをもたらすことが証明された。シクロスボリンAによるこの相互作用の破壊はウイルスの複製を阻害するので、GagとシクロフィリンAとの相互作用は必須である。

【0009】

GagのNC領域はHIVのいわゆるパッケージングシグナルの特異的認識を担う。このパッケージングシグナルはウイルスRNAの5'末端付近に位置する4個のステムループ構造からなり、HIV-1ビリオンへの異種RNAの組込みを媒介するのに十分である。NCは2個のジンクフィンガーモチーフにより媒介される相互作用を介してパッケージングシグナルに結合する。

10

20

30

40

50

NCはまた、逆転写を容易にする。

【0010】

p6ポリペプチド領域はp55 Gagとアクセサリータンパク質Vprとの相互作用を媒介し、集合するビリオンへのVprの組込みをもたらす。p6領域はまた、感染細胞からの出芽ビリオンの十分な放出にとって必要とされるいわゆる後期ドメインを含む。

【0011】

Pol遺伝子は初期感染においてウイルスにより必要とされる2つの活性を含む2つのタンパク質、細胞DNAへのウイルスDNAの組込みにとって必要なRT及びインテグラーーゼタンパク質をコードする。Polの一次産物はビリオンプロテアーゼにより切断されて、DNA合成にとって必要な活性を含むアミノ末端RTペプチド(RNA及びDNA指向型DNAポリメラーゼ、リボヌクレアーゼH)及びカルボキシ末端インテグラーーゼタンパク質を生じる。

10

【0012】

HIVのRTは全長RT(p66)とカルボキシ末端Rnaseインテグラーーゼドメインを欠く切断産物(p51)とのヘテロ二量体である。

【0013】

RTはレトロウイルスゲノムによりコードされる最も高度に保存されたタンパク質の1つである。RTの2つの主要な活性はDNA Pol及びリボヌクレアーゼHである。RTのDNA Pol活性は鋳型として互換的にRNA及びDNAを使用し、全てのDNAポリメラーゼと同様にde novoでDNA合成を開始することができず、プライマー(RNA)として働く予め存在する分子を必要とすることが知られている。

20

【0014】

全てのRTタンパク質に固有のRnase H活性はDNA合成が進行するにつれてRNAゲノムを除去する繰返しの早期において必須の役割を果たす。それは全てのRNA-DNAハイブリッド分子に由来するRNAを選択的に分解する。構造的に、そのポリメラーゼ及びリボHはPolの3分の2のアミノ酸をカバーするPolとは重複しない別のドメインを占めている。

【0015】

p66触媒サブユニットは5つの別個のサブドメインに折り畳まれる。これらのアミノ末端23はRT活性を有する部分を有する。これらのカルボキシ末端はRnase Hドメインである。

【0016】

宿主細胞の感染後、レトロウイルスのRNAゲノムは感染粒子中に存在する逆転写酵素によって直鎖状のdsDNAへとコピーされる。インテグラーーゼ(Virus Res 52, 271-273中のSka Ika AM '99 Advに概説されている)はウイルスDNAの末端を認識し、それらを切り出し、宿主の染色体部位にウイルスDNAを附加して組込みを触媒する。宿主DNA中の多くの部位が組込みの標的であり得る。インテグラーーゼはin vitroで組込みを触媒するのに十分であるが、それはin vivoでウイルスDNAと結合した唯一のタンパク質ではない。感染細胞から単離されたその大きなタンパク質 - ウィルスDNA複合体は、プレ組込み複合体と呼ばれる。これは子孫ウイルスゲノムによる宿主細胞遺伝子の獲得を容易にする。

30

【0017】

インテグラーーゼは3つの異なるドメイン、N末端ドメイン、触媒コア及びC末端ドメインからなる。触媒コアドメインはポリヌクレオチジル転移の化学反応にとっての要件の全てを含む。

40

【0018】

Nefタンパク質は、細胞表面からのHIV受容体であるCD4の除去を引き起こすことが知られているが、この機能の生物学的重要性は議論されていない。さらに、NefはT細胞のシグナル経路と相互作用し、活性状態を誘導し、同様により効率的な遺伝子発現を促進し得る。いくらかのHIV単離体はこの領域に突然変異を有し、それが機能的タンパク質をコードしない原因となり、in vivoにおけるそれらの複製及び病因において重篤に免疫不全的である。

【0019】

DNAワクチンは通常、強力なプロモーターが挿入された細菌プラスミドベクター、抗原

50

性ペプチドをコードする目的の遺伝子及びポリアデニル化／転写終結配列からなる。目的の遺伝子は完全なタンパク質をコードしてもよいし、又は単に病原体、腫瘍もしくは防御の対象である他の因子に関する抗原性ペプチド配列をコードしてもよい。プラスミドを、例えば大腸菌などの細菌内で増殖させた後、意図される投与経路に応じて、宿主に投与する前に、好適な培地内で単離及び調製することができる。投与後、このプラスミドはコードされたペプチドを産生する宿主の細胞により取り込まれる。哺乳動物宿主中のプラスミドの複製及び関係のある動物の染色体DNA内への組込みを防止するために、プラスミドベクターを真核細胞において機能的である複製起点を用いずに作製するのが好ましいであろう。

【0020】

伝統的なワクチン技術と比較して、DNAワクチン接種にはいくつかの利点がある。第1に、DNA配列によりコードされるタンパク質は宿主中で合成されるため、該タンパク質の構造又はコンフォメーションは疾患状態と関連する天然のタンパク質と類似するであろうと予測される。また、DNAワクチン接種は保存されたタンパク質に由来するエピトープを認識する細胞傷害性Tリンパ球応答を生じることにより、異なる株のウイルスに対しても防御を提供するようである。さらに、プラスミドは抗原性タンパク質を産生し得る宿主細胞により取り込まれるため、長期間継続する免疫応答を誘導することができる。この技術はまた、異なる免疫原を組み合わせて単一の製剤にして、いくつかの疾患状態に関する同時免疫化を容易にする可能性を提供する。

【0021】

DNAワクチン接種に関する有用な背景情報はDonnellyら、「DNAワクチン」、Ann. Rev Immunol. 1997 15: 617-648に提供されており、その開示はその全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする。

【発明の開示】

【0022】

発明の概要

本発明はHIV感染及びAIDSの予防及び治療のための核酸ワクチンにおける使用のための新規な構築物を提供する。

【0023】

従って、第1の態様において、本発明はさらなるHIV抗原もしくはその断片をコードするヌクレオチド配列に連結され、かつ異種プロモーターに機能し得る形で連結されたHIVのgagタンパク質又はその断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。前記ヌクレオチド配列の断片はHIVエピトープをコードし、典型的には少なくとも8個のアミノ酸のペプチドをコードする。このヌクレオチド配列はDNA配列であるのが好ましく、複製起点を含まないプラスミド内に含まれるのが好ましい。そのような核酸分子を、製薬上許容し得る賦形剤、担体、希釈剤又はアジュバントと共に製剤化して、HIV感染及びAIDSの治療及び／又は予防に好適な医薬組成物を製造する。

【0024】

好ましい実施形態においては、前記DNA配列を、粒子を介する薬剤送達に好適な不活性粒子又はビーズの表面上で製剤化する。好ましくは、このビーズは金である。

【0025】

本発明の好ましい実施形態においては、配列が哺乳動物細胞における遺伝子のコドン使用に類似するように最適化されたgagタンパク質をコードする、高度に発現されるDNA配列が提供される。特に、このgagタンパク質は高度に発現されたヒト遺伝子のものと類似するように最適化される。

【0026】

DNAコードは、4つの文字(A、T、C及びG)から構成され、それらを使用して、生物の遺伝子にコードされたアミノ酸又はタンパク質を表す3文字の「コドン」を綴る。DNA分子に沿ったコドンの直鎖状配列は、これらの遺伝子によりコードされるタンパク質中のアミノ酸の直鎖状配列中に翻訳される。このコードは高度に縮重しており、20個の天然アミノ酸を

10

20

30

40

50

コードする61個のコドンと、「停止」シグナルを表す3個のコドンがある。このように、ほとんどのアミノ酸は2個以上のコドンによりコードされる。実際、いくつかは4個以上の異なるコドンによりコードされる。

【0027】

所与のアミノ酸をコードする2個以上のコドンが利用可能である場合、生物のコドン使用パターンは高度に非ランダムであることが観察されている。異なる種はそのコドン選択において異なる偏りを示し、さらに、コドンの使用は、単一の種においても、高いレベル及び低いレベルで発現される遺伝子間で顕著に異なっていることがある。この偏りはウイルス、植物、細菌及び哺乳動物細胞において異なっており、いくつかの種はランダムなコドン選択から離れて他の種以上により強い偏りを示す。例えば、ヒト及び他の哺乳動物は特定の細菌又はウイルスほどの強い偏りを示さない。これらの理由として、大腸菌中で発現された哺乳動物遺伝子又は哺乳動物細胞中で発現された外来遺伝子もしくは組換え遺伝子は効率的発現にとって不適切なコドン分布を有する確率がかなり高いことが挙げられる。発現を起こさせる宿主中で稀に観察されるコドンのクラスター又は多数のコドンの異種DNA配列中の存在はその宿主中での低い異種発現レベルを示すと考えられる。10

【0028】

本発明の実施形態においては、アミノ酸配列をコードすし、そのコドン使用パターンが高度に発現される哺乳動物遺伝子のコドン使用に類似したgagポリヌクレオチド配列が提供される。好ましくは、該ポリヌクレオチド配列はDNA配列である。前記ポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンは高度に発現されるヒト遺伝子に典型的であるのが望ましい20。

【0029】

本発明のポリヌクレオチドでは、コドン使用パターンを標的生物、例えば、哺乳動物、特にヒトのコドンの偏りにより近づけるために、ヒト免疫不全ウイルスに典型的なコドン使用パターンから変化させている。「コドン使用係数」は所与のポリヌクレオチド配列のコドンパターンが標的の種のものにどれぐらい近く類似しているかを示す尺度である。コドン頻度は、高度に発現される多くの種の遺伝子に関する文献起源(例えば、Nakamuraら、Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215を参照)に由来するものであってもよい。61個のコドンの各々についてのコドン頻度(選択されたクラスの遺伝子の1000個のコドンあたりの発生数として表される)を20個の天然アミノ酸の各々について正規化して、各アミノ酸について最も頻繁に使用されるコドンについての値を1に設定し、より少ない共通コドンについての頻度を0~1の間にあるように定める。かくして、61個のコドンの各々に、標的の種の高度に発現される遺伝子について1以下の値を割り当てる。該当する種の高度に発現される遺伝子と比較した特定のポリヌクレオチドに関するコドン使用係数を算出するために、該特定のポリヌクレオチドの各コドンについて定めた値に注目し、これら全ての値の幾何学的平均を取る(これらの値の自然対数の和をコドンの総数で割り、真数を取る)。この係数は0~1の値を有し、係数が高くなるほど、頻繁に使用されるコドンを前記ポリヌクレオチドがより多く含む。ポリヌクレオチド配列が1のコドン使用係数を有する場合、このコドンは全て、標的とする種の高度に発現される遺伝子に関して「最も頻度の高い」コドンである。30

【0030】

本発明に従えば、前記ポリヌクレオチドのコドン使用パターンは、標的生物の高度に発現される遺伝子において0.2未満のRSCU値を有するコドンを含まないのが好ましい。あるいは、前記コドン使用パターンは、特定のアミノ酸について使用されるコドンの10%未満であるコドンを含まない。相対同義コドン使用(RSCU)値は、観察されたコドン数を、そのアミノ酸について全てのコドンが等しい頻度で用いられた場合に期待される数で割ったものである。本発明のポリヌクレオチドは、一般的には0.3以上、好ましくは0.4以上、最も好ましくは0.5以上である高度に発現されるヒト遺伝子に対するコドン使用係数(又はRSCU)を有する。ヒトに関するコドン使用表はGenebankにも見出すことができる。40

【0031】

50

比較すると、高度に発現される - アクチン遺伝子は0.747のRSCUを有する。ホモサピエンスについてのコドン使用表を以下に記載する。

【表1】

コドン使用 表1：

ホモサピエンス (*Homo sapiens*) [gbpri]: 27143 CDS's (12816923コドン)

フィールド：[トリプレット] [頻度：1000個あたり] ([数])

UUU	17.0(217684)	UCU	14.8(189419)	UAU	12.1(155645)	UGU	10.0(127719)	10
UUC	20.5(262753)	UCC	17.5(224470)	UAC	15.8(202481)	UGC	12.3(157257)	
UUA	7.3(93924)	UCA	11.9(152074)	UAA	0.7(9195)	UGA	1.3(16025)	
UUG	12.5(159611)	UCG	4.5(57572)	UAG	0.5(6789)	UGG	12.9(165930)	
CUU	12.8(163707)	CCU	17.3(222146)	CAU	10.5(134186)	CGU	4.6(59454)	
CUC	19.3(247391)	CCC	20.0(256235)	CAC	14.9(190928)	CGC	10.8(137865)	
CUA	7.0(89078)	CCA	16.7(214583)	CAA	12.0(153590)	CGA	6.3(80709)	
CUG	39.7(509096)	CCG	7.0(89619)	CAG	34.5(441727)	CGG	11.6(148666)	
AUU	15.8(202844)	ACU	12.9(165392)	AAU	17.0(218508)	AGU	12.0(154442)	
AUC	21.6(277066)	ACC	19.3(247805)	AAC	19.8(253475)	AGC	19.3(247583)	20
AUA	7.2(92133)	ACA	14.9(191518)	AAA	24.0(308123)	AGA	11.5(147264)	
AUG	22.3(285776)	ACG	6.3(80369)	AAG	32.6(418141)	AGG	11.3(145276)	
GUU	10.9(139611)	GCU	18.5(236639)	GAU	22.4(286742)	GGU	10.8(138606)	
GUC	14.6(187333)	GCC	28.3(362086)	GAC	26.1(334158)	GGC	22.7(290904)	
GUA	7.0(89644)	GCA	15.9(203310)	GAA	29.1(373151)	GGA	16.4(210643)	
GUG	28.8(369006)	GCG	7.5(96455)	GAG	40.2(515485)	GGG	16.4(209907)	

コードしているGC 52.51% 1文字目GC 56.04% 2文字目GC 42.35% 3文字目G
C 59.13%

【0032】

【表2】

コドン使用 表2 (好ましいもの) :

(高度に発現される) ヒト遺伝子についてのコドン使用 1/24/91 (human_high.cod)

アミノ酸	コドン	数	/1000	割合	
Gly	GGG	905.00	18.76	0.24	10
Gly	GGA	525.00	10.88	0.14	
Gly	GGT	441.00	9.14	0.12	
Gly	GGC	1867.00	38.70	0.50	
Glu	GAG	2420.00	50.16	0.75	
Glu	GAA	792.00	16.42	0.25	
Asp	GAT	592.00	12.27	0.25	
Asp	GAC	1821.00	37.75	0.75	
Val	GTG	1866.00	38.68	0.64	
Val	GTA	134.00	2.78	0.05	20
Val	GTT	198.00	4.10	0.07	
Val	GTC	728.00	15.09	0.25	
Ala	GCG	652.00	13.51	0.17	
Ala	GCA	488.00	10.12	0.13	
Ala	GCT	654.00	13.56	0.17	
Ala	GCC	2057.00	42.64	0.53	
Arg	AGG	512.00	10.61	0.18	
Arg	AGA	298.00	6.18	0.10	
Ser	AGT	354.00	7.34	0.10	
Ser	AGC	1171.00	24.27	0.34	30
Lys	AAG	2117.00	43.88	0.82	
Lys	AAA	471.00	9.76	0.18	
Asn	AAT	314.00	6.51	0.22	
Asn	AAC	1120.00	23.22	0.78	
Met	ATG	1077.00	22.32	1.00	
Ile	ATA	88.00	1.82	0.05	
Ile	ATT	315.00	6.53	0.18	
Ile	ATC	1369.00	28.38	0.77	40
Thr	ACG	405.00	8.40	0.15	
Thr	ACA	373.00	7.73	0.14	
Thr	ACT	358.00	7.42	0.14	
Thr	ACC	1502.00	31.13	0.57	
Trp	TGG	652.00	13.51	1.00	

【0033】

End	TGA	109.00	2.26	0.55	
Cys	TGT	325.00	6.74	0.32	
Cys	TGC	706.00	14.63	0.68	
End	TAG	42.00	0.87	0.21	
End	TAA	46.00	0.95	0.23	
Tyr	TAT	360.00	7.46	0.26	
Tyr	TAC	1042.00	21.60	0.74	
Leu	TTG	313.00	6.49	0.06	10
Leu	TTA	76.00	1.58	0.02	
Phe	TTT	336.00	6.96	0.20	
Phe	TTC	1377.00	28.54	0.80	
Ser	TCG	325.00	6.74	0.09	
Ser	TCA	165.00	3.42	0.05	
Ser	TCT	450.00	9.33	0.13	
Ser	TCC	958.00	19.86	0.28	
Arg	CGG	611.00	12.67	0.21	
Arg	CGA	183.00	3.79	0.06	
Arg	CGT	210.00	4.35	0.07	20
Arg	CGC	1086.00	22.51	0.37	
Gln	CAG	2020.00	41.87	0.88	
Gln	CAA	283.00	5.87	0.12	
His	CAT	234.00	4.85	0.21	
His	CAC	870.00	18.03	0.79	
Leu	CTG	2884.00	59.78	0.58	
Leu	CTA	166.00	3.44	0.03	
Leu	CTT	238.00	4.93	0.05	
Leu	CTC	1276.00	26.45	0.26	30
Pro	CCG	482.00	9.99	0.17	
Pro	CCA	456.00	9.45	0.16	
Pro	CCT	568.00	11.77	0.19	
Pro	CCC	1410.00	29.23	0.48	

【0034】

本発明のさらなる態様に従えば、本発明の第1の態様に従うポリヌクレオチド配列を含み、かつその発現を指令することができる発現ベクターが提供され、特に、gagポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンは高度に発現される哺乳動物遺伝子、好ましくは高度に発現されるヒト遺伝子に典型的なものである。このベクターは細菌細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞、特に、ヒト細胞中で異種DNAの発現を駆動させるのに好適であり得る。一実施形態においては、この発現ベクターはp7313(図1を参照)である。

【0035】

第3の実施形態においては、NEF、その断片、又はHIV逆転写酵素(RT)もしくはその断片をコードするDNA配列に融合された異種プロモーターの制御下にあるgag遺伝子が提供される。この遺伝子のgag部分は融合物のN又はC末端部分であってもよい。

【0036】

好ましい実施形態においては、このgag遺伝子はgagのp6ペプチドをコードしない。NEF遺伝子は好ましくはトランケートされて、N末端領域をコードする配列が除去、すなわち

、30～85個、好ましくは60～85個、典型的には約81個、好ましくはN末端の65個のアミノ酸が除去されている。

【0037】

さらなる実施形態においては、RT遺伝子も高度に発現されるヒト遺伝子に類似するよう に最適化される。RTはいかなる逆転写活性も実質的に不活性化する突然変異をコードするのが好ましい。好ましい不活性化突然変異はWトリプトファン229のK(リジン)による置換を含む。

【0038】

本発明のさらなる態様に従えば、本発明に従うポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞、又は本発明に従う発現ベクターが提供される。この宿主細胞は細菌細胞、例えば大腸菌、哺乳動物細胞、例えばヒトであってもよいし、昆虫細胞であってもよい。本発明に従うベクターを含む哺乳動物細胞は、*in vitro*でトランスフェクトされた培養細胞であってもよいし、哺乳動物に対する前記ベクターの投与により*in vivo*でトランスフェクトしてもよい。

10

【0039】

本発明はさらに、本発明に従うポリヌクレオチド配列を含む医薬組成物を提供する。好ましくは、該組成物はDNAベクターを含む。好ましい実施形態においては、前記組成物は本発明のポリヌクレオチド配列をコードするベクターを含むDNAで被覆された複数の粒子、好ましくは金粒子を含む。好ましくは、この配列はHIV gagアミノ酸配列をコードし、その該ポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンは高度に発現される哺乳動物遺伝子、特にヒト遺伝子に典型的なものである。別の実施形態においては、前記組成物は製薬上許容し得る賦形剤及び本発明の第2の態様に従うDNAベクターを含む。この組成物はまたアジュバントを含んでもよい。

20

【0040】

かくして、本発明のベクターを免疫刺激剤と共に使用することは本発明の実施形態である。好ましくは、この免疫刺激剤を本発明の核酸ベクターと同時に投与し、好ましい実施形態においては、これを一緒に製剤化する。そのような免疫刺激剤としては、以下のものが挙げられるが、このリストは決して網羅的なものではなく、他の薬剤を排除するものではない：イミキモッド(imiquimod)[S-26308, R-837] (Harrisonら、「Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine」, Vaccine 19: 1820-1826, (2001))；及びレスキモッド(resiquimod)[S-28463, R-848] (Vasilakosら、「Adjuvant activities of immune response modifier R-848: Comparison with CpG ODN」, Cellular immunology 204: 64-74 (2000))などの合成イミダゾキノリン、ツカレソール(Rhodes, J.ら、「Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Sciff-base-forming drugs」, Nature 377: 71-75 (1995))、サイトカイン、ケモカイン及びタンパク質もしくはペプチドとしての共刺激分子(これはGM-CSF、IL-1、IL-1、TGF- 及びTGF- などの前炎症性サイトカイン、インターフェロン、IL-2、IL-12、IL-15及びIL-18などのTh1誘導因子、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10及びIL-13などのTh2誘導因子並びにMCP-1、MIP-1 、MIP- 、RANTES、TCA-3、CD80、CD86及びCD40Lなどの他のケモカイン及び共刺激遺伝子を含む)などの抗原提示細胞及びT細胞表面上で構成的に発現されるカルボニル及びアミンのシップ塩基、CTLA-4及びL-セレクチンなどの他の免疫刺激標的化リガンド、Fas (49)などのアポトーシス刺激タンパク質及びペプチド、バクスフェクチン(Reyesら、「Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization」, Vaccine 19: 3778-3786)、スクアレン、-トコフェロール、ポリソルベート80、DOPC及びコレステロール、エンドトキシン、[LPS]、(Beutler, B., 「Endotoxin, Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity」, Current Opinion in Microbiology 3: 23-30 (2000))などの合成脂質に基づくアジュバント、；Cpgオリゴ-及びジ-ヌクレオチド(Sato, Y.ら、「Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization」, Science 273 (5273): 352-354 (1996)、Hermi, H.ら、「A T

30

40

50

oll-like receptor recognizes bacterial DNA」, Nature 408: 740-745, (2000)並びに合成マイコバクテリアリポタンパク質、マイコバクテリアタンパク質p19、ペプチドグリカン、テイコイン酸及びリピドAなどの、Toll受容体にTh1-誘導サイトカインを産生させる他の潜在的リガンド。

【0041】

顕著なTh-1型応答を引き出すための特定の好ましいアジュバントとしては、例えば、モノホスホリルリピドA、又は好ましくは3-de-0-アシル化モノホスホリルリピドAなどのリピドA誘導体が挙げられる。MPL(登録商標)アジュバントはCorixa Corporation (Seattle, WA; 例えは、米国特許第4,436,727号；同第4,877,611号；同第4,866,034号及び同第4,912,094号を参照)から入手可能である。Cpg含有オリゴヌクレオチド(Cpgジヌクレオチドがメチル化されていないもの)も顕著なTh1応答を誘導する。そのようなオリゴヌクレオチドは公知であり、例えは、WO 96/02555、WO 99/33488並びに米国特許第6,008,200号及び同第5,856,462号に記載されている。免疫刺激DNA配列も、例えは、Satoら、Science 273: 352, 1996に記載されている。別の好ましいアジュバントはQuill Aなどのサボニン、又はQS21及びQS7(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA)；Escin；Digitonin；又はGypsophilaもしくはChenopodium quinoaサボニンなどのサボニンの誘導体を含む。

【0042】

HIV感染の治療又は予防における、本発明のポリヌクレオチド又は本発明のベクターの使用も提供される。

【0043】

本発明はまた、本発明に従う有効量のポリヌクレオチド、ベクター又は医薬組成物を投与することを含む、HIV感染、それに関連する任意の症状又は疾患を治療又は予防する方法を提供する。医薬組成物の投与は、例えは、同じDNAプラスミドの反復用量として、又は「初回免疫 - 追加免疫」の治療的ワクチン接種レジメにおいて、1回以上の個々の用量の形態を取ってもよい。特定の場合、「初回免疫」ワクチン接種は、好ましくは、プラスミド由来ベクター中に組み込まれた、本発明に従うポリヌクレオチドの粒子媒介DNA送達であってよく、「追加免疫」は、同じポリヌクレオチド配列を含む組換えウイルスベクターの投与によるか、又はアジュバント中のタンパク質と共に追加免疫することによるものであってよい。逆に、初回免疫は、ウイルスベクター又はタンパク質製剤、典型的にはアジュバント中で製剤化されたタンパク質であってよく、追加免疫は本発明のDNAワクチンを用いるものであってよい。初回免疫及び/又は追加免疫は複数回用量を用いることができる。

【0044】

本発明の実施形態においては、gag、nef又はRTタンパク質の断片が意図される。例えは、本発明のポリヌクレオチドはHIVのgag、nef又はRTタンパク質の断片をコードしてもよい。少なくとも8個、例えは8~10個のアミノ酸又は20、50、60、70、80、100、150もしくは200個までの長さのアミノ酸の断片をコードするポリヌクレオチドは、コードされたオリゴ又はポリペプチドがHIV抗原性を示す限り、本発明の範囲内にあると考えられる。特に、排他的な説明ではないが、本発明のこの態様は前記ポリヌクレオチドが完全なHIVタンパク質配列の断片をコードし、そのタンパク質の1個以上の別のエピトープを有する場合を包含する。そのような断片は、該断片が高度に発現される哺乳動物遺伝子のものと類似するコドン使用パターンを有するようにコドン最適化されていてもよい。

【0045】

本発明に従う好ましい構築物としては、

1. トランケートされたNEF(末端アミノ酸1~65をコードするヌクレオチドを欠く)と融合されたp17、p24；
2. p17、p24、RT、トランケートされたNEF(末端アミノ酸1~65をコードするヌクレオチドを欠く)；
3. p17、p24(最適化されたgag)、トランケートされたNEF(末端アミノ酸1~65をコードするヌクレオチドを欠く)；

10

20

30

40

50

4. p17、p24(最適化されたgag)、RT(最適化されたもの)、トランケートされたNEF(末端アミノ酸1~85をコードするヌクレオチドを欠く)；
 5. p17、p24、RT(最適化されたもの)、トランケートされたNEF(末端アミノ酸1~65をコードするヌクレオチドを欠く)；
 6. 最適化されたp17、p24 gagと融合された、トランケートされたNEF(ヌクレオチド1~65を欠く)；
 7. 本発明の特に好ましい構築物としては、特に、3種の融合物RT-NEF-Gag、及びRT-Gag-Nefが挙げられる；
 8. 最適化されたRT、トランケートされたNEF及び最適化されたp17、p24(gag) (RNG)；並びに 10
 9. 最適化されたRT、最適化されたp17、24(gag)、Nefトランケート(アミノ酸1~65を欠く)RGN；
- が挙げられる。

【 0 0 4 6 】

前記HIV構築物はHIV Clade B又はClade C、特にClade Bに由来するものであるのが好ましい。

【 0 0 4 7 】

上記に考察したように、本発明は本発明のヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。そのような発現ベクターは、分子生物学の分野においては日常的に構築されており、例えば、プラスミドDNA並びに好適なイニシエーター、プロモーター、エンハンサー及び、 20 例えれば、必要であってもよく、タンパク質発現を可能にするために正確な向きに配置されたポリアデニル化シグナルなどの他のエレメントの使用を含んでもよい。他の好適なベクターは当業者にとっては明らかであろう。これに関してさらなる例により、本発明者らはSambrookら、Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 第2版. CSH Laboratory Press (1989)を参照する。

【 0 0 4 8 】

好ましくは、本発明の、又はベクター中の本発明における使用のためのポリヌクレオチドを、宿主細胞によるコード配列の発現を提供し得る制御配列に機能し得る形で連結する、すなわち、このベクターは発現ベクターである。用語「機能し得る形で連結された」とは、記載の構成要素がそれらの意図された様式で機能することを可能にする関係にある並置を指す。コード配列に「機能し得る形で連結された」プロモーターなどの調節配列を、該コード配列の発現が該調節配列と適合する条件下で達成されるように配置する。 30

【 0 0 4 9 】

前記ベクターは、例えば、複製起点、必要に応じて前記ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーター及び必要に応じて該プロモーターのレギュレーターと共に提供されたプラスミド、人工染色体(例えば、BAC、PAC、YAC)、ウイルス又はファージベクターであってもよい。このベクターは1個以上の選択可能マーカー遺伝子、例えば、細菌プラスミドの場合はアンビシリンもしくはカナマイシン耐性遺伝子又は真菌ベクターのための耐性遺伝子を含んでもよい。ベクターを、例えば、DNAもしくはRNAの製造のためにin vitroで用いるか、又は例えば、該ベクターによりコードされるタンパク質の製造のために、宿主細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞をトランスフェクトもしくは形質転換するのに用いることができる。また、このベクターを、例えば、DNAワクチン接種又は遺伝子治療の方法において、in vivoで用いるために適合させることもできる。 40

【 0 0 5 0 】

プロモーター及び他の発現調節シグナルを、発現を設計する宿主細胞に適合するように選択することができる。例えば、哺乳動物のプロモーターとしては、カドミウムなどの重金属に応答して誘導され得るメタロチオネインプロモーター、及び -アクチンプロモーターが挙げられる。SV40 large T抗原プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)極初期(IE)プロモーター、ラウス肉腫ウイルスLTRプロモーター、アデノウイルスプロモーター、又はHIVプロモーター、特にHPV上流調節領域(URR)などのウイルスプロモーターを 50

用いることもできる。これらのプロモーターは全て記載されており、当業界で容易に入手可能である。

【0051】

好ましいプロモーターエレメントはイントロンAを欠くがエクソン1を含む、CMV極初期プロモーターである。このプロモーターエレメントは最小プロモーターエレメントであっても増強プロモーターであってもよいが、増強プロモーターが好ましい。従って、HCMV I E初期プロモーターの制御下にある本発明のポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。

【0052】

好適なウイルスベクターの例としては、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアもしくは -ウイルスベクター並びにレンチウイルス、アデノウイルス及びアデノ関連ウイルスなどのレトロウイルスが挙げられる。これらのウイルスを用いる遺伝子導入技術は当業者には公知である。例えば、レトロウイルスベクターを用いて、本発明のポリヌクレオチドを宿主ゲノム中に安定に組み込むことができるが、そのような組換えは好ましくない。対照的に、複製欠陥型アデノウイルスベクターはエピソームを保持しており、従って、一過的発現を可能にする。昆虫細胞(例えば、バキュロウイルスベクター)、ヒト細胞、酵母細胞又は細菌中の発現を駆動し得るベクターを用いて、例えば、サブユニットワクチンとしての使用のために、又は免疫アッセイにおいて、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるHIVタンパク質を大量に製造することができる。

【0053】

本発明に従うポリヌクレオチドは、*in vitro*、*in vivo*又は*ex vivo*で引き起こしてもよいコードされたタンパク質の発現による製造において、有用である。従って、前記ヌクレオチドは、例えば、収率を増加させるための、組換えタンパク質合成に関与していくともよく、実際、それだけで治療剤としての有用性が見出されており、DNAワクチン接種技術において用いられる。本発明のポリヌクレオチドを*in vitro*又は*ex vivo*でコードされるタンパク質の製造に用いる場合、例えば、細胞培養物中の細胞を改変して、発現させようとする前記ポリヌクレオチドを含有するようにすることができる。そのような細胞としては、一過性の、好ましくは安定な哺乳動物細胞系が挙げられる。本発明に従うポリペプチドをコードするベクターの挿入により改変することができる特定の細胞の例としては、哺乳動物のHEK293T、CHO、HeLa、293及びCOS細胞が挙げられる。好ましくは、選択される細胞系は安定であるだけでなく、ポリペプチドの成熟なグリコシル化及び細胞表面発現を可能にするものである。発現を、形質転換された卵母細胞中で達成することができる。ポリペプチドを、トランスジェニック非ヒト動物、好ましくはマウスの細胞中で、本発明のポリヌクレオチドから発現させることができる。本発明のポリヌクレオチドに由来するポリペプチドを発現するトランスジェニック非ヒト動物は本発明の範囲内に含まれる。

【0054】

本発明はさらに、哺乳動物被験体にワクチン接種する方法であって、該被験体に有効量のそのようなワクチン又はワクチン組成物を投与することを含む、前記方法を提供する。最も好ましくは、DNAワクチン、ワクチン組成物及び免疫治療剤における使用のための発現ベクターはプラスミドベクターである。

【0055】

DNAワクチンを、例えば、シリンジもしくは高圧ジェットを用いて投与される液体製剤中で「裸のDNA」、又はリボソームもしくは刺激性トランスフェクション増強剤と共に製剤化されたDNAの形態で、又は粒子を介するDNA送達(PMDD)により、投与することができる。これらの送達系は全て当業界で公知である。前記ベクターを、例えば、ウイルスベクター送達系により哺乳動物に導入することができる。

【0056】

本発明の組成物を、筋肉内、皮下、腹腔内、静脈内又は経粘膜などのいくつかの経路により送達することができる。

【0057】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態においては、前記組成物を皮内的に送達する。特に、前記組成物を、例えば、Haynesら、J Biotechnology 44: 37-42 (1996)に記載のような、ビーズ(例えば、金)上でベクターを被覆した後、高圧下で表皮中に投与することを含む、遺伝子銃、特に粒子ポンバードメント投与技術により送達する。

【0058】

1つの実例において、ガスにより駆動される粒子加速を、Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK)及びPowderject Vaccines Inc. (Madison, WI)により製造されるものなどの装置を用いて達成することができ、そのいくつかの例は米国特許第5,846,796号、同第6,010,478号、同第5,865,796号、同第5,584,807号、及び欧州特許第0500 799号に記載されている。この手法はポリヌクレオチドなどの微小粒子の乾燥粉末製剤を手で持てる大きさの装置により生成されたヘリウムガスジェット内で高速に加速し、該粒子を目的の標的組織、典型的には皮膚中に推進させる、針を用いない送達手法を提供する。10

【0059】

前記粒子は、好ましくは直径0.4~4.0 μm、より好ましくは0.6~2.0 μmの金ビーズであり、これらの上でDNAコンジュゲートを被覆した後、「遺伝子銃」中に配置するためのカートリッジ又はカセット中に入れる。

【0060】

関連する実施形態においては、本発明の組成物のガスにより駆動される針を用いない注入にとって有用であり得る他の装置及び方法としては、Bioject, Inc. (Portland, OR)により提供されるものが挙げられ、そのいくつかの例が米国特許第4,790,824号、同第5,064,413号、同第5,312,335号、同第5,383,851号、同第5,399,163号、同第5,520,639号及び同第5,993,412号に記載されている。20

【0061】

抗原性ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターを、予防上又は治療上有効である量で投与する。投与する量は、一般的には、粒子を介する送達については1ピコグラム~1ミリグラム、好ましくは1ピコグラム~10マイクログラム、及び他の経路については100ナノグラム~1ミリグラム、好ましくは10マイクログラム~1ミリグラムのヌクレオチド/用量である。その正確な量は免疫化しようとする被験者の体重及び投与経路に依存してかなり変化し得る。

【0062】

抗原性ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む免疫原成分を、一度きりのベースで投与するか、又は例えば、約1日~約18ヶ月の間隔で、1~7回、好ましくは1~4回、繰り返して投与することができる。しかしながら、この治療レジメは関与する被験体の大きさ、投与するヌクレオチド配列の量、投与経路、及び技術のある獣医師又は開業医にとっては明らかである他の因子に依存して顕著に変化するであろう。この被験体はそれらの治療レジメ全体の一部として1種以上の他の抗HIVレトロウイルス薬剤を受けてもよい。さらに、前記核酸免疫原をアジュバントと共に投与してもよい。30

【0063】

同様に、本明細書に特定されるアジュバント成分を、例えば、経口、経鼻、経肺、筋肉内、皮下、皮内又は局所経路などの様々な異なる投与経路を介して投与することができる。好ましくは、このアジュバント成分を皮内又は局所経路を介して投与する。最も好ましくは、局所経路によるものである。この投与はヌクレオチド配列の投与前の約14日~投与後約14日の間、好ましくはヌクレオチド配列の投与前の約1日~投与後約3日の間に行うことができる。ある実施形態においては、このアジュバント成分を、前記ヌクレオチド配列の投与と実質的に同時に投与する。「実質的に同時に」とは、アジュバント成分の投与が前記ヌクレオチド配列の投与と同じ時点であるか、又はそうでない場合は、ヌクレオチド配列の投与の少なくとも数時間以内であるのが好ましいことを意味する。最も好ましい治療プロトコールにおいては、前記アジュバント成分を前記ヌクレオチド配列の投与と実質的に同時に投与する。明らかに、このプロトコールを、上記の変数の型に従って、必要に応じて変更することができる。前記アジュバントはイミキモッドなどの1H-イミダゾ[4,5c

4050

]キノリン-4-アミン誘導体であるのが好ましい。典型的には、イミキモッドを局所クリーム製剤として提供することができ、上記のプロトコールに従って投与することができる。

【0064】

また、そのような変数に依存して、前記誘導体の投与量も変化するが、例えば、約0.1 mg/kg～約100 mg/kgの範囲であってもよく、ここで「kgあたり」とは関心のある哺乳動物の体重を指す。1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン誘導体のこの投与を、前記ヌクレオチド配列のそれぞれ次の投与又は追加投与と共に繰り返すのが好ましい。最も好ましくは、投与量は約1 mg/kg～約50 mg/kgである。本明細書に記載の「初回免疫 - 追加免疫」スキームの場合、イミキモッド又は他の1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン誘導体を、初回免疫もしくは追加免疫で、又は初回免疫及び追加免疫の両方で投与することができる。10

【0065】

アジュバント成分に1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン誘導体のみを含有させて、生の化学状態において投与することができるが、投与は医薬製剤の形態であるのが好ましい。すなわち、アジュバント成分は1種以上の製薬上許容し得る担体、及び必要に応じて他の治療成分と混合した1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミンを含むのが好ましい。この担体は製剤内で他の成分と共存可能であるという意味で「許容可能」であり、かつそのレシピエントに対して有害でなければならない。前記製剤の性質は意図される投与経路に従って自然に変化し、製薬業界で公知の方法により製造することができる。全ての方法は1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン誘導体を適当な担体と結合させる工程を含む。20一般的には、前記製剤を、前記誘導体を液体の担体、もしくは微細に分割された固体担体、またはその両方と均質かつ密接に結合させた後、必要に応じて生成物を所望の製剤に形状化することにより製造する。経口投与に好適な本発明の製剤を、各々所定量の活性成分を含有するカプセル剤、カシェ剤もしくは錠剤などの別個の単位として、粉末もしくは顆粒として、水性液体もしくは非水性液体中の溶液もしくは懸濁液として、又は水中油液体乳濁液もしくは油中水乳濁液として提供することができる。この活性成分を、ボーラス剤、舐剤又はペースト剤として提供することもできる。

【0066】

錠剤を、必要に応じて1種以上の補助成分と共に圧縮又は成型することにより作製することができる。圧縮錠剤を、好適な機械中で、必要に応じて結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、潤滑化剤、界面活性剤又は分散剤と混合し、粉末又は顆粒などの自由流動形態に圧縮することにより製造することができる。成型錠剤を、好適な機械中で、不活性液体希釈剤で湿潤させた粉末状化合物の混合物を成型することにより製造することができる。30

【0067】

前記錠剤を、必要に応じてコーティングするか、又は刻み目を入れて製剤化し、活性成分のゆっくりした、又は制御された放出を提供することができる。

【0068】

例えば、筋肉内、腹腔内、又は皮下投与経路を介する注入のための製剤としては、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤及び該製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質を含んでもよい水性及び非水性滅菌注入溶液；並びに懸濁剤及び増ちよう剤を含んでもよい水性及び非水性滅菌懸濁液が挙げられる。この製剤を、例えば、密封されたアンプル及びバイアルなどの単回投与容器又は複数回投与容器中で提供することができ、また、使用直前に注入用の水などの滅菌液体担体の添加のみをする凍結乾燥状態で保存することができる。即時注入溶液及び懸濁液を、以前に記載の種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から製造することができる。頬又は鼻腔を介する経肺投与に好適な製剤を、望ましくは0.5～7ミクロンの範囲の直径を有する活性成分を含む粒子がレシピエントの気管支中に送達されるように提供する。そのような製剤の可能性は、それらが吸入装置における使用については、例えば、ゼラチンに好適な穿孔可能なカプセル中で、又は活性成分、好適な液体推進剤並びに必要に応じて界面活性剤及び／もしくは固体希釈液などの他の成分を含む自己推進型製剤として都合よく提供することができる微小粉末の形態にあるものである。活性成分が4050

溶液又は懸濁液の液滴の形態に調剤された自己推進型製剤を用いることもできる。そのような自己推進型製剤は当業界で公知のものと類似しており、確立された手順により製造することができる。それらは所望のスプレー特性を有する手動操作可能又は自動機能バルブを用いて好適に提供され、有利には、該バルブはその各操作に際して、例えば50~100 μLの固定された容量を送達する定量型のものである。

【0069】

さらなる可能性において、前記アジュバント成分は、加速された空気流もしくは超音波攪拌を用いて吸入用の微細な液滴霧を作り出すアトマイザーもしくはネプライザーにおける使用のための溶液の形態であってもよい。

【0070】

鼻腔内投与に好適な製剤としては、一般的には経肺投与について上記されたものと同様の提示物が挙げられるが、そのような製剤は鼻腔内での保持を可能にするために約10~約200ミクロンの範囲の粒子径を有するのが好ましい。これは、好適な粒子サイズの粉末の使用、又は好適なバルブの選択により達成することができる。他の好適な製剤としては、鼻のすぐ近くで保持される容器から鼻を通過する急速な吸入による投与のための約20~約500ミクロンの範囲の粒子径を有する粗い粉末、及び水性又は油性溶液中に約0.2~5% w/wの活性成分を含む鼻滴が挙げられる。本発明の一実施形態においては、抗原性ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターを、1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン誘導体と同じ製剤内で投与することができる。従って、この実施形態においては、免疫原成分及びアジュバント成分が同じ製剤内に認められる。

10

【0071】

ある実施形態では、前記アジュバント成分を遺伝子銃投与に好適な形態で製造し、前記ヌクレオチド配列の投与と実質的に同時にその経路を介して投与する。この様式における使用に好適な製剤の製造については、1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン誘導体を凍結乾燥し、例えば、遺伝子銃投与に適合させた金粒子上に接着させる必要がある。

20

【0072】

別の実施形態においては、前記アジュバント成分を、高圧ガス推進力を介して乾燥粉末として投与することができる。

【0073】

一緒に製剤化しない場合でも、前記アジュバント成分を前記ヌクレオチド配列と同じか、又はほぼ同じ投与部位に投与することは好適である。

30

【0074】

医薬製造物の他の詳細については、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1985)に見出すことができ、その開示はその全体が参照により本明細書に含まれるものとする。

【0075】

裸のポリヌクレオチド又はベクターを患者に導入するのに好適な技術としては、好適なビヒクルを用いた局所適用も挙げられる。この核酸を、皮膚に、又は、例えば、鼻腔内、経口、腔内もしくは直腸内投与により粘膜表面に局所的に投与することができる。裸のポリヌクレオチド又はベクターをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)などの製薬上許容し得る賦形剤と一緒に提供することができる。DNA製剤と別々に、又はその中に含有させた、ブピバカインなどの促進剤の使用により、DNAの取込みをさらに容易にすることができる。レシピエントに直接的に前記核酸を投与する他の方法としては、米国特許第5,697,901号に記載される超音波、電気刺激、エレクトロポレーション及びマイクロシーディングが挙げられる。

40

【0076】

核酸構築物の取込みを、例えば、トランスフェクション剤の使用を含むものなどのいくつかの公知のトランスフェクション技術により増強することができる。これらの薬剤の例としては、例えば、リン酸カルシウム及びDEAE-Dextranなどの陽イオン性薬剤並びに例えば、リポフェクタム及びトランスフェクタムなどのリポフェクタントが挙げられる。投与

50

する核酸の用量を変更することができる。

【0077】

本発明の核酸配列を、遺伝子治療において有用な特殊化された送達ベクターにより投与することもできる。遺伝子治療法は、例えば、Vermeら、Nature 1997, 389: 239-242に考察されている。ウイルス及び非ウイルスベクター系の両方を用いることができる。ウイルスに基づく系としては、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、カナリア痘及びワクシニアウイルスに基づく系が挙げられる。非ウイルスに基づく系としては、核酸の直接投与、ミクロスフェアカプセル封入技術(ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)及び、リポソームに基づく系が挙げられる。プラスミドなどの非ウイルスベクターを用いる最初のワクチン接種、例えば、最初の「初回免疫」DN 10 Aワクチン接種の後、ウイルスベクター又は非ウイルスに基づく系を用いる1回以上の「追加免疫」ワクチン接種を行う追加注入を提供することが望ましい場合、ウイルス及び非ウイルス送達系を組み合わせることができる。同様に、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを用いる初回免疫ブート系の後、アジュバント中のタンパク質を用いる追加免疫、又はその逆を包含する。

【0078】

本発明の核酸配列を、形質転換細胞を用いて投与することもできる。そのような細胞としては、被験体から収穫された細胞が挙げられる。本発明の裸のポリヌクレオチド又はベクターをin vitroでそのような細胞中に導入することができ、形質転換された細胞を後に該被験体に戻すことができる。本発明のポリヌクレオチドは相同的組換え事象により細胞中に既に存在する核酸中に組み込まれてもよい。形質転換細胞を、必要に応じて、in vitroで増殖させ、1種以上の得られた細胞を本発明に用いることができる。細胞を、公知の外科的又は微小外科的技術(例えば、移植、微小注入など)により患者の好適な部位に供給することができる。 20

【0079】

本発明の医薬組成物は、上記のアジュバント化合物、又は前記DNAによりコードされるタンパク質により誘導される免疫応答を増加させるのに役立つ他の物質を含んでもよい。これらは前記抗原とは別々に、もしくはそれとの融合物として前記DNAによりコードされてもよいし、又は前記製剤の非DNAエレメントとして含まれていてもよい。本発明の製剤中に含有させることができるアジュバント型物質の例としては、ユビキチン、リソソーム関連膜タンパク質(LAMP)、B型肝炎ウイルスのコア抗原、FLT3-リガンド(専門的抗原提示細胞の生成に重要なサイトカイン)並びにIFN- γ 及びGMCSFなどの他のサイトカインが挙げられる。他の好ましいアジュバントとしては、イミキモッド及びレシムキモッド及びツカラソールが挙げられる。イミキモッドが特に好ましい。 30

【0080】

本発明の特に好ましい実施形態において、本発明はHIV感染の治療又は予防のための本明細書に記載の核酸分子の使用を提供する。この核酸分子をイミキモッドと共に投与するのが好ましい。好ましくは、イミキモッドを局所的に投与するが、この核酸分子は粒子を介する送達により投与するのが好ましい。

【0081】

従って、本発明は、本明細書に記載の核酸分子及びイミキモッドを投与することを含む、HIVに罹患した被験者又はそれが疑われる患者を治療する方法を提供する。 40

【0082】

本発明を以下の実施例を参照することによりさらに説明する。

【実施例】

【0083】

実施例1：高度に発現されるヒト遺伝子のコドン使用に類似するようにするp55 gag (p17、p24、p13)の最適化
目的の遺伝子

哺乳動物細胞での発現のために最適化された、HIV-1クレードB HXB2株(GenBank登録K03

50

455)のp55gag抗原をコードする合成遺伝子を、PCRにより重複するオリゴヌクレオチドから組み立てた。

【 0 0 8 4 】

最適化は高度に発現されるヒト遺伝子において認められるものと近いコドン頻度を得るようにウイルス遺伝子のコドン使用パターンを変化させることを含んでいた。コドンを、Syngeneと呼ばれる統計学的Visual Basicプログラム(R.S. Hale及びG. Thompsonにより著されたCalcGeneのアップデート版、Protein Expression and Purification, Vol. 12, pp 185-188, 1998)を用いて割当てた。

【 0 0 8 5 】

クローニング :

10

1528 bpのgag PCR産物をゲル精製し、制限エンドヌクレアーゼNotI及びBamHIで切断し、NotI/BamHI切断ベクターWRG7077中に連結した。これにより、前記遺伝子はCMVプロモーター／イントロンAとウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルとの間に置かれる。

【 0 0 8 6 】

クローンを配列決定し、エラーを確認した。どの単一クローンも100%正確ではなかつた。従って、2個のクローンに由来する正確な配列の領域を、最適化オリゴセットの好適な組合せを用いた重複PCRにより結合して、コドン最適化されたgag遺伝子の全長を得た。続いて、この最終的なクローンがフレームシフト及び翻訳の早期の終結をもたらす1個のヌクレオチド欠失を含むことが判明した。不正確な配列を含む遺伝子の領域を切り出し、別のクローンの同等の領域に由来する正確な配列へとクローニングすることにより、この欠失を修復した。これにより、最終的にコドン最適化されたp55 gagクローン：Gagoptrpr2が得られた(図2を参照)。

20

【 0 0 8 7 】

実施例2 : p17/p24トランケートされたNef融合遺伝子の作製

目的の遺伝子

HIV-1クレードB HXB2株に由来するp55gag遺伝子のp17及びp24部分を、プラスミドpHXB?Pr (B. Maschera, E. Furfine及びE.D. Blair, 1995 J. Virol. 69 5431-5436)からPCR増幅させた。HXB2 nef遺伝子の3'末端に由来するpHXB?Prの426 bpを、同じプラスミドから増幅させた。HXB2 nef遺伝子は早期に現れる終結コドンを含むので、2つの重複PCRを用いてコドン(TGA[停止]からTGG[Trp]へ)を修復した。

30

【 0 0 8 8 】

PCR反応にて、p17/p24リンカー及びtrNEFリンカーPCR産物を連結させてp17p24trNEF融合遺伝子(図3)を形成させた(アンチセンス)。

【 0 0 8 9 】

1542 bpの産物をゲル精製し、制限エンドヌクレアーゼNotI及びBamHIで切断し、ベクターWRG7077のNotI-BamHI部位にクローニングした。これにより、前記遺伝子がCMVプロモーター／イントロンAとウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルとの間に置かれる。

【 0 0 9 0 】

実施例3 : Gag p17/24opt/trNef1(「Gagopt/Nef」)融合遺伝子の作製

目的の遺伝子

40

HIV-1クレードB HXB2株に由来するコドン最適化されたp55gag遺伝子のp17/p24部分を、プラスミドpGagOPTrpr2からPCR増幅させた。早期に現れる終結コドンが(TGA[停止]からTG[G-Trp]へ)修復されているトランケートされたHXB2 Nef遺伝子を、プラスミド7077trNef20からPCRにより増幅させた。2個のPCR産物は、2個の遺伝子を2回目のPCRにおいて連結することができるよう、重複する末端を有するように設計した。

【 0 0 9 1 】

1544 bpの産物をゲル精製し、制限エンドヌクレアーゼNotI及びBamHIで切断し、ベクターWRG7077のNotI-BamHI部位にクローニングした(図面を参照)。これにより、前記遺伝子はCMVプロモーター／イントロンAとウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルとの間に置かれる。

50

【0092】

実施例4：プラスミド：p7077-RT3クローン#A目的の遺伝子：

哺乳動物細胞での発現のために最適化された、HIV-1クレードB HXB2株のpol遺伝子のRT部分をコードする合成遺伝子を、PCRにより、重複するオリゴヌクレオチドから組み立てた。クローニングされる配列はHXB2参照配列(GenBank登録K03455)の2550～4222位と等価である。発現を確実にするために、クローニングされた配列は元の遺伝子には存在しない5'末端の2個の追加コドン-AUG GGC (Met Gly)を有する。

【0093】

最適化は、高度に発現されるヒト遺伝子において認められるものと近いコドン頻度を得るためにウイルス遺伝子のコドン使用パターンを変化させて、稀に使用されるコドンを排除することを含んでいた。Syngeneと呼ばれる統計学的Visual Basicプログラム(R.S. Hale及びG. Thompsonにより著されたCalcGeneのアップデート版、Protein Expression and Purification, Vol. 12, pp 185-188, 1998)を用いてコドンを割当てた。

10

【0094】

最終的なクローンを、2個の中間体クローン、#16及び#21から構築した。

【0095】

クローニング：

1.7 kbのPCR産物をゲル精製し、NotI及びBamHIで切断し、PCRでクリーニングした後、NotI/BamHIで切断したpWRG7077と連結した。これにより、前記遺伝子はCMVプロモーターとウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルとの間に置かれる。クローンを配列決定した。100%正確なクローンはなかったが、クローン#16では、3個のエラーを含む403 bpのKpnI-BamHI断片をクローン#21に由来する正確なKpnI-BamHI断片と置換することにより修正を行った。最終的なクローンを配列決定により確認した(図5を参照)。

20

【0096】

実施例5：最適化されたRT目的の遺伝子

哺乳動物細胞での発現のために最適化された、HIV-1クレードB HXB2株のpol遺伝子のRT部分をコードする合成遺伝子を、1697 bpのNotI/BamHI断片としてプラスミドp7077-RT3から切り出し、ゲル精製し、p7313-ie (pspC31由来)のNotI-BamHI部位にクローニングして、この遺伝子がアイオワ長HCMVプロモーター+エクソン1の下流、かつウサギグロビンポリアデニル化シグナルの上流に置かれるようにした(R7004 p27) (図6)。

30

【0097】

実施例6プラスミド：7077trNef20目的の遺伝子

この挿入物はHIV-1クレードB HXB2株由来のNef遺伝子の一部を含む。この遺伝子の5'末端から195 bpを欠失させ、Nefの最初の65アミノ酸のコドンを除去する。さらに、公表されているHXB2 nef配列中の早期に現れる終結コドンを、プラスミドp17/24trNEF1について記載されたのと同様にして(TAGからTGG[Trp]に)修正した。このトランケートされたnef配列をプラスミドp17/24trNef1からPCR増幅した。クローニングされた配列はHXB2参照配列(GenBank登録K03455)の8992～9417位と等価である。発現を確実にするために、クローニングされた配列は元の遺伝子には存在しない5'末端の追加コドン-AUG (Met)を有する。

40

【0098】

プライマー：

StrNef (センス) ATAAGAATGCGGCCGCCATGGTGGTTTCCAGTCACACCTT [配列番号1]

AStrNef (アンチセンス) CGCGGATCCTCAGCAGTTCTGAAGTACTCC [配列番号2]

PCR：94℃で2分、次いで94℃で30秒、50℃で30秒、72℃で2分を25サイクル、72℃で5分で終了。

【0099】

50

クローニング：

455 bpのRT PCR産物をゲル精製し、制限エンドヌクレアーゼNotI及びBamHIで切断し、NotI/BamHI切斷されたベクターWRG7077に連結した。これにより、前記遺伝子はCMVプロモーター／イントロンAとウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルとの間に置かれる。

【0100】

実施例7プラスミド：7077RT 8目的の遺伝子

pol遺伝子のRT部分はHIV-1クレードB HXB2株に由来するものであった。それをプラスミドp7077Pol14からPCR増幅した。

【0101】

クローニングされた配列はHXB2参照配列(GenBank登録K03455)の2550～4234位と等価である。発現を確実にするために、クローニングされた配列は元の遺伝子には存在しない5'末端の2個の追加コドン-AUG GGC (Met Gly)を有する。

【0102】

プライマー：

SRT (センス) ATAAGAATCGGGCCGCCATGGGCCCATAGCCCTATTGAGACT [配列番号3]

ASRT (アンチセンス) CGCGGATCCTTAATCTAAAAATAGTACTTTCTGATT [配列番号4]

PCR: 94 で2分、次いで94 で30秒、50 で30秒、72 で4分を25サイクル、72 で5分で終了。

【0103】

クローニング：

1720 bpのRT PCR産物をゲル精製し、制限エンドヌクレアーゼNotI及びBamHIで切断し、NotI/BamHI切斷されたベクターWRG7077に連結した。これにより、前記遺伝子はCMVプロモーター／イントロンAとウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルとの間に置かれる。

【0104】

実施例8p17/24opt/RT/trNef13 (「Gagopt/RT/Nef」)

この構築物はRからHへのアミノ酸変化を引き起こすPCRを含む。

【0105】

目的の遺伝子：

HIV-1クレードB HXB2株由来のコドン最適化されたp55gag遺伝子のp17/p24部分を、プラスミドpGagOPTpr2からPCR増幅した。RTをコードする配列を、プラスミド7077RT 8からPCR増幅した。(TGA[停止]からTGG[Trp]へ)修正された早期に現れる終結コドンを有するトランケートされたHXB2 Nef遺伝子を、プラスミド7077trNef20からPCRにより増幅した。3つのPCR産物は、この3個の遺伝子を2回目のPCRにおいて連結することができるよう、重複する末端を有するように設計した。

【0106】

プライマー：

(p17/24)

Sp17p24opt (センス) ATAAGAATCGGGCCGCCATGGGTGCCGAGCTTCGGT [配列番号5]

ASp17p24optRTリンカー(アンチセンス) TGGGGCCCATAACACTCTGGCTTGTC [配列番号6]

PCR: 94 で1分、次いで94 で30秒、50 で30秒、72 で2分を20サイクル、72 で4分で終了。

1114 bpのp17/24opt産物をゲル精製した。

【0107】

(RT)

Sp17p24optRTリンカー(センス) CAGAGTGTGATGGGCCCATAGCCCTAT [配列番号7]

ASRTtrNefリンカー(アンチセンス) AACCCACCATATCTAAAAATAGTACTTTCC [配列番号8]

PCR: 上記の通り

10

20

30

40

50

1711 bpのRT PCR産物をゲル精製した。

【0108】

(5'トランケートされたnef)

SRTtrNefリンカー(センス) CTATTTTAGATATGGTGGGTTCCAGTCAC [配列番号9]

ASTrNef (アンチセンス) CGCGGATCCTCAGCAGTTCTGAAGTACTCC [配列番号10]

PCR: 上記の通り

448 bpの産物をゲル精製した。

【0109】

次いで、3つのPCR産物をプライマー-Sp17/24opt及びAs trNefを用いて2回目のPCRにおいて1つに縫合した。

10

【0110】

PCR: 94 で1分、次いで94 で30秒、50 で30秒、72 で4分を30サイクル、72 で4分で終了。

【0111】

3253 bpの産物をゲル精製し、制限エンドヌクレアーゼNot I及びBamHIで切断し、ベクター-WRG7077のNot I/BamHI部位にクローニングした。これにより、前記遺伝子はCMVプロモーター/イントロンAとウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルとの間に置かれる。

【0112】

実施例9

プラスミド : pGRN#16 (p17/p24opt corr /RT/trNef.)

20

目的の遺伝子 :

p17/24opt/RT/trNef13 (「Gagopt/RT/Nef」)により生成されるポリタンパク質は、アミノ酸270周辺のp24内の好ましくないコドンのクラスターに起因して約30 kDaのトランケートされた産物を発現することが観察された。これらを、PCR縫合(stitching)突然変異誘発により最適なコドンと置換した。鋳型としてp17/24opt/RT/trNef13を用いて、プライマー-Sp17/p24opt及びGTR-Aを用いてGagの5'から突然変異までの部分、並びにプライマー-GTR-S及びAsp17/p24optRTリンカーを用いてGagの3'から突然変異までの部分を増幅した。これらの産物の重複部分はコドンの変化を含んでおり、ゲル精製された産物を、Sp17/p24opt及びAsp17/p24optRTリンカープライマーを用いて1つに縫合した。この産物をNot I及びAge Iで切断し、同様に切断したp17/24opt/RT/trNef13中に挿入して、pGRNを作製した。クローン#16を確認し、先に進めた。

30

【0113】

プライマー :

5'PCR :

Sp17p24opt (センス)

ATAAGAACATGCCGCGCCATGGGTGCCGAGCTTCGGT [配列番号11]

GTR-A (アンチセンス)

GCGCACGATCTTGTTCAAGGCCAGGATGATCCACCGTTATAGATTCTCC [配列番号12]

3' PCR

センス: GTR-S(センス)

ATCCTGGGCCTGAACAAGATCGTGCATGTACTCTCCGACATCCATCC [配列番号13]

40

ASp17p24optRTリンカー (アンチセンス)

TGGGGCCCATCAACACTCTGGCTTGTGTC [配列番号14]

PWO DNAポリメラーゼ(Roche)を用いる、個々の産物及び縫合のためのPCR条件は以下の通り: 95 で1分、次いで95 で30秒、55 で30秒、72 で180秒を20サイクル、72 で120秒で終了、4 にて保持。

【0114】

1114 bpの産物をゲル精製し、Not I及びAge Iで切断して、6647 bpの断片を遊離させ、これをゲル精製し、Not I/Age I切断されゲル精製されたp17/24opt/RT/trNef13中に連結して、pGRN#16を作製した。

50

【0115】

実施例10

プラスミド : p73i-GRN2 クローン#19
(p17/p24(opt)/RT(opt)trNef)-修正後

目的の遺伝子 :

コドン最適化されたgagのp17/p24部分、アイオワ長HCMVプロモーター + エキソン1の下流、かつウサギ - グロビンのポリアデニル化シグナルの上流のHIV-1クレードB HXB2株に由来するコドン最適化されたRT並びにトランケートされたNef遺伝子。

【0116】

プラスミドp17/24trNef1に由来するtrNef遺伝子を含むプラスミドは、nefの末端から19アミノ酸にRからHへのアミノ酸変化をもたらすPCRエラーを含む。これをPCR突然変異誘発により修正し、修正されたnef PCRをp7077-RT3に由来するコドン最適化されたRTと縫合し、縫合された断片をApaI及びBamHIで切断し、ApaI/BamHIで切断したp73i-GRN中にクローニングした。

【0117】

プライマー :

以下のプライマーを用いるp7077-RT3からのcoRTのPCR :
(ポリメラーゼ = PWO(Roche) 全部について)。

【0118】

センス : U1

GAATT CGCGGCCGCGATGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGAT [配列番号15]
]

AScoRT-Nef

GGTGTGACTGGAAAACCCACCATCAGCACCTTCTAACCCCCGC [配列番号16]

サイクル : 95 (30秒)、次いで95 (30秒)、55 (30秒)、72 (180秒)を20サイクル、
次いで72 (120秒)、4 にて保持

1.7kbのPCR産物をゲル精製した。

【0119】

以下のプライマーを用いるp17/24trNef1からの5' NefのPCR :

センス : S-Nef

ATGGTGGGTTTCAGTCACACC [配列番号17]

アンチセンス : ASNef-G:

GATGAAATGCTAGGCGGCTGTCAAACCTC [配列番号18]

サイクル : 95 (30秒)、次いで95 (30秒)、55 (30秒)、72 (60秒)を15サイクル、次
いで72 (120秒)、4 にて保持。

【0120】

以下のプライマーを用いるp17/24trNef1からの3' NefのPCR :

センス : SNEF-G

GAGGTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATC [配列番号19]

アンチセンス :

AStrNef (アンチセンス)

CGCGGATCCTCAGCAGTTCTGAAGTACTCC [配列番号20]

サイクル : 95 (30秒)、次いで95 (30秒)、55 (30秒)、72 (60秒)を15サイクル、次
いで72 (120秒)、4 にて保持。

【0121】

PCR産物をゲル精製した。最初にこの2つのNef産物を、5' (S-Nef)及び3' (AStrNef)プライマーを用いて縫合した。

【0122】

サイクル : 95 (30秒)、次いで95 (30秒)、55 (30秒)、72 (60秒)を15サイクル、次
いで72 (180秒)、4 にて保持。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 3 】

PCR産物をPCRクリーニングし、U1及びAstrNefプライマーを用いてRT産物と縫合した：
サイクル：95 (30秒)、次いで95 (30秒)、55 (30秒)、72 (180秒)を20サイクル、
次いで72 (180秒)、4 にて保持。

【 0 1 2 4 】

2.1 kbの産物をゲル精製し、ApaI及びBamHIで切断した。プラスミドp731-GRNもApaI及びBamHIで切断し、ゲル精製し、ApaI-Bam RT3trNefと連結して、p17/p24(opt)/RT(opt)trNef遺伝子を再構築した。

【 0 1 2 5 】

実施例11

10

p731-GN2クローン#2 (p17/p24opt/trNef)-修正後

目的の遺伝子：

コドン最適化されたgagのp17/p24部分、並びにアイオワ長HCMVプロモーター + エキソン1の下流、かつウサギ - グロビンのポリアデニル化シグナルの上流のHIV-1クレードB HXB2株に由来するトランケートされたNef遺伝子。

【 0 1 2 6 】

プラスミドp17/24trNef1に由来するtrNef遺伝子を含むプラスミドは、Nefの末端から19アミノ酸にRからHへのアミノ酸変化をもたらすPCRエラーを含む。これをPCR突然変異誘発により修正し、修正された断片をBgIII及びBamHIで切断し、BgIII/BamHIで切断されたp731-GN中にクローニングし(図12)、アイオワ長HCMVプロモーター + エキソン1の下流、かつウサギ - グロビンのポリアデニル化シグナルの上流に位置する修正されたp17/p24opt/trNef融合遺伝子を再構築した。

20

【 0 1 2 7 】

以下のプライマーを用いるp17/24trNef1からの5' NefのPCR：

ポリメラーゼ = PWO(Roche) 全部について

センス：S-Nef

ATGGTGGGTTTCCAGTCACACC [配列番号21]

アンチセンス：ASNef-G:

GATGAAATGCTAGGCGGCTGTCAAACCTC [配列番号22]

サイクル：95 (30秒)、次いで95 (30秒)、55 (30秒)、72 (60秒)を15サイクル、次いで72 (120秒)、4 にて保持。

30

【 0 1 2 8 】

以下のプライマーを用いるp17/24trNef1からの3' NefのPCR：

センス：SNEF-G

GAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTCATC [配列番号23]

アンチセンス：AStrNef

CGCGGATCCTCAGCAGTTCTGAAGTACTCC [配列番号24]

サイクル：95 (30秒)、次いで95 (30秒)、55 (30秒)、72 (60秒)を15サイクル、次いで72 (120秒)、4 にて保持。

40

【 0 1 2 9 】

PCR産物をゲル精製し、5' (S-Nef)及び3' (AStrNef)プライマーを用いて縫合した。

【 0 1 3 0 】

サイクル：95 (30秒)、次いで95 (30秒)、55 (30秒)、72 (60秒)を15サイクル、次いで72 (180秒)、4 にて保持。

【 0 1 3 1 】

PCR産物をPCRクリーニングし、BgIII/BamHIで切断し、367 bpの断片をゲル精製し、BgIII/BamHI切断したゲル精製されたp731-GN中にクローニングした。

【 0 1 3 2 】

実施例12

プラスミド：p731-RT w229k (不活化RT)

50

目的の遺伝子：

アイオワ長HCMVプロモーター + エキソン1の下流、かつウサギ - グロビンのポリアデニル化シグナルの上流の不活化RT遺伝子の作製。

【0133】

治療的ワクチンにおける活性なHIV RT種の使用に関しては、前記遺伝子の不活化が望ましかった。これを、RT(P73I-GRN2由来)のアミノ酸229位をTrpからLysにするPCR突然変異誘発により達成した(R7271 p1-28)。

【0134】

プライマー：

以下のプライマーを用いる5' RT + 突然変異のPCR：

10

(ポリメラーゼ = PWO(Roche) 全部について)

センス：RT-u:1

GAATTCCGGGCCGCGATGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGAT [配列番号25]
]

アンチセンス：AScoRT-Trp229Lys

GGAGCTCGTAGCCCATCTTCAGGAATGGCGGCTCCTTCT [配列番号26]

サイクル：

1 x [94 (30秒)]
15 x [94 (30秒)/55 (30秒)/72 (60秒)]
1 x [72 (180秒)]

20

PCRゲル精製

【0135】

以下のプライマーを用いる3' RT + 突然変異のPCR：

アンチセンス：RT3- I:1

GAATTGGATCCTTACAGCACCTTCTAATCCCCGCACTCACCAAGCTTGTGACCTGCTCGTTGCCGC [配列番号27]
]

センス：ScoRT-Trp229Lys

CCTGAAGATGGGCTACGAGCTCCATG [配列番号28]

サイクル：

1 x [94 (30秒)]
15 x [94 (30秒)/55 (30秒)/72 (60秒)]
1 x [72 (180秒)]

30

PCRゲル精製

このPCR産物をゲル精製し、RTの5' 及び3' 末端を、5' (RT3-U1) 及び3' (RT3-L1) プライマーを用いて縫合した。

【0136】

サイクル：

1 x [94 (30秒)]
15 x [94 (30秒)/55 (30秒)/72 (120秒)]
1 x [72 (180秒)]

40

このPCR産物をゲル精製し、NotI 及びBamHI制限部位を用いてp7313ie中にクローニングして、p73I-RT w229kを作製した(図13を参照)。

【0137】

実施例13

プラスミド：p73i-Tgrn(#3)

目的の遺伝子：

コドン最適化されたgagのp17/p24部分、コドン最適化されたRT及びアイオワ長HCMVプロモーター + エキソン1の下流、かつウサギ - グロビンのポリアデニル化シグナルの上流のHIV-1クレードB HXB2株に由来するトランケートされたNef遺伝子。

【0138】

50

活性型RTを含む3種融合構築物はヒトでの使用について規制当局にとって許容できないかもしだいので、p73i-RT w229kに由来するNheI及びApaI切断断片をNheI/ApaI切断p73i-GRN2#19中に挿入することによりRTの不活化を達成した(図14)。これによりRT中の229位でWからKへの変化が得られる。

【 0 1 3 9 】

実施例14

p73i-Tnrg(#16)

目的の遺伝子 :

トランケートされたNef、不活化されコドン最適化されたRT、及び、アイオワ長HCMVプロモーター+エキソン1の下流かつウサギ-グロビンのポリアデニル化シグナルの上流の HIV-1クレードB HXB2株に由来するコドン最適化されたgag遺伝子のp17/p24部分。 10

【 0 1 4 0 】

p73i-Tgrnによりコードされるポリタンパク質中の遺伝子の順序をPCR及びPCR縫合により再配列し、p73i-Tnrgを作製した(図15)。各遺伝子をPCR増幅し、ゲル精製した後、該遺伝子をPCR縫合して、単一のポリタンパク質を形成させた。この産物をゲル精製し、NotI/BamHI消化し、NotI/BamHI切断したp7313ie中に連結した。

【 0 1 4 1 】

プライマー :

trNef PCR

S-Nef (Not I)

CATTAGAGCGGCCGCGATGGTGGGTTTCCAC [配列番号29]

AS-Nef-coRT リンカー

GATGGGACTGATGGGCCCATGCAGTTCTGAACCTACTCCGG [配列番号30]

RTw229k PCR

S-coRT

ATGGGCCCATCAGTCCCATCGAG [配列番号31]

AS-coRT-p17p24 リンカー

CAGTACCGAAGCTCGGGACCCATCAGCACCTTCTAACCCCCGC [配列番号32]

p17p24opt PCR

S-p17p24opt

ATGGGTGCCGAGCTTCGGTACTG [配列番号33]

AS-p17p24opt (BamHI)

GATGGGGATCCTCACAAACACTCTGGCTTGTGTCC [配列番号34]

個々の産物及びVENT DNAポリメラーゼ(NEB)を用いる縫合のためのPCR条件 :

1 x [94 (30秒)]

25 x [94 (30秒)/55 (30秒)/72 (120秒 [p17p24もしくはRT]又は60秒[trNef])]

1 x [72 (240秒)]

PCR産物をゲル精製し、プライマーS-trNef (NotI)及びAS-p17p24opt (BamHI)を用いるPCR縫合において用いた :

1 x [94 (30秒)]

25 x [94 (30秒)/55 (30秒)/72 (210秒)]

1 x [72 (240秒)]

3000 bpの産物をゲル精製し、NotI及びBamHIで切断し、これをPCRクリーニングして、NotI/BamHI消化しゲル精製したp7313ie中に連結してp73i-Tnrgを作製した。

【 0 1 4 2 】

実施例15

1. プラスミド : P73i-Tngr (#3)

目的の遺伝子 :

トランケートされたNef、コドン最適化されたgagのp17/p24部分、及び、アイオワ長HCMVプロモーター+エキソン1の下流かつウサギ-グロビンのポリアデニル化シグナルの上

10

20

30

40

50

流のHIV-1クレードB HXB2株に由来する不活化されたコドン最適化されたRT遺伝子。

【0143】

p73i-Tgrnによりコードされるポリタンパク質中の遺伝子の順序をPCRによって再配列し、p73i-Tngrを作製した(図16)。コドン最適化されたp17/p24及びRTを単一の産物として作製し、増幅したtrNefにPCR縫合した。この産物をゲル精製し、NotI/BamHI消化し、NotI/BamHI切断したp7313ie中に連結した。

【0144】

プライマー：

P17/p24 - RT 3' PCR:

Sp17p24opt (センス)

10

ATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTG [配列番号35]

RT3 U:1 (アンチセンス)

GAATTGGATCCTTACAGCACCTTCTAATCCCCGCACTACCAGCTGTCGACCTGCTCGTTGCCGC [配列番号36]

]

TrNef 5' PCR

S-Nef (NotI)

CATTAGAGCGGCCGCGATGGTGGGTTTCCAC [配列番号37]

AS-Nef-p17p24

CAGTACCGAAGCTCGGGCACCCATGCAGTTCTTGAACCTACTCCGG [配列番号38]

個々の産物及びVENT DNAポリメラーゼ(NEB)を用いる縫合のためのPCR条件：

20

1 x [94 (30秒)]

25 x [94 (30秒)/55 (30秒)/72 (180秒 [p17p24+RT] 又は60秒 [trNef] 又は210秒 [縫合])]

1 x [72 (240秒)]

3000 bpの産物をゲル精製し、NotI及びBamHIで切断し、これをPCRクリーニングして、NotI/BamHI消化しゲル精製したp7313ie中に連結してp73i-Tngrを作製した。

【0145】

実施例16

プラスミド：p73i-Tgn (#6)

目的の遺伝子：

30

不活化されコドン最適化されたRT、コドン最適化されたgagのp17/p24部分、及び、アイオワ長HCMVプロモーター + エキソン1の下流かつウサギ - グロビンのポリアデニル化シグナルの上流のHIV-1クレードB HXB2株に由来するトランケートされたNef遺伝子。

【0146】

この構築物内の遺伝子の順序を、それぞれプラスミドp73i-GN2及びp73i-RTw229kに由来するp17p24-trNef及びRTw229kのPCR増幅により達成した。PCR縫合を行い、得られた産物をゲル精製し、NotI/BamHI切断した後、NotI/BamHI消化されたp7313ieと連結した。配列決定により、p17p24が完全には最適化されていないことが示されたので、700 bpの断片をコード領域からAgeI/MunI切断し、正確なコード領域を含むp73i-Tgrn#3に由来するMunI/AgeI断片と置換した(図17を参照)。

40

【0147】

プライマー：

p17p24-trNef PCR

S-p17p24opt

ATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTG [配列番号39]

AstrNef (BamHI)

RTw229k

RT3-U:1

GAATTGGCGCCGCGATGGGCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGAT [配列番号40]

]

50

AS-coRT-p17p24opt リンカー

CAGTACCGAAGCTCGGGCACCCATCAGCACCTTCTAATCCCCGC [配列番号41]

個々の産物及びVENT DNAポリメラーゼ(NEB)を用いる縫合のためのPCR条件:

1 x [94 (30秒)]

25 x [94 (30秒)/55 (30秒)/72 (120秒(PCR)又は180秒(縫合))]

1 x [72 (240秒)]

PCR縫合から得られた3000 bpの産物をゲル精製し、NotI及びBamHIで切断し、これをPCRクリーニングし、NotI/BamHI消化されゲル精製されたp7313ie中に連結して、p73i-Tngrを作製した。配列分析により、p73i-GN2から得られたp17p24配列は完全にはコドン最適化されておらず、これが新しいプラスミド中で継続してきたことが示された。MunI及びAgeIで切断されたp73i-Tngrから700 bpの断片を切断し、p73i-Tgrnに由来する700 bpのMunI/AgeI消化産物と連結することによりそれを置換して構築物p73i-Tngr#6を作製することにより、それを修正した。

【0148】

実施例17プラスミド:p73i-Trng (#11)目的の遺伝子:

不活性化コドン最適化されたRT、トランケートされたNef、及び、アイオワ長HCMVプロモーター+エキソン1の下流かつウサギ-グロビンのポリアデニル化シグナルの上流のHIV-1クレードB HXB2株に由来するコドン最適化されたgag遺伝子のp17/p24部分。

【0149】

この構築物内の遺伝子の順序は、p73i-TgrnからのRT-trNef及びp17p24遺伝子のPCR増幅により達成した。この2つのDNA断片のPCR縫合を行い、3 kbの産物をゲル精製し、NotI/BamHIで切断した後、NotI/BamHI消化されたp7313ieと連結して、p73i-Trng (#11)を得た。

【0150】

プライマー:RTw229k-trNef

RT3-u:1

GAATT CGCGGCCGCGATGGGCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGAT [配列番号42]

]

30

AS-Nef-p17p24opt リンカー

CAGTACCGAAGCTCGGGCACCCATGCAGTTCTTGAACTA CTCGG [配列番号43]

P17p24

S-p17p24opt

ATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTG [配列番号44]

AS-p17p24opt(BamHI)

GATGGGGGATCCTCACAACTCTGGTTGTGTCC [配列番号45]

個々の産物及びVENT DNAポリメラーゼ(NEB)を用いる縫合のためのPCR条件:

1 x [94 (30秒)]

25 x [94 (30秒)/55°C (30秒)/72 (120秒(遺伝子のPCR)又は180秒(縫合))]

1 x [72 (240秒)]

40

PCR縫合からの3000 bpの産物をゲル精製し、NotI及びBamHIで切断し、これをPCRクリーニングし、NotI/BamHI消化されゲル精製されたp7313ie中に連結して、p73i-Tngrを作製した。

【0151】

実施例18p73i-Tngr (#f1)目的の遺伝子:

コドン最適化されたgagのp17/p24部分、トランケートされたNef、及び、アイオワ長HCMVプロモーター+エキソン1の下流かつウサギ-グロビンのポリアデニル化シグナルの上

50

流のHIV-1クレードB HXB2株に由来するコドン最適化され不活化されたRT遺伝子。

【0152】

この構築物内の遺伝子の順序は、プラスミドp731-GN2及びp731-RTw229kのそれぞれからのp17p24-trNef及びRTw229kのPCR増幅により達成した。PCR縫合を行い、得られた産物をゲル精製し、NotI/BamHI切断した後、NotI/BamHI消化されたp7313ieと連結した。2つの配列エラーを配列(p17p24及びRT)中で確認し、続いてこれを、ポリタンパク質内の制限部位を用いて遺伝子の正確な一部分と置換することにより修正した(図19を参照)。

【0153】

プライマー：

p17p24-trNef PCR

10

S-p17p24opt

ATGGGTGCCGAGCTCCGTACTG [配列番号46]

AS-Nef-coRTリンクー

GATGGGACTGATGGGGCCCATGCAGTTCTGAACCTACTCCGG [配列番号47]

RTw229k

S-coRT

ATGGGCCCATCAGTCCCATCGAG [配列番号48]

RT3-1:1

GAATTGGATCCTTACAGCACCTTCTAATCCCCGCACTCACCAGCTTGTCGACCTGCTCGTTGCCGC [配列番号49]

]

20

個々の産物及びVENT DNAポリメラーゼ(NEB)を用いる縫合のためのPCR条件：

1 x [94 (30秒)]

25 x [94 (30秒)/55 (30秒)/72 (120秒(PCR)又は180秒(縫合))]

1 x [72 (240秒)]

3000 bpの産物をゲル精製し、NotI及びBamHIで切断し、これをPCRクリーニングし、NotI/BamHI消化されゲル精製されたp7313ie中に連結して、p731-Tgnrを作製した。配列決定により、p17p24は完全には最適化されていないことが示され、続いて700 bpの断片をコード領域からAgeI/MunI切断し、正確なコード配列を含むp731-Tgnr#3に由来するMunI/Age断片と置換した。このポリタンパク質は、該ポリタンパク質のRT部分の中でThrからAlaへのアミノ酸置換をもたらす1個の点突然変異(G2609A)も含んでいた。この突然変異を、前記構築物をApal/BamHI消化し、PCRクリーニングして突然変異配列を除去し、これをp731-Tgnrに由来するRTのApal/BamHI消化部分と連結することで置換することにより、修正した。

30

【0154】

実施例19

「遺伝子銃」DNAカートリッジのためのプラスミド被覆された「金スラリー」の製造

プラスミドDNA(約1 μg/μl)、例えば、100 μgと、2 μmの金粒子、例えば、50 mg (Powerject)を、0.05 Mスペルミジン、例えば、100 μl(Sigma)中に懸濁した。このDNAを、1 M CaCl₂、例えば、100 μl(American Pharmaceutical Partners, Inc., USA)を添加することにより前記金粒子上に沈降させた。DNA / 金複合体を室温にて10分間インキュベートし、無水エタノール、例えば、3 x 1 mlで3回洗浄した(分子ふるい13A(BDH)上で予め乾燥させておいた)。サンプルを、0.05 mg/mlのポリビニルピロリドン(PVP, Sigma)を含む無水エタノール中に再懸濁し、1.5 mlチューブ(Eppendorf)中、3つの均等なアリコートに分割した。このアリコートは(a)「金スラリー」及び(b)溶出液[(a)から溶出したプラスミド]の分析用、並びに、「遺伝子銃」のための金 / プラスミド被覆Tefzelカートリッジの製造用の(c)であった(実施例3以下を参照)。サンプル(a)及び(b)の製造については、エタノール / PVP中にプラスミドDNA / 「金スラリー」を含むチューブをEppendorf 5418マイクロ遠心機中、最高速で2分間遠心分離し、上清を除去し、室温にて10分間「金スラリー」を乾燥させた。サンプル(a)を、TE pH 8.0中の0.5~1.0 μg/μlのプラスミドDNA(約50%のコーティングを想定)に再懸濁させた。溶出については、サンプル(b)を、TE pH 8.0中の0.5~1.0 μg/μlのプラスミドDNAに再懸濁させ、37 °Cにて30分間インキュベートし、十分振

40

50

り混ぜた後、Eppendorf 5418マイクロ遠心機中、最高速で2分間遠心分離し、上清、溶出液を採取し、-20°Cにて保存した。溶出した正確なDNA濃度を、Genequant II (Pharmacia Biotech)を用いる分光光度測定により決定した。

【0155】

実施例20

DNA免疫化のためのカートリッジの製造

Accell遺伝子導入装置のためのカートリッジの製造は以前に記載された通りである(Eisenbraunら、DNA and Cell Biology, 1993 Vol 12 No 9 pp 791-797; Pertnerら)。簡単に述べると、プラスミドDNAを、2 μmの金粒子(DeGussa Corp., South Plainfield, N.J., USA)上に被覆し、1.27 cmの長さに切断した後カートリッジとして機能するTefzelチューブ中にロードし、使用するまで4°Cにて保存し、乾燥させた。典型的なワクチン接種においては、各カートリッジは、カートリッジあたり総計0.5 μgのDNAで被覆した0.5 mgの金を含んでいた。

【0156】

実施例21

遺伝子銃を用いるDNAワクチン接種後のHIV抗原に対する免疫応答

マウス(n=3/群)を、核酸によりコードされ、2つのベクター中に配置された抗原を用いてワクチン接種した。P7077はイントロンA及びエキソン1を含むHCMV IEプロモーター(fcmvプロモーター)を用いるものである。P73Iは同じ抗原を送達するが、イントロンAは含まれないがエキソン1を含むHCMV IEプロモーター(icmvプロモーター)を含む。

【0157】

プラスミドを、F1(C3H × Balb/c)マウスの腹部皮膚の毛剃りした標的部位に送達した。マウスに、0日目に2 × 0.5 μgのDNAの初回免疫を施し、35日目に2 × 0.5 μgのDNAを追加免疫し、IFN-ELISPOTを用いて40日目に細胞応答を検出した。

【0158】

P73I	-	空のベクター	
P7077	-	空のベクター	
P7077	GRN	(f CMVプロモーター) Gag, RT, Nef	
P73I	GRN	(i CMVプロモーター) Gag, RT, Nef	
P73I	GR3N	(CMVプロモーター) 最適化されたGag, 最適化されたRT, Nef	30
P7077	GN	(f CMVプロモーター) Gag, Nef	
P73I	GN	(i CMVプロモーター) Gag, Nef	

細胞傷害性T細胞応答

細胞傷害性T細胞応答を、5日以後に回収された脾細胞のCD8+ T細胞限定IFN-ELISPOTアッセイにより評価した。マウスを頸部脱臼により殺し、脾臓を氷冷PBS中に回収した。脾細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で細かく裂いた後、赤血球細胞を溶解させた(155 mM NH₄Cl、10 mM KHCO₃、0.1 mM EDTAからなるバッファー中で1分間)。PBS中で2回洗浄して粒子状物質を除去した後、単一の細胞懸濁液を、捕捉IFN-抗体で予め被覆し、CD8限定同族ペプチド(Gag、Nef又はRT)で刺激したELISPOTプレート中に分割した。一晩培養した後、IFN-産生細胞を、抗マウスIFN-βイオチン標識抗体(Pharmingen)、次いでストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼを適用することにより可視化し、画像分析を用いて定量した。

【0159】

この実験の結果を図20、21及び22に示す。

【0160】

実施例22

ワクチン構築物の免疫原性

1. 細胞アッセイ

細胞免疫応答は細胞傷害性CD8細胞及びヘルパーCD4細胞を含む。特定のCD8及びCD4細胞を検出する高感度な方法は、インターフェロン-γ又はIL-2を分泌することができる細胞

数を定量するのに用いることができるELIspotアッセイである。ELIspotアッセイは個々の細胞から分泌されるサイトカインの捕捉に依存する。簡単に述べると、特殊化されたマイクロタイプレートを抗サイトカイン抗体で被覆する。免疫化された動物から単離された脾細胞を、公知のエピトープ(CD8)又はタンパク質(CD4)を提示する特定のペプチドの存在下で一晩インキュベートする。細胞が刺激されてサイトカインを放出する場合、それらは個々の産生細胞の位置周辺のプレート表面上で前記抗体に結合するであろう。サイトカインは、細胞を溶解させてプレートを洗浄した後も被覆抗体と結合したままである。このアッセイを、ビオチン／アビジン増幅系を用いるELISAアッセイと同様の方法で開発する。スポット数をサイトカイン産生細胞の数と等しいものとみなす。

【0161】

10

以下のK2^d-限定マウスエピトープ：Gag (AMQMLKETI)、Nef (MTYKAAVDL) 及びRT (YYDPSKDLI)に対するCD8の応答並びにGag、及びRTタンパク質に対するCD4の応答を全部で6つの構築物について記録した。これらのアッセイの結果を統計学的に分析し、構築物をその免疫原性に従ってランク付けした。その結果を図面の図23に示す。

【0162】

2. 体液アッセイ

2つの実験から、追加免疫の7日及び14日後に抗体の分析のために血液サンプルを回収した。血清を分離し、特異的ELISAアッセイを用いて抗体力値を測定することができるまで冷凍保存した。全サンプルを、Gag、Nef及びRTに対する抗体について試験した。簡単に述べると、ELISAプレートを関連するタンパク質で被覆した。過剰のタンパク質を洗浄除去した後、希釈した血清サンプルをウェル中でインキュベートした。血清サンプルを洗浄除去し、適当なタグとコンジュゲートさせた抗マウス抗血清を添加した。プレートを発色させ、プレートリーダー上で読み取った。その結果を図24に示す。

20

【0163】

3. 抗体データ

抗体力値を、4つの実験において全部で6つの構築物について測定した。構築物p73i-GNRは、Gagに対する一貫した抗体応答を生じず、Nefに対して限定された抗体応答を生じた。同じマウスから単離された脾細胞からはT細胞応答が観察され、このことはGagタンパク質がin vivoで発現されていることを示唆していたことから、前記の理由は不明である。

【0164】

30

Gag特異的抗体の生成に関する順位は、

RNG>GRN>NRG>RGN>NGR>GNR

であった。

【0165】

細胞性免疫学的データの分析

この目的は、3つの免疫学的実験からスポットカウントデータに基づいて6つの構築物を順位付けすることであった。3セットの応答を評価した：

7日目(初回免疫の7日後)におけるGag、Nef及びRTに対するCD8応答、

35日目(追加免疫の7日後)におけるGag及びRTに対するCD4応答、

35日目(追加免疫の7日後)におけるGag、Nef及びRTに対するCD8応答。

40

【0166】

各応答(例えば、Gagに対するCD8応答)を、SASバージョン8における線形混合効果モデルを用いてモデリングした。特定の抗原(Gag、Nef又はRT)が存在しても存在しなくても、またIL-2が存在しても存在しなくても、このモデルは構築物の固定効果を含んでいた。さらに、CD8応答については、データが各マウス個体から入手可能である場合、被験体はこのモデルにおける変量効果として含まれた。このモデルは、抗原(存在／非存在)及びIL-2(存在／非存在)の各組合せについて異なる効果をもつ構築物を可能にする相互作用条件を含んでいた。

【0167】

このモデルから、各構築物とp7313(対照群)の間の調整後平均応答における差異を、抗

50

原(存在 / 非存在)及びIL-2(存在 / 非存在)の各組合せについて別々に算出し、その差異が統計学的に有意であるかどうかを示すp値も一緒に求めた。抗原の存在下及びIL-2の非存在下でのその差異及びp値に基づいて、最も大きい差異を有する構築物には6、次に大きい差異を有するものには5というように割り当て、但し差異が5% レベルで統計学的に有意でなかった構築物には0を割り当てるにより、構築物を順位付けした。

【0168】

残余は一定の分散と共に正規分布するというこのモデルの仮説を、図式解法及び感度分析（前者が応答の対数変換、後者が応答の平方根変換をモデリングする）を用いて評価した。構築物の順位はこのモデルの仮説からの逸脱に対して感受性ではなかった。

【0169】

各実験における各応答についての順位を別々に計算し、3セットの応答に関する総合順位を3つ全ての実験に横断的に算出した。以下の表は3つの実験全体に渡る総合順位を示す。

【表3】

3つの免疫学的実験を横断的に組み合わせて示す、3セットの応答の各々に関する構築物の総合順位

構築物	7日目(初回免疫の7日後)		35日目(追加免疫の7日後)	
	CD8	CD4	CD8	CD4
GRN	5		18	3
GNR	17		24	28
RGN	28		23	33
RNG	25		27	37
NRG	25		19	0
NGR	4		14	10

【0170】

RNGは35日目には両方の応答セットについて最も高い順位を有し、7日目にはRGNの次に2番目に高い順位を有する。RGNも35日目に両方の応答セットについて高い順位を割り当てられた。

【図面の簡単な説明】

【0171】

【図1】p7313-ieの制限酵素地図を示す。

【図2】pGagOptPr2中のp55 gag挿入物の配列を示す。

【図3】p17/24trNEF1中のp17/24trNEF挿入物の配列を示す。

【図4-1】p17/24opt/trNef1中のp17/24opt/trNef挿入物の配列を示す。

【図4-2】pco17/24Nefの制限酵素地図を示す。

【図5-1】p7077-RT3のRT挿入物の配列を示す。

【図5-2】p7077-RT3の制限酵素地図を示す。

【図6-1】p73i-RT3中のコード挿入物の配列を示す。

【図6-2】p73i-RT3.cloの制限酵素地図を示す。

【図7】7077trNef20中のNef挿入物の配列を示す。

【図8】7077RT8中のRT挿入物の配列を示す。

【図9-1】p17/24opt/RT/trNef13中のp17/24opt/RT/trNef挿入物の配列を示す。

【図9-2】p17/24opt/RT/trNef13中のp17/24opt/RT/trNef挿入物の配列を示す。

【図9-3】pcoGagRTnefの制限酵素地図を示す。

【図10-1】WRG7077中のp17/p24opt(cor)/RT/trNefコード挿入物の配列を示す。

10

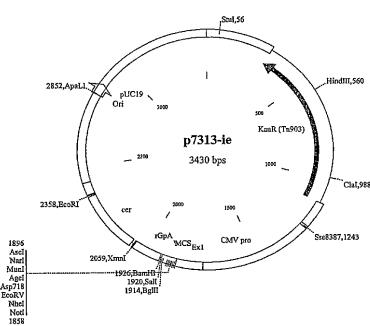
30

40

50

- 【図10-2】WRG7077中のp17/p24opt(cor)/RT/trNefコード挿入物の配列を示す。
- 【図10-3】pGRN#16の制限酵素地図を示す。
- 【図11-1】p73i-GRN2中のp17/p24(opt)/RT(opt)trNef挿入物の配列を示す。
- 【図11-2】p73i-GRN2中のp17/p24(opt)/RT(opt)trNef挿入物の配列を示す。
- 【図11-3】p73i-GRN2中のp17/p24(opt)/RT(opt)trNef挿入物の配列を示す。
- 【図11-4】p73i-GRN2の制限酵素地図を示す。
- 【図12-1】p73i-GN2中のp17/p24opt/trNef挿入物の配列を示す。
- 【図12-2】p73i-GN2の制限酵素地図を示す。
- 【図13-1】RT w229kの配列を示す。
- 【図13-2】p73RT229.cloの制限酵素地図を示す。 10
- 【図14-1】p73i-Tgrnの制限酵素地図及びNheI-ApaI切断断片の配列を示す。
- 【図14-2】NheI-ApaI切断断片の配列を示す。
- 【図14-3】NheI-ApaI切断断片の配列を示す。
- 【図15-1】Tnrgの配列を示す。
- 【図15-2】Tnrgの配列を示す。
- 【図15-3】p73i-Tnrgの制限酵素地図を示す。
- 【図16-1】p7313ie中のTngr挿入物の配列を示す。
- 【図16-2】p7313ie中のTngr挿入物の配列を示す。
- 【図16-3】p73i-Tngrの制限酵素地図を示す。 20
- 【図17-1】挿入物Trgn#6の配列を示す。
- 【図17-2】挿入物Trgn#6の配列を示す。
- 【図17-3】p73i-Trgnの制限酵素地図を示す。
- 【図18-1】Trng#11の挿入物の配列を示す。
- 【図18-2】Trng#11の挿入物の配列を示す。
- 【図18-3】p73i-Trngの制限酵素地図を示す。
- 【図19-1】TgnR(F1)の配列を示す。
- 【図19-2】TgnR(F1)の配列を示す。
- 【図19-3】p73i-Tgnrの制限酵素地図を示す。
- 【図20】追加免疫の5日後にIFN-ELIsotを用いて測定したGagペプチドに対する応答を示す図である。 30
- 【図21】追加免疫の5日後にIFN-ELIsotを用いて測定したNefペプチドに対する応答を示す図である。
- 【図22】追加免疫の5日後にIFN-ELIsotを用いて測定したRtペプチドに対する応答を示す図である。
- 【図23-1】再フォーマットされた構築物を用いて免疫化した後、マウスモデルにおいて検出されるCD8免疫応答の例を示す。これらの構築物は3種融合物としてGag、RT及びNefからなる。GはGag、RはRT、NはNefである。上段のグラフは35日目(追加免疫後7日目)のIFN-ELIsotによるGagペプチドに対する応答を示し、下段のグラフは35日目(追加免疫後7日目)のIFN-ELIsotによるNefペプチドに対する応答を示す。
- 【図23-2】再フォーマットされた構築物を用いて免疫化した後、マウスモデルにおいて検出されるCD8免疫応答の例を示す。これらの構築物は3種融合物としてGag、RT及びNefからなる。GはGag、RはRT、NはNefである。グラフは、35日目(追加免疫後7日目)のIFN-ELIsotによるRTペプチドに対する応答を示す。 40
- 【図24】35日目(追加免疫後7日目)のELISAによるGag抗体を示す図である。

【図1】



【図2】

pGag0ptrpr2中のp55 gag挿入物の配列

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
LETSECCRQI LGQLGQLSQT GESELRSYRN TAVATLVCYQRV RIEKIDTKEA
DLKIEEKNQK SNKKQAQQAA DUGHSNQVSQ NPYQIVNQIQM OHVHQAIQSP
TLNAWVKVVE EKAFSPVEIP MPSALSEGAT PODLNTMLNT VGGHQAAMQM
LKETINEEAD ENDRVRPHVA PQLAPGQMR PGSDISIAGTT STLQEIQGWG
TNPNPPIVGE IYKRWILIGU NKIVRWMPSY SILLDRQGQF PRGDSFDVDR
YKLTRAEQAS QEVKNWMTT LTLVQVANPDD KITLKGALPA ATLEEMMTAC
QGVGGFGHKRA VRLAEVAMSQV TNSATIMMR GNFRNRKIV KCFNCNGKTCB
TARNCRPRKG KGCKWCKGREG HQMWDCTERQ ANFLGKPSW YKGRGPNFLLQ
SRPEPTAPPE ESPRSGCVTT TPPQKQEPID KENYLPLTSLR SLFGNDPSSQH
*

[配列番号51]

【図3】

p17/24trNEF1中のp17/24trNEF挿入物の配列

ATGGGTGCGAGAGCGCTAGTATTAAAGCGGGGAGAATTAGATCGATGGGGAAAAATT
CGGTAAACGGCGGGAAAAGAAAATATAAATTAACATATCATATCGGCACT
AGAACCTGACAGCATTCCCGACTTATACCTGGCGCTGTAAACATCACAGGCGCT
AGACAAATACTGGACAGCTAACACCTCCCTACAGAGTAGGATCGAGAACATTTAGA
TCATTATAATATAACTAGCTAGACRCCCTTATGTGTGTCATAAGAGGATGATAA
GACACCAAGGAACTTACAGAGAGGAAAGCACAAGAAAGTAAGGAA
GCACACCAAGGCGACAGCTAACAGACACCACTCGCTGGCCAAAATACCTCC
ATATGCGAACATCACAGGGCAAATTTGATCATCGGCCATATCCTAGAGATTAA
AATGCGATGGTAAAGTAGTGTAGAGGAGGCTTCAGCCCCAGAGTGATACCCAA
TTTTCGCGATTTATCGAGGAAGCCACCCACAGTTAAACGACATTCACACAA
TGTGGGGGAGCACTCACAGGCACTTAAAGAGGAGCATTCAGGAGGCT
GCAGACATGGGAGTAGGTGATCCTAGCAGGACTACTAGTACCCCTTCAGGAA
AGACAGAACRAGGAACTGAGCTAGCAGGACTACTAGTACCCCTTCAGGAA
GGATGGATGACAATAATTCACCTTACCTGGAGGAAATTATAAGATGGATA
ATCTCGGTTAAATAAATAACTGAGTGTATACCGGCTTACAGGCACTTGCACATA
AGACAGAACCAAAAGAACCTTITAGGAGACTATGTAGGACCCGGTCTTAC
AGGCCCGGCAAGCTTCACAGGGATTAAGGATGACAGAACCTTGTGGTC
CCAAATGGCAGGACCATGGTGTAGAAGCTTAAAGGATTCGGGACGGGCTCA
CTAGAGAAATGAGTACACATCTGAGGACTACTGGAGGAGGCGGCCATAAGGAA
GTTTGTGGGTTTCCACTAACACTTCAGTCAGTCCTTAAAGACCAA
GCTACTGAGTACCTGGACACTTTAAAGGAAAGGGGGCTTGAGGAGGCTAA
CTACCTCCAAAGACAAGATTTCTTGTGAGTCTACACACAAAGGCTAC
TCTCCGGTGTCAAGGACTACTACAGGTGTGACCAAGATAAAGGAGGCCAA
GGATGGTGTCAAGGACTACTACAGGTGTGACCAAGATAAAGGAGGCCAA
AGAGGAAACACCACTGTTACACCTGGCTGAGCTTGATGGGATGGATGAC
AGAGGAACTTGTAGGAGGTTTACAGGCACTACAGTCAGTTC
GAGCTACTCCGGACTACTACAGGACTCTGA
配列番号[52]

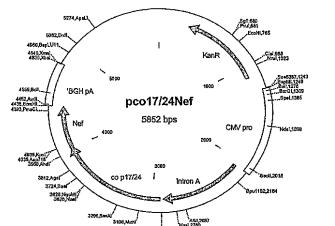
MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKYK LKHIVWASRE LERFAPNPG
LETSECCRQI LGLOGLSPLQT GSEFLSYLNN TVATLYCQH RIEKLH
DLKIEEKBNN SKKKAAQOA DTHGSNWSQSQ NYPIVONIQC VMQHOAISPR
TLNAWVKVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PDLNLTMNT VGGHQAAQM
LKETTINEAEE EWDRHPVPH APLIAFGMRSR PRGSDIAGTT STLQEJQGWM
TNNPPIVPGK IYKRLWLGL NKIVRMLYPT SILDIGRSPY PERPDVYD
YKLILRAEQAS QEVKWNMITEI LLVQNANPDC KTLILKALGPBA ATLEEMMTAC
CGVGGPHKX RLVLGFPVTP QVLPRLPMYK ANVDSLHSFLK EKGGLBEGLH
SRQQDIDLH WLYHTQGYFW DWQNTPTPGC VRYPLTFGWC YKLVPEVPDK
VEEANKGENT SLLHPVSLHG MDDPEREVLE WRFDShLAFH VHARELHPK
FKNC*

【 図 4 - 1 】

p17/24opt/trNef1中のp17/24opt/trNef挿入物の配列

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVVASRE LERFAVNPGL
LETSECCRQI LGQLOPSLQT SEEGLRSRN TVATLYCVRQ RIEBKDTKEA
DLKIEBEQNQ SKKAAQQAA DYGHSNQVSQ NPYIVQNIQG QMVHQAISSPR
TIANWVKVBE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDINTMLNT VGGHQAAQM
LKETFINNEA EWDVRPHVHA GFLAPQGMRCR PRGSDDIAST STLQBQICGW
TNNPPIVPGK IYKRWIIJGL KINVNMYSPT SLLDIRGQKF EPRFDVDRF
YKLTRABQAS QEVKNWMET LLVQNPNDP CTKILAKGPB ATLEEMMTC
QVGVGPBGHKA RVLVMGVPPVT POPVLRPMTY KAAVDSLHPL KEXGGLBEGLII
HSQRQDILD TLWIYHTQGYD PWDQNYTPGP GVRYFLTFGW CYKLVPVEPD
KEVANKHGEN TSLLHPVSLH GMDDPEREVAL EWRFDLSHLAF HHVAREKPC
YFKNC*

【図4-2】



【図5-1】

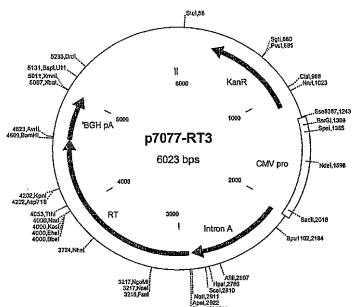
p7077-RT3のRT挿入物の配列：

ATGGGCCCCCATCAGTCCCATTGGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACC CGGATGGAC
GGCCCGGAAAGGTCAAGCGTGCCCACTTACCGGAGAGAATCAGGCCCTTGCTGAG
ATTCGGCAGGAACTGAGAACAGGGGAGATCACCGAACATCGGGCGCTGAGAACCCA
TACAACACCCCGCGTTTGCATCAAGAAGAAGGAGCACCCAAAGTGGCGGAAGCTG
GTTGGATTTGGGGAGCTGAATAAGGAGGCCAGGATTCTTGGGGAGTTCAGCTGGCG
CTTCCCACATCGGGGGCGCTGAGAACAGAAGAAGGAGCTGAGCTTGAGGCTGGC
GACCGCTACTTACGCGGCTCTTGGAGCAAGGACTTAAAGAAGTACACCCGGCTTAC
ATCCCATCTATACAAACAGGACCCCTGGCATCAGATATCAGTAACTACGCTCTCCCG
CAGGGCTGGAGGGCTTCCCGGCCATTCTTCCAGGCTTACGACCAAGATCTGGAG
CGGTGTTGGAGGAGCAGAGGAGCCCGATATCGCTTACCTACCGACAGGACCTGAG
CTGGCTCTGACCTGAAATCCTGGCAACCATCGACCAAGAATCTGGAGGCTGAG
CATCTGCTGATGGTGGGGCTGACCACTCGGAGAACAGAGCATCAGAAGGAGCCCG
FTTCCTGGATGAGTGGCTCAAGCTTCATCCGGAACTGAGCTGGACCTTGACGCTCTG
CTTCCCAGGAAAGGAGCACTGAGCTTACGAGCTTACCGGAGAACATCGAGCTTGGCG
AACTGGGCTGATCCGGAGATCTATCCGGGATCATAGTGGCTGGCCAGCTGAGCTGCG
CGCGCAGAACAGGAGCTTACGGAGGATCTGAAGAGGAGCCCGTGTAGTAAAGCCC
CTGGCTGAGAACCGGAGATCTGAAGAGGAGCCCGTGTGCAAGGAGCTGGAGCT
ATTTCACCGAGGCTATGCCGAATACTCAAGAACAGGCCGGAGCTGGAGCTTACCAA
AACTGGAGCCGATCTGGCCGAACTTACGAGGAGCCCGTGTGCAAGGAGCTGGAG
GCCACACCAACGGATGTCAAGCAGCTGACCGAGGCGGCCAGAGAGATCACCCAGG
TCCATCTGTGATCTGGGGAGAACAGGACCACTGGAGCTGCTATCCAGAGGAGAAC
TGGAGACCATGGTGGGGAGAACATTTGCGAGGCCACCTGGAGTGGCTTACGGAGG
GTGAAATACCTCTCTTGTGGAGACTGTGAGCTTACGAGCTGAGAACAGGAGCTG
CGCCGGAGGAGCATTTACGGTGGAGCCGGCGGCCAGAACCCGGAAACAAAGCTGG
GCCGGGTACGTACCAACCGGGGCCGCAAGAGGTCTGTCACCTTGACGCCAAC
AACCAGAAGAGCGAGCTGGAGCCGGCATTTACTCTGCTCTCCAGGAGCTGGCGCT
TGAGAACATCTGTCAAGCACGAGCAGCTGGAGCTGGCCCTGAGCATTAATCAG
CAGTCCGAGAGGAGCACTGGTGAACAGATTATTCAGGAGCTGATCAAGAAGAGA
GTCTACCTTCGGCTGGGGATCCGGGGAGGATTCGGCGCAACAGCAGGAGCTG
AACGCTGGTGTGAGTGGGGAGTAAAGGCTGTCATA [配列番号56]

MGPISPIETV SVKLKPGMDG KPKVQWPPLTE BKIKALVEIC TEMEKEGKIS
KIGPENNSVYT PFPFAKKKDS TKRWLVDPFRL ELNKRNQDFW EVOLGIPHPA
GLKCKKSSVYT LDVGDAYSVPS PLDDEDPRFKYAT APTTSPNNE TPPCIRYQVN
LPQCGWKGSPA IFQSSMTKIL BPPRKQNPNDI VIYQYMDLY VGSDELICQH
RTKIEKLLW LRLWRGLTPPD KHKKEPPEFFI WMGYHELPHDK WTPQVPIVLP
DKSDWTVNQDQ KLVKGKLNWAS QYIQCIVKVRQ LKCLLRGLTKA LTEVPLTSE
AELEELLAENRE IJKEPVHGTVY YDPSKDLIAB IQKGQGGQWT YQIYQEPPKFN
LTGKTYWQMA GAHTNDVKQL TBAVKQKITE SIVIWKTPK FKLPIKQKTW
ETWWTBYWQMA TWLPEWEVPH TPLPVBLWQY LEKEPVIGAY TFVWDGAAN
ETKLGKAGYV TNGRQKVTLD TIDTTNQKTE LQAIYLAQD SGLEVNIVITD
SQYALGIWQF QDQSESELV NQIEQLIKKE KVYIWLAWPVA HKIGGIGNEQV
MPSLWASIGRK VL*

[配列番号57]

【図5-2】



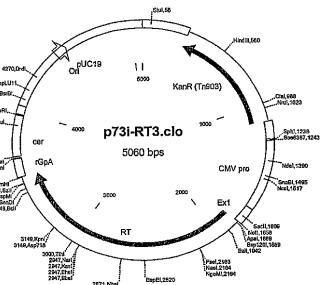
【 図 6 - 1 】

p73i-RT3中のコード挿入物の配列：

MGPISPIETV SVKLKPGMDG PKVKQWPPLT EKIKALVEIC TEMEKGKIS
KIGPENPYNT PVFAIKKKDS TKWRKLWDPR ELNKRTQDFW EVQLGIPHPA
GLKKKKSVTV LDVGDAYFSR DPPDRFKYTT APTLISINNE TPGRQYXWNN
LPFGQWSSPA IFOQSMSTKIL EPFRKQNPDJ VIYQYMDLL VGSDELTIGH
RTKLEWLROH LKQHCKPPEPFL WNGYMLHFDPK WTVQVPIVLPF
KDKSIVTNQD KLVGKLNWAS QIYGPVKRQ LCKLJRLQKKA LTEVILPLTES
AELELAENRE ILKEPVHGWH YDPSDKLIAE IOKQGQGQWT YQIQYQSFKN
LTFLTKYGRQA GAHTNDWQKL TEAVQKTTT SIVWQKTPK FKLJQIKETW
ETWWTBWEQWA TWIPEWFENW TPLWKLWNYQ LKEBPIVGBF TTYVQDANR
ETKLKGAGIV TNRGRQKVVT LTDTTNQKTB LQAIYLALQ SGLEVNIVID
SQYALGIVTQ PKQDSESELV NQIIEQLIKK EKVYLANWPA HKGIGGNEQV
EWLWASATRGEK VI *

[配列番号59]

【図 6 - 2】



【 図 7 】

7077trNef20中のNef挿入物の配列

ATGTTGGTTTCCAGTCACCTCACTGGCTTAAAGACCAATGACTTACAAAGGCAC
GCTTAGATCTAACGCCATTTAAAGACCAAGGGACTGGAGGGCTTAC
TCCCCAAAGAACAGCACAGATTCCTGTGATCTACACACACAAAGGCTACTTC
CTGGTAGTGGCAACACTACCAACAGGCGGAGGGTCACTATTCCTAGCTTGG
TGGTGTGCTAACAGCTGATCAGCTTGGACCAGATAAGGTGAAGAGGCCCCTAAAGGA
GAGAACACCCGGCTGGTACACCCCTGTGACGGCTCATGGGTGATGACCCGGAGAGA
GAAGTCTTGAGATGGAGTGGACGGCAGCTGAGCTTACATCTGAGCTGAG
CTGACTTGGAGGACTTCAAGACGCTGTA [配列番号:60]

MVGFPVTPQV PLRPMTYKAA VDLSHFLKEK GGLEGGLIHSQ RRQDIDLWV
YHTQGYFPDW QNYTPGPGVY YPLTFGWCYVK LVPVEPDKVE EANKGRNTSII
LHPVSLMID DPEREVLWEVR FDGSVLAHHV ARELHPEYFK NC*

(四 8)

7077RT8中のRT挿入物の配列

ATGGGCCCACTTACGCCCTATTGAGACTGTGTCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGAT
GGCCCAAAGATTTAACATGGCCATTGACAGGACAGAAAATAAAGCATTAGAGA
ATTGTCAGACAGATGGAAAGGAGGAAAATTCTAAAATTGGCCCTGAANATTCCA
TACATCATTCCTGCATTGTCATTAAGGAGCTAACATAAGGAAATAAAG
TGATATTCTCAGAGACTTAAGAGACTCTAGAGCTTCTGGGAAGTTCATTAGGA
ATACCACATCCCGCAGGGTTAAAAAAAGAAAAATCAGTAACTGACTTGTGATGGT
GATCCTAATTGTTCTAGTCCTCTGATAGGAGACTTCGGAAATAATCTGCAATTCC
ATACCTGATATAAACAATGGACACCCAGGATTAAGATCATGACTAACATGTCCTTCA
CAGGGATGAAAGGATCACCAACATAATTCCAAGTAGCAGTGCACAAAATCTTAGAG
CTTCTTGGAAAACAAATCCAGGACATAGTGTATCTATCATACATGGATGATTTG
TGATGATCTGACTTAAAGATGGCCACATAGAACAAAATAGGAGCTGAGAACAA
CATCTGTTGAGTGGGGACTTACCAACCCAGGACAAAAAAATCAGTAAAGGAACTTCC
TCTCTTGGATGCTTATGACTTCCTGCTAAATGGCAGACTGACCTTATGTC
CTGGCCAAAAGAACAGCTGACIGTCATGACATAACAGAGCTTAGTGCCCCAAATTG
AATTGGCGCACTGCGATTTACCCGGGATTAAGTGAAGGCAATTATGTGAAACTCTT
AGAACGAAACAAAGGACTAACAGAAGTAACTACCACTAACAGAACAGAGCTGAGA
CTGGCAGAAAACAGAGGAGTTCTAAAGAACCCAGTACATGGACTTATTTGACCCA
TCAAAAGACTTAAATGGCAAAATCAAGGAGCGGGGAGCAGGCCCATTGACATTAAC
ATTATCAAGGCCCATTAAATGTCATACAGAACAAATGCAAGATGAGGGT
GCCCAACTAATGATGTTAAAACATTAACAGGGCAGCTGAAAATAACCCAGAAC
AGCATGTAATATGGGGAAAGACTCTTAAATTAAACTGGCCCATACAGGAAA
TGAAAATACTGGGACAGAGTTATGGCAACGGGACTCTGGGACTTCGAGTGGAGTT
GTAAATGAGGGGACAGAGTTATGGCACTTACAGGAGGACTAAATTAGGAAA
GCAGGATATGTTACTAATAGGAGGACGAAAGTGTCACTGGACACAA
AATCAGAAGAGCTGAGTTACAGCAATTATCTAGGTCAGGAACTTGGGAGTAAAG
TTAACATGACTAACAGACTCAATATTGCAATTGAGACTAACATTCAGCAAC
AGGACTTAATGCACTGAGTGTAACTAATAAATAGGAGCTTAAATTAAAAGGAAAG
GCTTACTTGGCACTGGTGGACAGGACCAACAGGAAATTGGGAGGAATGCAACAG
AAATTAGTCAGTGTGGATCAGGAAAGTACTATTTTGAGTTAA

[配列番号62]

MGPISPIETV SVKLKPGMDG PKVQWMLPTB EKIKALIVEIC TEMKEKGKIS
KIGPEENSYVT PFPFAKKKDS TKWRKLWDFF ELNKRRQDFW EVQLGIPHPA
GLKKKSSVNT LDGVADFSYV PLDEDFFRKYT ATFTLSPNSN TPGIRYQVN
LEQGNGKGSVA IFQSSMTKIL BPFRRQNEPDI VIYQYMDLY VGSDELIGQH
RTKLELWQDII LRLWGTTTLD KQHKEPPFLWPK LCGMHLHPDK WTPQVPIVPE
DKSITVNDIQI KLVGLKLNAS Q1YQPKVQR LCKLJRLQTKA LTEVPIPLTES
AELELBABNR ILKEPVPHGVY YDPSKDLIAB IOKQGGQWQT YQ1YQZBPKPN
LKTGKYGAHR GAHTNDVKQL TEAVQKITT SIVIWKTPK FKLPIKQKETW
ETWITWEYQWA TWI PEWEFWP TPELVBLWLQY LEKIPBIVGAF TWFYVGANR
ETKLKGAGYV TNGRQKCVVT LTDITNNQKTE LQAIYLAQD SGLEVNVITD
SQYALGIQIA PQDQSESELV NQIEQLIKK EKVYLAWVPA HKGIGGNGBQV
DKLVSRAKTR VLPFL*

[配列番号63]

【 図 9 - 1 】

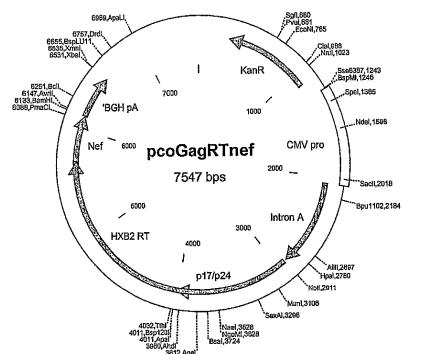
p17/24opt/RT/trNef13中のp17/24opt/RT/trNef挿入物の配列

【図9-2】

MGARASVLSG GEELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVVASRE LERFVNPG
LETSECCRQI LGQLQSLPLQT GSEELRSLRN TVATLYCVHQ RIBIKDTEA
LDKIEWVQNK SKKKAQQAAA DTHHSNQVSQ NPYIPVQNIQG OMVHQAISSPR
TLNAWVKQNE EKAFSPVEIP MPSALSEGAT POLDLNTM VGGHQQAOM
LKETINEEBA ENDVRHVPVHA GBLAPGMORE PRGSSTDAGT STLQEIQJGM
TNNPPIFVGQ IYKRWILGLI NTRVNMISPT SILDIREQPK EPFRDVIFR
YKLTRAEQAS QEVWNKMTTLL LVQONANPDC TFLTKLALGK APTEHRMMTC
QGVGPGPHKA RVLMGPISTI FTVESKLKPG MDGPVKWQVOP LTEEKKIJKLV
E1CETEMKEG KISKIGPNPK YNTVPAFKAIK KDSSTKRNKLV DFRELNRKTQ
DFEWVOLQIP HPAQGLKKKPK VTVLVDGEAD FSVLPEDRED KYTAFITPS
NNETPQGIYRQ YNVLPQGWKG SPAITQSSMT KILEPFRKQN PDIVIYQMD
DLVYGSDEL GQHRTKIBEL RHRNLGJT PTDKPKQKPEP PLWMCYGL
PDWKTVQPVIP LPKEDWSVVAI DIQKLUVKLN WASQIYXPQIK VRQLCKLJLRG
TKALTAEVIP TBAAEELAN RNLKECPHV GVYDDPSKDL IAIEIQLQQCG
WTQYQIYQPK FKNLTKGYKA RMRGAHTNDV KQLTEAVQIK TTBSIWINGV
TPKFKLPLIQK ETWETMWIEY WQAIWIPEWE FVNTPPLVVK WYQLEKEPIV
GAETFWYVDA ANRETKLKGQ GVNTINRGRQK VUTLTLTNTQ KTELQAYIA
LQDSGLEVN VIIDSQYALGI QAPQDQSES ELVNQOIIJQI IKKEKVYIA
VPAHKIGIGGN EQVDFKLVSAG IKRVLFLDMV GFVFTPVQVL RPMTYKAADV
LSHFLRKLKCG ELEGILHSQRN QDILDLWIXH TGQYFPDWON YTGFGBVRYP
LTFGWCVKLU PVBPDKVBEA NKGENTSLHH PVSLHGMDDP EREVLEWRD
SHLAFHVVAR ELJPEYFKNC *

[配列番号65]

【図9-3】



【 図 1 0 - 1 】

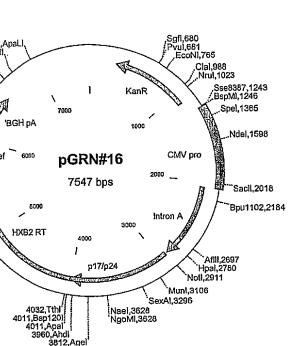
WRG7077中のp17/p24opt (cor) /RT/trNefコード挿入物の配列：

【図10-2】

MGARASVLSG GELDRWKEKIR LRPGKKKKYK LKHIVASRE LERFPAVNFGL
LETSEBCRQI LGQLQSLPLQT SEEGLSRLN TVATLYCQVH RIEKDWTQH
DLKIEEKNQK SNKKKAQQAA DTGHNSNVSQD NPYQVONIQM VWHQAISPR
TLNAWVKVBS ECFEPVSPW MFLMSALEGAT PODLNTMLNT VGGHQAMOM
LTKEINBEEA BWDVRVHPVA GLAPLGQMRE PRGSDLADT STLQBQIGM
TNNNPPIVPG EYKRWIILGL NKIVRMSPT SILDIRQGPQK EPFRDVYDVRF
YKTIRLAEBQS OEVKNMNTIEL VLNQANPDCD KTLKLALGPA ALTEBMED
QVGCPGVHGK RVLMCPGPIST ETVSVKKLPGD MGDKVKGQW LTTEEKIKALV
E1CTEMBKEG KHSIKGPENP YNTVPFAIJK KDSTWKRLV DPREBLNRKTQ
DFWEVQLGIP HPAIGLKKKKS VTFLVGDGJ FSVPLDDEPR KYTAFTIPS
NNETPGRCY QVNLPGQKG SPAIFQSSMT KLEBLPKPNQ FDIVIYQMD
DLVYGSLDIE GQHRTKICBIE RHLRNWLTC TDPKHCKQEPL FPLWMLYQ
PDKWTQVPI LPEKCSWTVL D1QKLUVGKLN WASQIYQVJG VRQLCKLJLRG
TKALTEVIPL TEEBAELAE NREILKEPVH GVYDPSKDL IABIQKQGQG
QWTYVQYQBP NFKLNTKGKA RMRGAHTNDN QLTLTEAVQKI TTESIVWKG
TPFKPLKPKI ETWETWIEYQ WQATWPIEWB FVNTPPLWVQL WYOLEKEPV
GAETFYVUGA ANRETKLKGKA GVTNTGRQK VVTLTDTTNO KTELQAIYL
LQDSGLEVN VTDQSQYALGI QPQDQSES ELVNQNLIEQL IKKEVYKLA
VPAHKGIGGN EQVDSLKVSG IRKVLFLDMV GFPPVTPVPLW RPMITYKAADV
LSHFLWKEKQ LEGLHLHSRA QDILLNLIYH TGQYFPDWON YTPGPGVRYP
TLPHWKEKQV PVEPDVKEEEA XNGENTSLIH PVSLHGMDDP EREVLEWRPF
SHLPHAWRSH ELHPEYFKNC *

[配列番号67]

【図10-3】



【図11-1】

p73i-GRN2中のp17/p24(opt)/RT(opt)trNef挿入物の配列：

ATGGGTGCCCCGAGCTCGGTACTGTCGGTGAGAGCTGGACAGATGGGA
GAAAATTAGGCTGCGCCCGGGAGGCAGAAAGAAATACAAGCTCAAGCAT
ATCGTGTGGGCCCTCGAGGGAGCTGAAACGCTTGGCGTGAACCCAGGCT
GCTGAAACATCTGAGGGATGTGCCAGATCTGGGCAATTGCGACCAT
CCCTCCAGACCCGGAGTGAAGACGCTGAGGTCTTGTATAACACAGTGGCT
ACCCCTACTCGCAGCACAGGAGGATCGAGATAAGGATACCAAGGAGGC
CTTGGACACAAATTAGGAGGAGGACAAAAAAGAGCAAGAAGAAGGGCCAG
CAGGCAGCTGCTGACACTGGGATAGCAACGGATATCAGAACATCTTCA
TATITGCCAACACATCAGGCCAGATGGTICATCAGGCCATCAGCCCC
GGACGCTCAATGCCCTGGGTGAAGGTTGTCGAAGAGAAGGCCCTTCTCT
GAGGTATCCCCATGTTCCCGCTTGAAGTGAGGGGGGCACTCTCAGGAC
CTCAATACAATGCTTAATACCGTGGCGGCCATCAGGCCATGCAAAT
GTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGAGCAGCCAGTGGAACAGTGCA
CCCGTCCACCGTGGCCAATCCGCCCGGACAGATGCCGGAGGCTCGCG
CTCTGACATCTGGCGCACCCACTCTACACTGCCAGAGGCAATCGGATGGA
TGACCAACAATCTCCCCTACCCAGITGGAGAAATCTAAACAGGTGGATC
ATCTGGGCCATGACAAAGATCTGGCGCATGTACTCTGGCACATCTCT
GACATTAGCAGGGACCCAAAGGCTTITAGGATTACGTGACCGGTT
TTATAAGACCTTGCAGAGCAGAGCAGGCCCTCAGGAGGTAAAAACTGGA
TGACGGAGACACTCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATC
TTGAAGGCACTAGGCCGGCTGCCACCCCTGGAAAGAGATGATGACGCCCTG
TCAGGGAGTAGGGCGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGGCC
ATCAGTCCCAGAGACCGTGGCGTGAAGCTGAAACCCGGATGGACCG
CCCCAAGGTCAAGCAGTGGGCCCTACCGAGGAGAAAGATCAAGGCCCTG
GTGGAGATCTGACCCAGAGTGGAGAAAGGGCAAGATCAGCAAGATCG
GGCCCTGAGAACCCATACAACACCCCGTGTGGCATCAAGAAGAAGGAC
AGCCAACTGGCCCAAGCTGGTGAATTCCGGAGCTGAATAAGGGCA
CCAGGATTTCTGGAGGTCAGCTGGCATCCCCATCGCCGGCTCTGA
AGAAGAAGAAGAGCGTACCCGTGCTGACGTGGCGACGCTTACTTCAGG
GTCCCTCTGGACGAGGAGCTTAGAAGTACACGCCCTTACCATCCCCAT

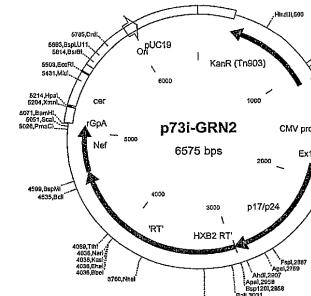
【 図 1 1 - 3 】

ATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAAGTGTAGAGTGGAGGTTGACAG
CCGCCTAGCATTTCATCACCTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCA
AGAACTGCTGA [配列番号68]

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKYK LKHIVWASRE LERFAPNGL
LETSECCRQI LGLOPLSQT SEEGLRSRN TVATLYCQH RIEKULPQD
DLKIEBEEQNN SKKKAAQQA DTHGSNQVSQ NPYIVIQNOIC QMVHQAISSPR
TLNAWVKVV EKAFSPEVIP MFSALSEBEGAT PQDLNTMLNT VGGHQAMQM
LKTENINETTA EMDVRVPHVH PIAFLGCMRQI PRGSDIAGTT STLQEJGQWMM
TNNPPIVGE YTKRJIWLLG NKTRVIMYSPT SILDIGRQ EPPRDVDYQW
YKTURAEQS QEVKNWNMTEI LLVQANPDC KTILKALGPQA ATLEEMMTAC
QVGVBGFHKHA RVLMPGIPS1 ETVSXKLPGQ MDGFBVQWPQ LTBEEKIKALV
ETCITEMKEG KISCKIPGRN YNTPVFAIJK DKSSTWRKLV DRLBENLRKNT
DFWEVQLGP1 HPAGLKKKK5 VTIVLDVGDAY FSVPLODEBDRF KYATAFTIPS1
NNNETPGIRYO YNVLPGKWS PAQFQSSM KLBPEFRKQN PDIVIXQYMD
DLYVGSDSLEI GOHRKTIBEEL ROHLRNLGT PDTDKKKHQB PFWLMGYEL
PDWKTVQPIV LPEKDWSVTN DIQKLGVKLN WASQIYFGIK VRQLCKLJRG
TAKTEIPIV TEEAEALBQI NRKELECPV GYVXPSKDI EAIEJQPKQGG
QWTQYQIOPQE FKNLITLGKYA RMRAHTNDV KOLTEAVQKU TTESIVIWVQ
TPKFKLPLIQK ETWETWMEY QWATWIPEWE FVNTPPLVWK WYQLEKEPIV
GAETFYVDDGA ANKETKLGKJ GYVTINRGRQG VUTLDTDTQN KTELQAYILA
DLSQGSEVLL VTDTSQVALGY IQAQDPOSES ELVNQJLQD IKKEKVYLA
VPAHKIGGGN EYQDVLKUVSAG IRKVLVMVGFP VTFPQVPLRPM TYKAADVLSH
FLKEKKGLEG LIHSQRQDI LDLYWIYHTQG YPFDDWONYTQ GPGVRYPLTF
GWCXLYKLVPVE PDKVEEAKNG ENTSLLHHPVS LHGMDDPERE VLEWRFDSEL
AFHHVAREHL PEYFKNC*

[配列番号69]

【図11-4】



【図11-2】

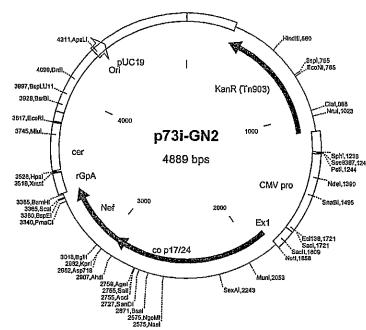
ATCAACACGAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCTCCCCA
GGGCTGAAAGGCTCTCCGCCATTTCAGAGCTCCATGCCAACAGATCC
TGGAGCCCTTICGGAAGCAGAACCCCGATATCGTCACTTACCGATACATG
GACGACCTGTACCTGGGCTCTGACTGGAAATCCGGCAGCATCCACGAA
GATTGAGGAGCTGAGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCTGACCACCTGG
ACAAGAACGATCAGAAGGAGCCCTATCTCTGGTATGGGCTACAGGCTC
CATCCCAGACATGGAGCTGAGCTCTATCGTCTCCCGAGAACGAG
CTGGGAGCTGAAAGCACATCCAGAACGACTGGCAAGCTCACTGGCTA
GCCAGATCTATCCGGGATCAAGGTGGCCAGCTCTGCAAGCTCTGGC
GCCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCCCCTACGGAGGAAGGCCAGCT
CGAGCTGGCTGAGAACCGGGAGATCTGTAAGGGAGCCCTGACGGCGTGT
ACTATGACCCCTCAAGGACCTGATCGCGAAATCCAAGAACGAGGCCAG
GGGCAGTGGACATACCAAGATTACAGGAGCTTCAAGAACCTCAAGAC
CGGCAAGTAGCCCCCATGAGGGGCCAACACCAACGATGTCAAGCAG
CTGACCGAGGGCGTCAGAACGATCACGACCGAGCTCACATCGTGTACTGGG
GAAGACACCCAAAGTCAGCTGCTTACCTCGAACAGGAGACCTGGGAGACGT
GGTGGACCGATAATTGGCAGGCCACCTGGATCTCCGAGTTGGAGCTGTG
AATACACTCTTCCTGGTAAGCTGTGTACCGACTCTGAGAACGGCCAT
CTGGGGCGGAGAACATTCTACCTGGACGGCGCCCAACCGCGAACAA
AAAGCTGGAAAGCGGGTACCTCACCAACCGGGCCCGAACAGGTG
TCACCTCTGACCGACACCACCAACCGAACAGACGGAGCTGCAAGGCCATCTAT
CTCGCTCTCCAGGACTCGGCCCTGGAGGTAAACATCGTGACGGACAGCCA
GTACCGCTGGCATATTACGGCCAGCCGACCAGTCCGAGAGCGAAC
TGGTGAACCAAGATTACGAGCAGCTGATCAAGAACAGAGAACGGTCTACCTC
GCTGCGGTCCCGGCCATAAGGCAATTGGCGCAACGAGCAGGTGACAA
GCTGTGAGTGGCGGAGTAAAGGCAATGCTGATGGTGGGTTTCAGTCA
CACCTCAGGTACCTTAAAGACCAATGACTTACAAGGCCAGCTGAGTCTT
AGCCACTTTAAAAGAAAAGGGGGACTGGAAAGGGCTAATTCTACCTCCA
AAAAGAACAGAAGATATCTGTGATCTGGTACCTACACACACAGGTACT
TCTCTGATGGCAGAACATACACACCAGGGCAGGGTCAAGATATCCGT
ACCTTGGATGGTCTACAAGCTAGTACCGAGTGTGAGCCAGATAAGGTAGA
AGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACAGCTGTTACACCTGTGAGCCCTGC

【 図 1 2 - 1 】

p73i-GN2中のp17/p24opt/trNef挿入物の配列：

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRGPGKKYK LKHIVWASRE LERFAPNPG
LETSECCRQI LGLOGLPSLQT GESELRSRN TVALTYLCVHQ RIEKUDTQH
DLKIEEKNQ SNKKQACQA DTHGSNNSVQSQ NPYIVIQNQG QMVHQAISSPR
TLNAWVKVVE EKAFPSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNTMLNT VGGHQAAQM
LKEETINNEE EDWRVPHVPA FPLAQPGMRQ PRGSDIAGTT STLQEYQGM
TNNPPIPVGE IYKRWILLLG NKIVRHMPSY SILLDRGPK EPFRDVRDQY
YKLTRAEQAS QEVQNMMTET RQVNNQANPDC KTIKLKGPA ATLEEMMTAC
QGVGGPHKA RTRLMVGPPVT PQVFLRPMYKTA KAAVLDSHLF KEGKGLEGLI
HSQRQDLDI LWIHYTQGYCP PDWQNYTPGE GURVPLFQHG CYKLXVFPED
KVEEABANG TSLLPFBPSLH GMDDPEREVL EWRFDS_LLA F HHVARELHPE
YFKNC₅ [前例系第31]

【図 1-2】

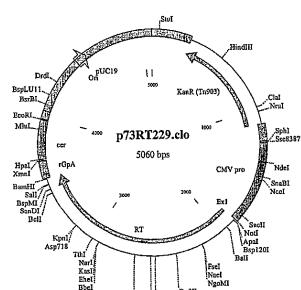


【図13-1】

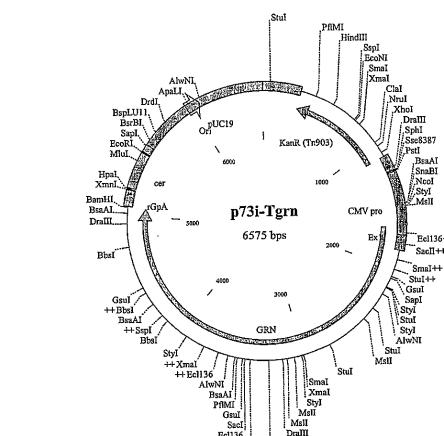
RT w229kの配列：

ATGGGCCCCCATGCTTCCATCGAGACGGCTGGGGTGAAGCTGAAACCCGGATGGACGGCCC
CRAAGGTCAAGCAGTGGGCACTCACCGAGAGAACGATCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCACG
AGATGGAGAAAGAGGGCAAGATCAGCAAGATCGGGCTTGAGAACCCATACAACCCCCGTG
TTTGGCCATCAAGAAGAGGGCAGCAAAGTGGCCCAAGCTGGGATTTCGGAGACTGAA
TAAGCGGCCAGGATTTCTGGGAGCTGGCAGCTGGGATCAGGCCATCCGGCAGGCCCTGAAGA
AGAAGAAGAGGGCTGACCCTGGAGCTGGGAGCAGCTTACATCAACAGAACCCCTGGAG
GACTTTAGAAAATCACCGCTTACATCCATCTATCACAAACAGAACCCCTGGAGCATCAG
ATATCAGTCAACGCTCTCCCGGAGGCTGGAGGGCTCTGGCCATTTTCAAGAGCTCCA
TGACCAAGACTCTGGAGCCGTTTCTGGAGACGAAACCCGATATCGTCATCTACAGTACATG
GAGCACCTGTACCTGGGCTCTGACCTGGAAATCGGGCAGCATCGCAGCAAGATTTGGAGGCT
GAGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCTGACCACTCGGAGAACAGGATCATGAGGGAGCC
CATTCCTGAGATGGGCTACAGACTCCATCCGGCAAGTGGAGCGTGGCCATCTGCTTC
CCCGAGAAGGAGCAGCTGGACCGTGAAGCAGATCCAGAAGCTGGGCAAGCTCAACTGGG
TAGCCGAGATCTACCTGGGATCAAGGTGGCCAGCTCTGCAAGCTGCTGGGCGCAACAGG
CCCTGAGCAGGAGTGAATCCCTCAAGGGAGGAGCAGCTGGAGCTGGTGAAGAACCGGAG
ATCTTGAGAGGAGCCCTGCAAGGGCTTCTACATGAGCCCTCAAGGAGCTGATGGCCAAAT
CCAGAAGCAGGGGCCAGGGCAGTGGACATACCGAGATTACCGAGGCCCTTCAAGAACCTCA
AGACCGGGCAAGTACGCCGAGTGGGGCGCCACACCAAGGATGTCAGCAGCTGGCGAG
GCCGTCAGAAGATCACGACCGAGTCATCGTGATCTGGGGGAAGAACCCAGTTCAAGCT
GCCTATTCAGAAGGAGGAGCCTGGAGAGCTGTTGAGACCAATATTGGCAGGCCACTGAGATTC
CCGAGTGGGAGTTCTGTAATACACCTCTCTGGTGAAGCTGTTGAGCAGCTGGAG
CCCATGTTGGGCCGGAGACATACTACGGAGCAGGGAGCAGACCCGGAAACACAGGATCTGG
GAGGGCGGGTAGCTACCAACCCGGGGCGCCAGAACGGTCTGACCGACACCA
ACCAGAAGACGGAGCTGAGGCCATCTATCTCGCTTCCAGAGCTCCGGGCTTGAGCTGAC
ATCTGAGCGACAGCCAGTCAGCCTGGCATTATTCAGGCCAGCCGGAGCAGCTGGAG
CGAAGCTGGTGAACAGATTATCTGAGCAGCTGATCAAGAAGAGAACGGTCTACCTCGCTGG
TCCCGGCCATAAGGGCATGGCGCAAGCAGCAGCTGGAGCTGGTGAAGGGGGATT
ACAAAGGTCTGTA [配列番号72]

【図 1.3 - 2】



【図14-1】



配列

ATGGGTGCCCCGGACTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATT
AGCGTCGCCCCGGGGAGGGAAATAACAGCTGCAGCATATCTGTGCGGCCCT
AGGGAGCTTGACGGTTTGGCGTGAACCCAGGGCTCGGGAACATCTGAGGATGT
CGGCCAGATCTGGGGCAATTGCGGCCATCCTCCAGCACGGGAGGTGAAGACGTGAGG
TCTCTTCTATAAACATGCTGCTTCTCTTCTACTGGTACAACAGGAGGATCAGGAATTAG
GATACCAAGGAGGGCTTCCGACAAATTGAGGAGGCAAAACACAGGAAAGAAGGAA
GCCCAGCAGGCCACTGCTGACACTGGCATAGCAACCGGATTAACCAAGACATTCT
ATTTGCTCAAACATTGAGGGCCAGTGGTCATCGGCCATCAGGGCCATCAGGGCTC
ATACTGGCTGGTGAAGGGTTCTGGAAAGGGCTTCTCTCTGAGGGTATCCCTCATG
TCTCTCCGCTTCTGATGGGGGGCACTCTGCAAGGACTTAACATCTTAAACT
GTGGGGCCGCTTACAGGGCCGATGAGGAACTATGTTAGGAGGACTTAACAGGAGGCA
GGGGAGTGGGACAGAGTGCATCCGGTCCACGGCCATGAGGAACTTAACAGGAGGCA
CGGGAGGCTCTGGGACACCTGATCGCGGACACCCATTACTGAGGAGGAACTA
GGAGTGTGTCAGAACATCTTCCATCTGGAGGAACTATGAGGAGGAACTA
GGAGTGTGTCAGAACATCTTCCATCTGGAGGAACTATGAGGAGGATCTGGATC

【図 14-2】

【図 1-4-3】

MGARASVLSG GELDRWKEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWSARE LERFAVNPGL
LETSECCRQI LGQLQLSPLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIEIKDTEA
LDKIEEENQN KSSKAQQAQAN DIGHNSQNUOQ NPYVONIQG OMVHQASPR
TLNAWKWVUE EKAFSPVEIP MPSLMSSEGAT PODLNTMLNT VGGHQAMQM
LKETINEEEA EWDRVHPVHIA GPIAFGQMRE PRGSIDIAGTT STLQEIQGM
NNTPPIPVGE IYTKRILNLX NKIYVMSPST SILDNRQPKP EPFRDVDFR
YTKLTERAEQS QVKCWNMTET LLVQANPDC TKLTKALKGW ALEEMTMC
OGVGGPFHKA RVLMGPISPI ETVSVKLKG MDGPVKVQWP LTEEKIKALV
EICTEMEKEG KISKIGPENY UPTVPAFKI KDSKTWRKLV DFLRENLKRTQ
DFNEVOLQIP HAPAGLKKKSX VTVDLGVDAY FSFLVDEPD RTYAKFTIPS
NNETPPIGYRQ YNVLPGKGK SPAIFQSSMT KILEPFRKQN PDIVIYQYMD
DLVYGSDELJ GQHRTKICBIE RLHNRGLIT TDPKDHCOKEP PFLWMQYD
PDKWTQVPIY LPKEKOSWTN D1QKLVKGK WASCYQVCK VRQLCKLRLG
TKALTBVPL TEEABEELAB NREILKPEVH GVYYDPSKDL IAEIQKQQG
QWTYIYQZEPF FKNLTKGKX RMRAHTGNDN QLITEAVQKI TTSIEVINGK
PTEFKPLKQPK ETWETTWYIEQ WTAWTIEPEW FVNPFLPKWL WYCLEKEPV
GAETFYVDOA ANRETKLGKA GYVNTNRGROK VVLTLDTTNQ KTELQAIYLA
LDQSGLEVNJ VFTDSQYALGI QAGQPDQSES ELVNGQIIEQ IJKKEVYLIW
PAWHAKGNCQ EGQUDLKVASG IRKVLWMMGFV TWPVCPVRPM LYKAADVSL
FLKEKGKGLBG LIHSQRORDI LDDWIYHTQG YFPDWQNYTP GPGVRYPLTF
GWCYKLVPVE PKDVEEANKG ENTSLLHPVS LHGMGDPERE VLEWRPDSL
AHFVHARALE PEYFKNC*

[配列番号74]

【 図 1 5 - 1 】

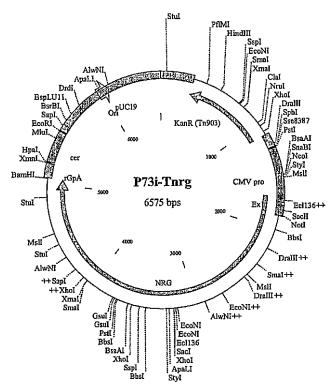
Tnrgの配列：

【図15-2】

AAGGATACCAAGGAGGCCCTGGACAAAATTGGAGGGAGGCAAACAAAGAGCAGAACAG
AAGGAGGAGGCCCTGGAGGACCTTCGTGACATTGGCCCATACGCCAACAGGTATCACAGAACATCT
CCATTTGTCACAAACATTCAGGGCCGATGTGTCATCAGGCCCATACGCCCGGAGC
CTCAATGCCTGGGTGAAGGTTGTGAGAGGAAGGCCCTTCTTCCTGAGGTATACCCC
ATGTTTGCTGGGCTTGTACTGTAGGGGCCCTACTTCAGGACCTTAACATAATGCTTATAC
ACCTGGCGGCCCATACGCCGCCCATTCAGAATTTGTGAAGGAGACTATACGCCAGGGAG
GCACCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCATCGCCGCCAGACAG
ATTCGGGACGCCCTGGCCTTCGTGACATTGGCCGCCACACCTTCATCTAGCAGGCCAA
ATCCGATGGATACCAACATTCCTCCATTCCGGACTTGTGAGGAATCTTAAACGCCGTG
ATCATCTGGCCCTGAACAGATCTGCGCATGTACTCTCGACATCCATCTGTAC
ATTAGCACAGGCCGCCAACAGGCCCTTGTAGGATTACCTGCGGCCCTTATAGAC
CTGGCGAGCACAGGCCCTGGCCTTCAGGAGCTCAAACATGGTACGCCGAGACTCTGG
GTACAGAACGCCCTGGCCTTCAGGAGCTCAAACATGGTACGCCGAGACTCTGG
ACCTGGAGAACGCCCTGGCCTTCAGGAGCTCAAACATGGTACGCCGAGACTCTGG
AGACTGTGTGA (壓倒番例号75)

MVGFPVTPQV PLRPMTYKAA VDLSHFLKEK GGLRGLLHQS RRQDILDWLW
YHTQGCPVQNS QNTCPGCPVGR YPLTFPGCWCY LVPVEPDKVE EANKGENTSL
LHPVSLHGMGD DPEREVLWEEV LPLRQAFPHV ARELHPYFNCMGPISPE
TVSVKLKPGM DGPVKVQWP1 TESEKIKALVE ICTERMEKEKG ISKIGFENPV
NTPVFAI1KKK DSTWKRLVLD FERLNKRTDQ FWEVOLQIPH PAGLKKGVS
TFLVGDQDAF YSFLWEDRFS YTAFTIPSIN NTETGPIRY NVLPQGWGS
PAIFQSSMTK ILBEPFRKQNP DIVTYQMMDD LVVGSDELIG QHRTKIEELR
QHLLRGLLT PDTQKHCQKFP PLWPGYELBLW DKWTQFPIV PERKSDWSVND
QIKLVLKLNHL ASQYIPTGKVY ROLCKLRLRGJ KALTIVPEPT EEAEELEAJE
REILKEPVHG VVYDPSDKLJ ABLQOCQGQD WTYQIYDFF KNLTKGQKVAR
MRGAHTNDVK QLTAEVAKOT TESIVIWGKT PKPKFLPIQE TWETWWTBYW
QATWPEWEF VNTPLFLVLRW YQLEKEFIVG AETFVDPGWA NRETLKGKA
YTNTRNRQKVY VLTIDTTMQL TSLAQYIAL QDSCELEVNIV TDQSAYLGI
AQAOQDSESB LNLQYIQLBI KKEKVLIAWU PHAKHGIGNE QVDKLVLSGI
RKVLMGARAS VLSGGELDRW EKIRLRRPGK KKYKLGHIV ASRELERFAV
NPGLLBTSECT CRIOILQCGQW SQAQDSEBLR SLYNTVHNQ CVHQRIEBC
TALSKDIEB EONQSKKQKAQ SLAQDGESEL RQDQHNSN QVSNQYIPIV NIQGQMVHQA
ISPRTLNANW KVUBEBKAESP VPWUIMFSALES EGATPDQNLNT MLNTVGGHQA
AMQMLKNTM BEAABEDRVY PVHAGLAQG QMRPEGRSDI AGTSTLQBO
IGWMTNNPPI PGVEYIJKWWI ILGNGLKLVRM USPSTSILRDQ QGPKEFDRDY
VDRYFQKTLRA EQASQEVKGNW MTEFLVQUNA NPDCKTLKA LGPAATLEEM
MTR COCCUGGKQV CTCV PHEVWVQV PTC

【図 15 - 3】



【図 16-1】

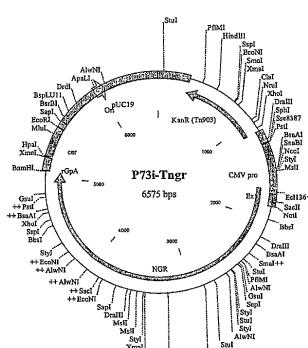
【図16-2】

ACCAACAGTGTCAGCAGCTGACCGAGGCCGTCAGAAGATCAGGCCGAGTCCTATCGTGAATCTGGGGAAAGGACCCAGGATTCTAACGGCTCTTATCGAGAACGGACCTGGGAGACCTGGGCG
CGGAATATTCGGCAGGCCAACCTGGATTCTGGCAGTGTCGAGATACATCTCTCTGGT
AAGCTGTGGTACCGCTCGAGAGGGCCCATCTGGGCCGCCGGAGAACATTCTACGTGGACGG
CGCCGCACCCGGAAACAACCTGGAGGGCCGGGTACTACCCAACCGGGGCCCGAC
AGGTCCTCACCTCCGGCAACCCACCAACCAAAGGCGAACCTGGCAGGACTCTACGGCC
CTTCAAGGACTCGGCCCTGGAGGTGAACTATCGTGACCGGAGACCCAGTAGCGGCCCTGGGATTAT
TCAGCGGCCAGCGGCCAGCTGGAGGCAACTGGTGAACCAAGATTATCGAGCTCTGTGATCA
AGAAAAGAGAAGGTCTACCTGGCTCTGGTCTCCGGCCATAAGGGCATTCGGGCCRAAGGAGCAG
TGCGAACATCTGGTGTAGCTGGGGATTAAAGGTCTGTAA
配列号[77]

MVGFPVTPQV PLRPMYTKAA VDLSHFLKEK GGLEGLJHSQ RRQDILDLWI
XHTGQYFPDW NNQTFPGPVR UPLTFGWCXV LPVPWEPKV EANKENTSL
LHPVSLHGDN DPERLEWVLE FDSRLAJFHVT ARELPYEFK NCMGARASVW
SGGLDRWEEK IRLRPGGKKK YKLKHIVWAS RELERFAVN GLLETSESGCR
QILQLQQLPSL QTGSCEELRSL INTVTATLYCWS HQRIEIKDTK BALDKIEEEQ
NNSKKAQKQAA ADATHGSNQCN SONYQFIVONC QOVMQHQAIS FRTLNNAWKV
VEEKAFPEPV LMNPMSALEK ATQDNLNTML NTVGHQOAAM OMLKETIHL
AEEADWRHVF HAGPIAPGQM RERPGSIDIAG TTSITLQZQIG WMTNNPPVIPV
GEIYKRWIL GLNKVIRVMPS PTSILIDLRQG PKEFFRDYTF RPYKTLRAEQ
ASQEWBNKWTM ETILVQUNAN CDTKILKLAG PAATIEEMMT ACQGVPQGPB
KARVLMPGMS PIETFVSKVLK PGMDGPKVKG WPLTEKEKIA LVECTCMEPM
EGKISKIGPE NYNTPVPAI KKKDSTKWRK LVDFERLNR TDQFWBVEOLG
1PHPAGLLKK K5TIVLJDVG SFTASVFLDPE FRKTYATIIP SINNETPGT
MNGVLLPQGW KGSPFAIPQS MTKILEBLPFRD QNPDIVYIPT MDDLYVGSDL
EIGQHRTKIE ELRQLHHLRW LTTPDJKHHQD EPPFVWNGYE LHPDKWNTVQP
L1VPLKDSDW VNDIQLKVLQW HNLAWSQYIPK VIKRQLKCLL RGTKALBTWV
PLTBEAEEL AENREILKEP VHGVQYDFSK DLIAETIQKG QGOWTYQYQO
BPFKMLNLTGK YARMRGAHTE DRQVLQTEAVW KITTEESIVW GKTPKPLP
OKTWEWTWTW EYQWATIPE WEFVNTPELV KLWQYLCBKEP TVAFTEFYD
GAANRETKLG KAGVYINRGR QKVVLTDTT NQKTELQAIY LALQDSCLEV
NIVTDQSYL GIQIAQPDQS ESEELVNQIYE QLIKKEKUVL AWVPAHKGIG
GNEQVUDKLWS AGTRKVL*

[配列番号78]

【図16-3】



【図17-1】

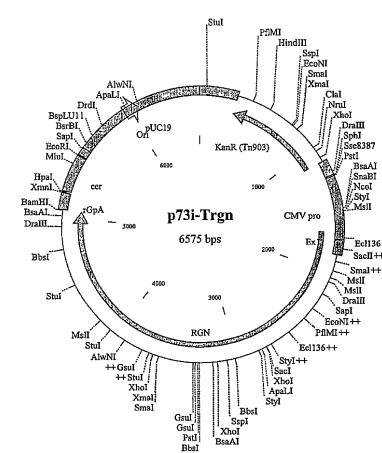
挿入物Trgn#6の配列

【図 17-2】

CAAATGTTGAAGGGACTTAAACGAGGGCAGGGACGTGGACAGAGTCATCCC
GTCCACGCTGGGAACTTCAGCGCCGACAGATGCGGGAGCTCCGGCTCTGACATT
GGCGCAGAACCTTCTACAGTCGAAAGCAAACTGAGTGGATGACCAAACTTCTCC
ATCCCCAGTTGGAAAATCTATAAGGGTGGATCATCTGGGCTTGACAAAGCTGG
CGCATGTACTCTGCACATTCATCTGGTACATTAGCAGGCCAACAGGCCCTT
AGGGATTAACCTGGCAGGGTTTATAAGCCCTGCGAGCACAGCAGGCCCTCTCAGGAG
GTCAAAACTGGATCACGGAGACACTCTGGATGACGCCCTAACGGCCGCT
ACAATCTTGACGGCAGTGGGGCGCTTACGCCACCTTGGAGGATATGACCGCTGT
CAGGGAGTAGGGCCGACCCGGACAAAGGAGAGTGTGGATGGGGTTTCAGTC
ACACCTTCAGGGCTTAAAGGACCTAAGCTTGGGGAGGACCTGATAGCTTACGCC
TTTTTAAAGAAAAGGGGGGGACTGGAGGGCTTAATCTACCTTCAAAGAGACAGAT
ATCCCTGGATCTGGATCTACACACAGGCTACTTCCCTGATGGCGAACACTAC
ACACCAAGGGCCAGGGGCTGAGATCTTCACTGGATCTGGTGACAAAGCTAGTA
CCAGTTGGACGGCAATAAGGGAGGCTTAAAGGAGGAGACACAGCTGGTGA
CACCCCTGTGGCGCTGATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTAGCTGGAGG
TTTGGACGGCCGCTGAGCTTATTCAGCTGGCCGGAGAGCTGCACTGGAGTACTTC
AAGAAGCTGGTGAATTTTATTCAGCTGGCCGGAGAGCTGCACTGGAGTACTTC

MGPISPIETV SVKLKPGMDG PKVKQWPBLTE EKIKALVCEKIS
KIGPENPYNT PVFAKKKDS TJKWKLWDFR ELNKRQTDFWV EVQJGKPHPA
GLKKKKSVTV LDGWDAYFVS PLDDEBFRKYAT AFTPSINNE PTGIRYQYNV
LBQWGKGKSPGA IFOQQSMTKII EPFRKRNQDPI VYQYQMDMLY VGSDLEIGH
RTK1BEELRHQ RLWRGLLPTD KKHQKREPPFL WMGYELHDPK WTVQWPVILPE
KDSWIVNDIQ LKVLGKLNWAS QIYPGIKVRQ LCKLRLCTKA LTEBVLPILTEE
LAELLEAENRNE ILKEEPFHVGVY YDPSKDLADL IQKQGQGQSY YQIYQZPFKN
LKTGKXARMR GAHTNDVKYD TWAPQKTTT SITWVGKTPK FPLK1QKETW
ETNWWEVYQOA TWIPEWEEFVN PTLVPLWNLQY KEPEIPIVGAE TFVYDGAAANR
ETKLKGKAGVYI TWGRQKXVT LTDTNNQKTE LOAIYIALOD SCLEVNWIVD
SQCALGIIQA PGDQSESESLVW NQIISLQLIY BKKVYLAWPVA HKIGGNGEQV
DKLWSASIGRK VLMGRASAVL SGSELDERWKL RPLRGCGKK YKLHIIHWAS
RELERPVAPNV GILLETSECGC QILCOLGOLSPS OTGSESELRLS VNTVATLYCV
HQRIBKDTK EALDKIEEEQ NKSKKKAQQA AADTGHNSQV SQNVPIVONI
MVGHHMHQAIS PRTLNAWKVK VEKAFAFSPEV IIPMSALSEZ ATPODNLTM
NTVGGHQAM QLMLKETINEE AEADWRHVPV HAGPIALPGM PRGRPDIAQ
TTSTLQBQIG WMNTNNPIPV GRJYKLRWIII KLNKUVRMYS PTS7LDIROG
PKPEPFRDYD RFYKILRAEQ ASQEVKWNNT ETLIVWQANP DCKTLLKALG
PAATLEEMNT QACVGGVGGH KARLVMGVFP VTPQVPLRPM TYKAADVLSH
FLKEKGGLBEG LIHSQRQRDII DLWIIYHTQG YFPDWQNYTP GPGVRYPLTF
CYWKYLVPV PEKDVWEANKG ENTSLSHFVS LHGMDDPBRE VLEWRFDSSL
APFHWARELI PEYFKNCY [配列番号80]

【図17-3】

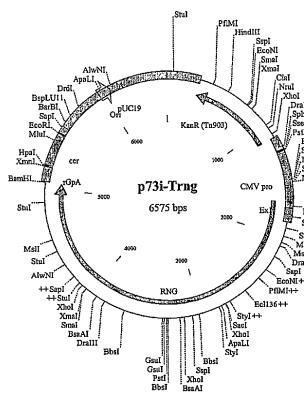


【 図 1 8 - 1 】

【 18 - 2 】

MGPISPIST SVKLFAKPGMD KPKWQWPPLT EKIKALVIEC TEMBKEKGKS
KIGEPNYPNT VPKAIKKDOS TKWRKLWPLR ELBNKRTDFW EVGLQIPEH
GLKKKKSVTV LDDVGDAYFSV PLDEDFRKRKT AFTIIPSINNE TFGRLQYRQYNN
LPQGQSSPQA LFQGSSTMKL PFRVKQNPDTD VIYQMQMDLY VGSDELSL
TRKIEELRHQ RLNRGLTTDPD KXKHQKEPPFV WNGYELHPDK TWVQIPVLVPE
KDSWTVDNIQ KLVGKLNWS QIYFEGIKVRQ LCKLRLRTKA LTVEPIVLTBE
AELLELBARNR ILKEPVHGVS YDPSKDLILS IOKQKQGQWT QIYIQBFBN
LTLLGTYAKMR HAGNDVNUK TVEQKITTTE SIVIWKTPK FBLPIQETW
BTWWTWEYWAQO TWIPEWEFVN PTLFWKLWNY LEKEPIVGBE FYTFVDAGNR
ETKLKGAYIVN TNRGRQKVVT LTDITNQKTE LQIAIYLALQD SGLSVNUTV
SQYALGIQIA QDPOSESELV NQIIEQLLKK EKVYLAWPAV HKGIGNEQVA
DKLVSAISGIRK LKLVWFGFPV TPLWVQPMGY AAVDLSHFLK EGKGLLEHIE
SORQDQDILW VLIYHTQGPP DWONTYPGMY VRVPLTGFWC YLKVLPEDV
VEEANKGENT SLLHPVSLNG MDDPEREVLE WRFDERLAFH HVARELHPY
FKNCMKGARAS VLSGCGEDRW KERIPLRGPK GKYKUHLHVW ASRELERFAV
NPGCLLETSEC RQCLCQLCP SLOQTGESELR SLYNTVATV CHQRQIEIKD
TKEALDLKEE BQNKSISKKKAQ QAAADTGHSN QVSQSYNIPVQ NIQQMVGWHQA
ISPRTLNAWWV KVEKEKAFPSV EPVPMFSLMS EGATPDQLNT MLNTVGGHQ
AMQMLKETT EEEAAEWDRHW VHAEQFIAPIG QMRPREGPSDI AGTTSTLBB
IGNWNTNNPPI FVGEIYKRWI LGLNKLKINVRM YSPSTSILDIR QGPKEPFPRDY
DWFYKTRLZB EZQASQWMMN MTTFWLWVQNA NPDCKTLKA LGPAATLLEEM
MITACQGVGGP GHKARVL [配列番号82]

【図 18 - 3】



【 図 1 9 - 1 】

TgnR (F1) の配列：

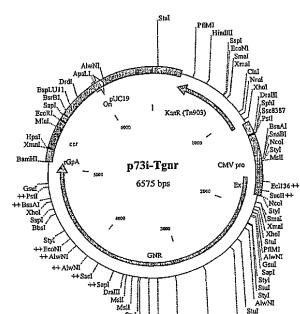
ATGGGTCGCCAGGCTTCGGTACTCTGTGGAGACCTGGACAGATGGGAAATT
AGCGTCGCCGGGGAGGAAATAACAGCTCACGGATATTCGTGGCCCT
AGGAGCTTCGACGGTTTCCCGTGAACCAAGGGCTGCTGAAACATCTGAGGGATGT
CGGAGATCTGGGGATTCATCCAGCTTCCTCAGACCCAGGAGCTGAGACGCTTGAAG
CTGGTATATAACAGCTGGCATCTCCCTACTCTGGTACACCCAGGAGCTGAGCTTGAAG
GATACCAAGAGGCCCTTGGACAAAATGGAGGAGGACAAAACAAGACAAAGAAG
GCCCAAGCAGGACTCTGCACACTGGCATACCAAGGATATCTCCAGAACATACTCC
ATTGTCACAAACATCTGGGGAGGCTTGTGGTATCAGGCCATCAGCCCCGGAGGCTC
ATAGTCCTGGTGGAGGTTGTCGAAGAGAACGGCTTCTCTCTGAGGTTATCCCATG
CTGGCCCTGGTGGAGGTTGACTGGGGCCACCTCCAGGACCTCAATACGATTCATAC
CTGGGGCCCATCTGGCCGGCATTCACAAATGTTGGAGGAGGATCATACAGGAGGCA
GCCAGTGAGGACAGAGTCATCCCGTCCAGCTGGCCAACTCCGGCCGGAGCAGATG
CGGGAGCTTCGGGCTCTGACATTGGCGGACAACTCTGACACTGAGAACATTC
GGATGGATACCAAACTCTCCCATCTGGAGGAAATCTATAAAAGCTGGATTC
ATCTCTGGGCCTGAAACAGATCTGGCATGTACTCTCCGACATCTCCATCTGGACATT
AGACAGGACCCAAAGAGCTTGGGGATCTGTCGGCCGGTTTATTAAGAACCTG
CGACAGACAGCGGCTTCAGAGGGTCAAAACATGATGAGCAGAACACTCTGGTA
CAAGAACTGCTAACCCGGCTGAGGACTCAAACATCTTGAAGGAGGCT
CTGGAGAGATGAGTGGACCTCTGTCAGGAGTGGCCGGAACCTGGGAGGCG
GTGTTGATGTTGGGTTTCTCAGTCACCTCTCAGGTAACCTTAAAGCAATGACTTC
AAGGGACCTGCTGAGTCTGGACCTTTTAAAGAAAAGGGGGAGCTGAGGGCTA
ATCTCTCCAAAGAACAGAAGATCTCTGGCATACCTGGTACCTGGATACCAACACAGG
TACTCTCCCTGATTTGGCGAGACTACACCACTGGCCAGGGTCAAGATATCTGAC
TTTGAGTGGTCTACAGGACTCTAGCTGGAGGCACTGAAGTAAAGGAGGCGGAT
AAAGAGGAAACACCAGCTTGGTACCTACCTGGTCAAGGCTTGTGGATGATGAGTGG
GAGAGAGAGTGTAGTGGAGTGGGGTTTGACAGCCGCTACATTTCATCAGCTGGCC
CGAGACCTTCAGGGCTGGAGTACTCTGGACAGTCTGGGCCCATCAGTCCTGGCC
ACCTTCCTGGTAAAGCTAACAGCCGGTATGACGGCCCACTGGTACACTGGCC
CTCAGGGAGGAGAAGATCAAGGCCCCTGGTGGAGATCTGACCCAGAGATGGAGAAAG
GGCAAGATCAGCAAGATCTGGGGCTGGAGAACATACACACCCCTGGTGTGGCCATC
AAGAGAGGACACCAACCAGTGGCCGAACCTGGTGGATTTGGGGAGCTGAATAG
CGGACCCAGGAAATTCTGGGGAGCTTCAGCTGGGCACTGGCCATCTGGCCGGCTGG
AAGAGAGAGGAGCTGGACCTGGTGGAGCTGGAGCAGCTGGGGTACTCTGGCC
CAGGAGGACTTTAGAAAGTACACCCGGCTTACCTGGAGATCTGACCCAGGAGAC
CTCTGGCATATGAGTACAGTCAACCTCTCCCTGGGGAGCTGGAGGCTTCCTGGCC
ATTTTCTGGAGGCTTACAGGACATGGGACACTGGACACCTGTGAGTGGCTCTGG
ATCTGGTATCTTACAGGACATGGGACACTGGACACCTGTGAGTGGCTCTGGAAATCTGG
CAGCATGGCAGAAGATCTGGGGAGCTGGAGCTGGGCACTGGGCACTGGGG
ACTCTGGGACAAAGGAGCATCACAGGAGGCCCTACCTGGTACCTGGTGGAGGCT
CATCTGGGACAAAGTGGAGCCCTGGTGGAGCTGGCCATCTGGCTCTCCGGAG
CTGGAGGAGCTGGAGCTGGGGAGCTGGAGGAGGACAGCTGGAC
CTGGAGGAGCTGGAGCTGGGGAGCTGGAGGAGCTGGAGGAGCTGGAGG
ATCTGGTACAGGCTGGAGCTGGAGCTGGGGAGCTGGAGGAGCTGGAGG
ATCTGGTACAGGCTGGAGCTGGGGAGCTGGAGGAGCTGGAGGAGCTGGAGG

【 図 1 9 - 2 】

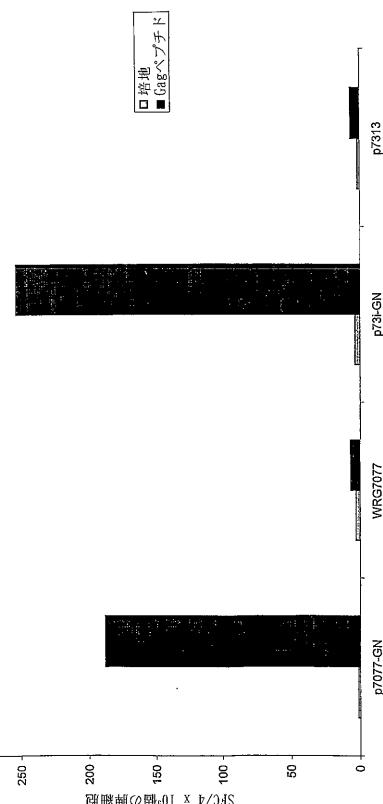
GTGATTCCTCCATCGGAGGAAGGCCGAGCTCGAGCTGGCTGAGAACCGGAGATCTCG
AAAGGAGCCCTGACAGCGGCTTAATCTGACCCCTTCAAGGACCTGATCCTGGGAAATC
CAGAGGACGGCCAGGGCCAGTCGATCATACAGGATTACAGGACCGAGCTTCAAGAAC
CTCAAGGGCCGAGTCAGCCGCATGAGGGGCCACACCAACGATGTCAGACG
CTGAGGAGCCGAGCTTCAAGGACATGTCAGCTTGATCTGGGAGACAG
CCAACTTCAAGCTGCTATCTCAAGGAGGACCTGGAGACAGCTGGTGAGCACCATAAT
TGGCAGGCCACTGGATTCGGAGTGGAGATCTGTAATCACCTCTGTGTGAG
CTTGTGTTACCGGATCGAGAAGGAGGCCATTCTGGGGCCGGAGACATTCTACGTGGAC
CGGCCAGGCCCCAACGGAAAACAGCTGGAGGGCCGGTGTACGTCACCCACGGGC
CGCCAGAAGGCTGTCACCTGACCGCACCCAAACGAGAACAGCGAGCTGAGGCC
ATCTAATCTGCTTCCAGGACTCTGGCTCTGGAGTGTACATCTGAGCCAGCG
TAGCCGGCCGGCATATTTCAGGGCCAGCCGGACACTGGCTGAGCAGCG
CAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAAGAGAGGAGTCTACCTGCTGGGTCGGGCCC
CATAGAAGGAGCTGGCGCAACAGCGAGCTGACAGCTGGTGACTCGGGGATTAGA
AAGGTCTGTTA [配列番号:83]

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKYK LKHIVWASRE LERPAVNPG
LETSESGRCQI LGQLQPSLQT GSEELSRSLN TVATLYCVHQ RIEKIDKTEA
DLKIEEONQK SKKCAQQAA DTHGSNQSVQ NPYIVPONIG QMVHQAIASPR
TLNAWKVKE EKAFAFSWPV MFSALSEGQD PQLDNTMLNT VGGHQAMOM
LKETINEKQF EWDVRVHPVH GPATAPGQMRE PRGSDIAVT STLQEJQIGNM
TNNPPIFGVE LYKKWIIHLGL NKIVTRYSPT SILDIRQGPK EPFRDVYUDR
YKTLRABQAS OEVKNVKMPCD LLVNUVANPDTK KITLALKGA PVATLEMMTAC
QGQVGGPHKA FRLVMGPVPT PQVLELRMTY KAADVLDHSFL KEGKGLEGLI
HSQRQRDILD LWIYHTQGYF DPMQNPYTPRGV GVRVPLTFGW CYKLXVLPEDP
KVEEANKGTS TSLHHFWPSLH GMDDPEREVL EWRFDSRKL HHVARELBHP
KNCNMCPIS FIETTVSCKL PGMDGPKVXW PLWEITEKKA LVEICTEMK
EGKTSKIGPE NYPTNPFVFAI KGGDKSTKWWK LVDRENRK TDQFWEVQLG
IHPHAGLKK KSTVLTUDLG AFYVSPLDED FRKYTAFTIP SINNETPTGIR
YQYNVNLPGW KGSPAIFQSS MKKILEPFKR QNPDIVYQY MDDLYVGSDL
EIJGQRHKTIE ELRHQLHRWG LTLPDKKHOQ BPPFLWMGYE LHPDKWVTPQ
VLPKEDOSWV NTUDIQKLWQK LNWSAQIYQG JKVROLCKL RGTAKTEV
PLTEEARBLEL AENRREILKEP HVGYVDDPSK DLIAJTKQOG QQGTYQIYQ
EFPKNLKTKG YARMGRGAHT DVKOLTEAVQ KITTEESIVW GKTPKFKLPI
QKETWTETWT WHYQWATWIPE WEFVNTPLV KLWYQLEKEP IVGAETFYVD
GAANRETRKQG KAGVYTNRGE QRKVITLDDTT NQKTELQAIYI LALQDSGLEV
NIVTDQSQYL GIQIAQDPSQ BSEELVNQIIIE QLIKKEKVYI AWVPAHKGIG
GNEQVDKLVS AGIRKVL*

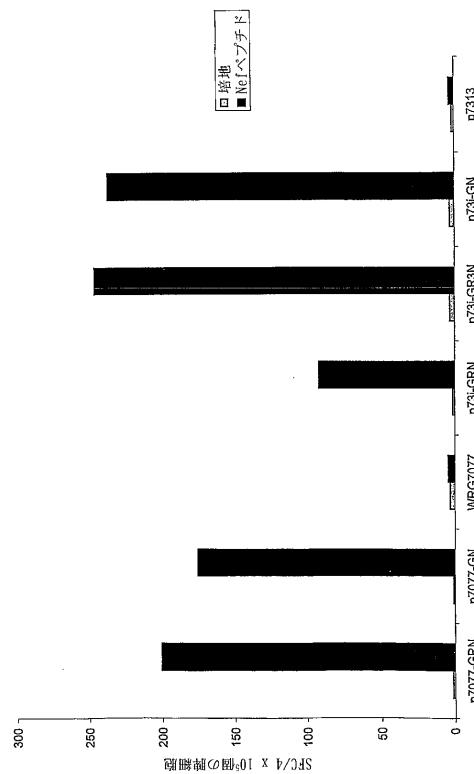
【図 19 - 3】



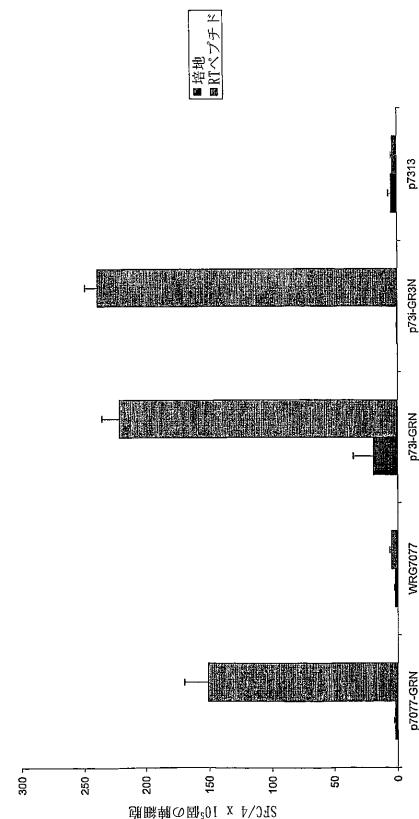
【 図 20 】



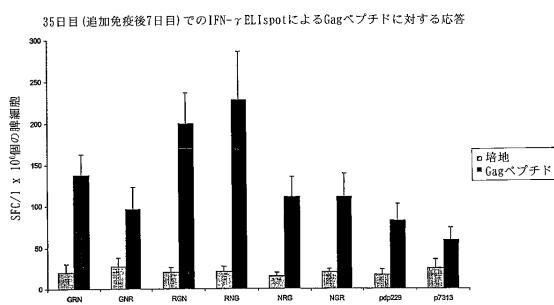
【 図 2 1 】



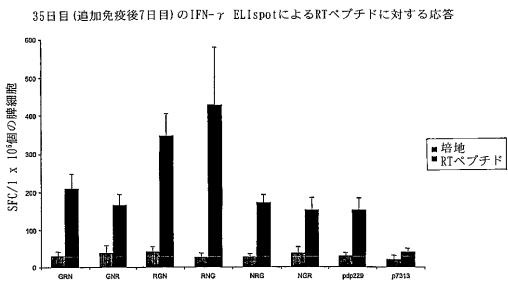
【 図 2 2 】



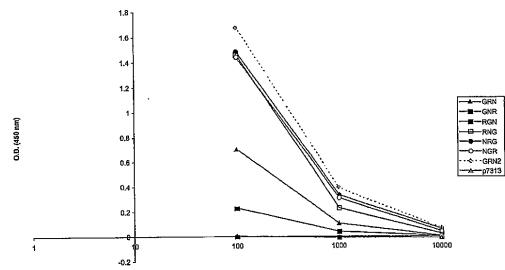
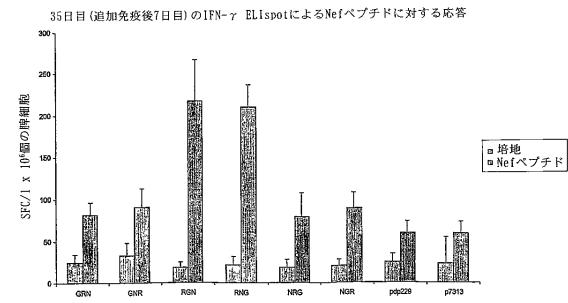
【図23-1】



【図23-2】



【図24】



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 0206462.4
(32)優先日 平成14年3月19日(2002.3.19)
(33)優先権主張国 英国(GB)

前置審査

(74)代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74)代理人 100122389
弁理士 新井 栄一
(74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
(72)発明者 ピートン, アンドリュー
イギリス国 ハートフォードシャー エスジー1 2エヌワイ, スティーブネージ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン
(72)発明者 エルトル, ピーター, フランツ
イギリス国 ハートフォードシャー エスジー1 2エヌワイ, スティーブネージ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン
(72)発明者 ゴフ, ジェラルド, ウェイン
イギリス国 ハートフォードシャー エスジー1 2エヌワイ, スティーブネージ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン
(72)発明者 リアー, アンドリュー
イギリス国 ハートフォードシャー エスジー1 2エヌワイ, スティーブネージ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン
(72)発明者 タイト, ジョン, フィリップ
イギリス国 ハートフォードシャー エスジー1 2エヌワイ, スティーブネージ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン
(72)発明者 ヴァン ウェリー, キャサリーン, アン
イギリス国 ハートフォードシャー エスジー1 2エヌワイ, スティーブネージ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 国際公開第01/088141(WO, A1)
J. Virol., 1999年, Vol.73, No.7, p.5320-5325
KOTSOPOULOU E, JOURNAL OF VIROLOGY, 米国, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 2000年 5月, V74 N10, P4839-4852
HUANG YUE, JOURNAL OF VIROLOGY, 2001年 5月, V75 N10, P4947-4951

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/16
C07K 19/00
C12N 15/49
A61K 39/21
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
PubMed