

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-147792

(P2012-147792A)

(43) 公開日 平成24年8月9日(2012. 8. 9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 B O 6 5
C O 7 K 14/155 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	C O 7 K 14/155	4 H O 4 5
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 K 39/21	

審査請求 有 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 114 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-76530 (P2012-76530)	(71) 出願人	591076811
(22) 出願日	平成24年3月29日 (2012. 3. 29)		ノバルティス バクシンズ アンド ダイ
(62) 分割の表示	特願2002-509356 (P2002-509356)		アグノスティックス, インコーポレーテッ
	の分割		ド
原出願日	平成13年7月5日 (2001. 7. 5)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 6
(31) 優先権主張番号	09/610, 313		0 8, エミリービル, ホートン ストリー
(32) 優先日	平成12年7月5日 (2000. 7. 5)		ト 4 5 6 0
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(71) 出願人	503009225
			ユニバーシティ オブ ステレンボスク
			南アフリカ 7 5 0 5 タイガーバーグ,
			ピー. オー. ボックス 1 9 0 6 3
		(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原性H I V C型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗原性C型H I Vポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびに免疫原性組成物におけるこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチド産物の使用を提供する。

【解決手段】 免疫原性H I V C型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、DNA免疫化、パッケージング細胞株の作成、およびH I V C型タンパク質の産生を含む用途におけるこのポリヌクレオチドの使用。および新規のC型H I V配列によってコードされるポリペプチド、およびこれらまたは他のC型H I V配列から生成される合成発現カセット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

X 個連続したヌクレオチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、ここで、(i) 該 X 個連続したヌクレオチドが、配列番号 4 6 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90% のパーセント同一性を有し、(ii) X が Y と等しく、そして (iii) Y が少なくとも 97 である、発現カセット。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の発現カセットであって、前記ポリヌクレオチドがさらに、配列番号 1 1 9、配列番号 1 2 0；配列番号 1 2 1；配列番号 1 2 2；配列番号 1 2 3；配列番号 1 2 4；配列番号 1 2 5；配列番号 1 2 6；配列番号 1 2 7；配列番号 1 3 1；配列番号 1 3 2 または配列番号 1 3 3 の E 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90% のパーセント同一性を有する、D 個連続したヌクレオチドを含み、(ii) D が E と等しく、そして (iii) E が少なくとも 300 であり、かつ、前記 X 個連続したヌクレオチドが、該 D 個連続したヌクレオチド内に存在する、発現カセット。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の発現カセットであって、ここで：

(a) (i) 前記 D 個連続したヌクレオチドが、配列番号 1 2 3 または配列番号 1 2 4 の E 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90% のパーセント同一性を有し、(ii) D が E と等しく、そして (iii) E が 2 4 3 3 であるか；

(b) (i) 前記 D 個連続したヌクレオチドが、配列番号 1 2 2 の E 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90% のパーセント同一性を有し、(ii) D が E と等しく、そして (iii) E が 2 3 0 1 であるか；

(c) (i) 前記 D 個連続したヌクレオチドが、配列番号 1 2 5 の E 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90% のパーセント同一性を有し、(ii) D が E と等しく、そして (iii) E が 2 5 1 7 であるか；

(d) (i) 前記 D 個連続したヌクレオチドが、配列番号 1 2 6 または配列番号 1 2 7 の E 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90% のパーセント同一性を有し、(ii) D が E と等しく、そして (iii) E が 2 5 2 0 であるか；

(e) (i) 前記 D 個連続したヌクレオチドが、配列番号 1 1 9 の E 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90% のパーセント同一性を有し、(ii) D が E と等しく、そして (iii) E が 1 3 7 7 であるか；

(f) (i) 前記 D 個連続したヌクレオチドが、配列番号 1 2 0 または配列番号 1 2 1 の E 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90% のパーセント同一性を有し、(ii) D が E と等しく、そして (iii) E が 1 8 3 9 であるか；あるいは

(g) (i) 前記 D 個連続したヌクレオチドが、配列番号 1 3 2 または配列番号 1 3 3 の E 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90% のパーセント同一性を有し、(ii) D が E と等しく、そして (iii) E が 1 8 9 0 である；

発現カセット

【請求項 4】

請求項 1 に記載の発現カセットであって、

1 つ以上のウイルスポリペプチドまたはウイルス抗原をコードする、1 つ以上の核酸をさらに含む、発現カセット。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の発現カセットであって、

前記ウイルスポリペプチドまたはウイルス抗原は、Gag、Env、vif、vpr、tat、rev、vpu、nef、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、発現カセット。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の発現カセットであって、

1つ以上のサイトカインをコードする1つ以上の核酸をさらに含む、発現カセット。

【請求項7】

選択された宿主細胞において使用するための組換え発現系であって、

請求項1に記載の発現カセット

を含み、

前記ポリヌクレオチド配列は、該選択された宿主細胞における発現を駆動可能な制御エレメントをさらに含む、組換え発現系。

【請求項8】

請求項7に記載の組換え発現系であって、

前記制御エレメントは、転写プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写終結シグナル、ポリアデニル化配列、翻訳の開始を最適化するための配列、および翻訳終止配列からなる群より選択される、組換え発現系。

【請求項9】

請求項7に記載の組換え発現系であって、

前記転写プロモーターは、CMV、CMV+イントロンA、SV40、RSV、HIV-Ltr、MMLV-Ltr、およびメタロチオネインからなる群より選択される、組換え発現系。

【請求項10】

請求項1に記載の発現カセットを含む細胞であって、

前記ポリヌクレオチド配列は、前記選択された細胞における発現と適合性である制御エレメントをさらに含む、細胞。

【請求項11】

哺乳動物細胞、昆虫細胞、細菌細胞、酵母細胞、植物、抗原提示細胞、初代細胞、不死化細胞、および腫瘍由来の細胞からなる群より選択される、請求項10に記載の細胞。

【請求項12】

BHK細胞、VERO細胞、HT1080細胞、293細胞、RD細胞、COS-7細胞、およびCHO細胞からなる群より選択される、請求項11に記載の細胞。

【請求項13】

CHO細胞である、請求項12に記載の細胞。

【請求項14】

Trichoplusia ni (Tn5) 昆虫細胞またはSf9昆虫細胞のうちのいずれかである、請求項11に記載の細胞。

【請求項15】

前記抗原提示細胞が、マクロファージ、単球、樹状細胞、B細胞、T細胞、幹細胞、およびそれらの前駆細胞からなる群より選択されるリンパ系細胞である、請求項11に記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(技術分野)

抗原性C型HIVポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、Gag、pol、vif、vpr、tat、rev、vpu、env、およびnef）が記載され、免疫原性組成物におけるこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチド産物の使用も記載される。C型HIVの南アフリカ改変体由来のポリヌクレオチド配列もまた、記載される。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

10

20

30

40

50

後天性免疫不全症候群（AIDS）は、現代医学が直面している最も巨大な健康の脅威の1つとして認識されている。この疾患に対する治療法は、未だ存在しない。1983年から1984年において、3つのグループが、AIDSについて疑われる病原性因子を独立して同定した。例えば、Barre-Sinoussiら（1983）*Science* 220:868-871; Montagnierら、Human T-Cell Leukemia Viruses (Gallo, EssexおよびGross編、1984); Vilmerら（1984）*The Lancet* 1:753; Popovicら（1984）*Science* 224:497-500; Levyら（1984）*Science* 225:840-842を参照のこと。これらの単離物は、リンパ節腫脹関連ウイルス（LAV）、ヒトT細胞リンパ指向性ウイルスIII型（HTLV-III）、またはAIDS関連レトロウイルス（ARV）と多様に呼称されている。これらの単離物の全ては、同じウイルスの株であり、そして、これらの単離物の全ては、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）と集合的に後に命名された。関連するAIDSを引き起こすウイルスの単離によって、元来HIVと呼称された株は、現在HIV-1と称され、そしてこの関連するウイルスは、HIV-2と呼称される。例えば、Guyaderら（1987）*Nature* 326:662-669; Brun-Vezinetら（1986）*Science* 233:343-346; Clavelら（1986）*Nature* 324:691-695を参照のこと。

【0003】

HIVウイルスについての膨大な情報が集められたが、現在までに効果的なワクチンは同定されていない。ワクチン開発のためのいくつかの標的が調べられ、この標的としては、HIVによってコードされるenv遺伝子産物およびGag遺伝子産物が挙げられる。Gag遺伝子産物としては、Gag-ポリメラーゼおよびGag-プロテアーゼが挙げられるが、これらに限定されない。Env遺伝子産物としては、モノマー性gp120ポリペプチド、オリゴマー性gp140ポリペプチドおよびgp160ポリペプチドが挙げられるがこれらに限定されない。

【0004】

Haasら（*Current Biology* 6(3):315-324, 1996）は、HIV-1による選択的なコドン使用頻度が、ウイルス性タンパク質合成能がないことの実質的な部分の原因と思われることを示唆した。Andreら（*J. Virol.* 72(2):1497-1503, 1998）は、改変したコドン使用頻度と共に合成gp120配列を使用するDNAワクチン接種によって惹起される免疫応答の増大を記載した。Schneiderら（*J. Virol.* 71(7):4892-4903, 1997）は、Gagのコード配列およびGag-プロテアーゼコード配列のコード配列中に位置づけられる阻害（または、不安定化）エレメント（INS）の不活性化を議論する。

【0005】

HIV-1のGagタンパク質は、ウイルス様粒子の集合に必要である。HIV-1 Gagタンパク質は、集合（assembly）、粒子放出後のビリオン成熟、およびウイルス複製における初期の侵入後の段階を含むウイルスの生活環の多くの段階に関連する。このHIV-1 Gagタンパク質の役割は、多数であり、そして複雑である（Frederick, E. O., *Virology* 251:1-15, 1998）。

【0006】

Wolfら（PCT国際出願、WO 96/30523（1996年10月3日に発行）；欧州特許出願、公開番号0 449 116 A1（1991年10月2日に発行））は、特に、免疫学的に重要なエピトープの提示のための非感染性レトロウイルス様粒子状キャリアとして作用するHIV-1の変更したpr55 Gagの用途を記載した。Wangら（*Virology* 200:524-534, 1994）は、ビリオン中への、HIV Gag-β-ガラクトシダーゼ融合タンパク質の集合を研究するための系を記載する。彼らは、HIV Gag-β-ガラクトシダーゼ融合タンパク質をコードする配列の構築、HIV Gagタンパク質の存在下のこのような配列の発現、およびこれらの

10

20

30

40

50

タンパク質のウイルス粒子への集合を記載する。

【0007】

Shiverら（PCT国際出願、WO 98/34640、1998年8月13日発行）は、HIV-1（CAM1）Gagコード配列を改変して、HIV Gagをコードする合成DNA分子を産生すること、およびHIV Gagの改変を記載する。この合成分子のコドンは、計画された（projected）宿主細胞によって好まれるコドンであった。

【0008】

最近、免疫原性組成物におけるHIV Envポリペプチドの使用が、記載された（Hurwitzらへの米国特許番号第5,846,546号（1998年12月8日発行）（この特許は、各々が異なったHIV env改変体を発現する4つの異なる組み換えウイルスの混合物を含む免疫原性組成物を記載する）；およびVahlneらへの米国特許番号第5,840,313号（1998年11月24日発行）（この特許は、HIV-1 gp120タンパク質のエピトープに対応するペプチドを記載する））。さらに、Siaらへの米国特許番号第5,876,731号（1999年3月2日発行）は、GPGR配列を含有するHIV-1単離物のV3ループタンパク質のB細胞エピトープのアミノ酸配列に直接的に連結されたGagのT細胞エピトープのアミノ酸配列を含むHIVに対する候補ワクチンを記載する。抗原性HIVポリペプチド（特にC型単離物）に対する必要性がなお存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

（発明の要旨）

本明細書中に記載されるものは、新規のC型HIV配列（例えば、8__5__TV1__C.ZA、8__2__TV1__C.ZAおよび12-5__1__TV2__C.ZA）、これらの新規配列によってコードされるポリペプチド、およびこれらまたは他のC型HIV配列から生成される合成発現カセットである。

【0010】

特定の実施形態において、本発明は、HIV C型ポリペプチド（Env、Gag、Pol、Prot、Vpr、Vpu、Vif、Nef、Tat、Revおよび／またはそれらのフラグメント）をコードする合成発現カセットに関する。さらに、本発明また、HIV C型ポリペプチドの発現の改善、およびウイルス様粒子の産生に関する。HIVポリペプチド（例えば、Gag-、pol-、プロテアーゼ（prot）-、逆転写酵素、インテグラーゼ、RNAseH、Tat、Rev、Nef、Vpr、Vpu、Vifおよび／またはEnvを含有するポリペプチド）をコードする合成発現カセットが、記載され、この発現カセットの使用も記載される。

【0011】

従って、本発明の1つの局面は、発現カセットおよびこの中に含まれるポリヌクレオチドに関する。この発現カセットは、代表的には、発現ベクター骨格に挿入されたHIVポリペプチドコード配列を含む。1つの実施形態において、発現カセットは、1以上のPol含有ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここで、このポリヌクレオチド配列は、本明細書中で教示される少なくとも約85%、好ましくは約90%、より好ましくは約95%、およびより好ましくは約98%（およびこれらの値の間の任意の整数）の配列同一性を有する配列を含む。Pol含有ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列としては、配列番号30、配列番号31；配列番号32；配列番号62；配列番号103；配列番号58；配列番号60；配列番号64；配列番号66；配列番号68；配列番号70；配列番号76；および配列番号78に示される配列が挙げられるが、これらに限定されない。

【0012】

本発明のHIVポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、さらなるポリペプ

チドをコードする配列を含み得る。ポリペプチドをコードするこのようなさらなるポリヌクレオチドは、例えば、他のウイルスタンパク質（例えば、B型肝炎またはC型肝炎あるいは他のHIVのタンパク質）についてのコード配列（例えば、HIV Gagポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、HIV Envポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列および／またはvif、vpr、tat、rev、vpuおよびnefのうちの1以上をコードするポリヌクレオチド）；サイトカインまたは他の導入遺伝子を含み得る。1つの実施形態において、HIV Polポリペプチドをコードする配列は、逆転写酵素およびインテグラーゼに対応するコード領域の欠失によって改変され得る。このポリメラーゼポリペプチドにおけるこのような欠失はまた、作製され得、その結果、このポリヌクレオチド配列は、ヘルパーT細胞およびCTLのエピトープを維持する。目的の他の抗原は、同様にポリメラーゼに挿入され得る。

10

【0013】

別の実施形態において、発現カセットは、HIV Gag含有ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここで、Gagポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書中で教示される配列に対して、少なくとも約85%、好ましくは約90%、より好ましくは約95%、そして最も好ましくは約98%配列同一性を有する配列を含む。Gag含有ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列としては、以下のポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない：図1のヌクレオチド844-903（Gagの主要な相同性領域）（配列番号1）；図2のヌクレオチド841-900（Gagの主要な相同性領域）（配列番号2）；図24（配列番号53、Gagの主要な相同性領域）；図1として提示される配列（配列番号3）；図22として提示される配列（配列番号51）；図70として提示される配列（配列番号99）；および図2として提示される配列（配列番号4）。上述のように、本発明のGag含有ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、さらなるポリペプチドをコードする配列を含み得る。

20

【0014】

別の実施形態において、発現カセットは、HIV Env含有ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含有し、ここで、Envポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書中で教示される配列に対して、少なくとも約85%、好ましくは約90%、より好ましくは約95%、そして最も好ましくは約98%の配列同一性を有する配列を含む。Env含有ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列としては、以下のポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない：図3のヌクレオチド1213-1353（配列番号5）（これは、Env共通領域をコードする）；図17として提示される配列（配列番号46）（これは、97ヌクレオチド長のEnv共通領域をコードする）；配列番号47（これは、144ヌクレオチド長のEnv共通領域をコードする）；図3のヌクレオチド82-1512（配列番号6）（これは、gp120ポリペプチドをコードする）；図3のヌクレオチド82-2025（配列番号7）（これは、gp140ポリペプチドをコードする）；図3のヌクレオチド82-2547（配列番号8）（これは、gp160ポリペプチドをコードする）；配列番号49（これは、gp160ポリペプチドをコードする）；図3のヌクレオチド1-2547（配列番号9）（これは、シグナル配列を有するgp160ポリペプチドをコードする）；図3のヌクレオチド1513-2547（配列番号10）（これは、gp41ポリペプチドをコードする）；図4のヌクレオチド1210-1353（配列番号11）（これは、Env共通領域をコードする）；図4のヌクレオチド73-1509（配列番号12）（これは、gp120ポリペプチドをコードする）；図4のヌクレオチド73-2022（配列番号13）（これは、gp140ポリペプチドをコードする）；図4のヌクレオチド73-2565（配列番号14）（これは、gp160ポリペプチドをコードする）；図4のヌクレオチド1-2565（配列番号15）（これは、シグナル配列を有するp160ポリペプチドをコードする）；図20として提示される配列（配列番号49）（これは、gp160ポリペプチドをコードする）；図68として提示される配列（配列番号97）

30

40

50

(これは、g p l 6 0 ポリペプチドをコードする) ; 図 4 のヌクレオチド 1 5 1 0 - 2 5 6 5 (配列番号 1 6) (これは、g p 4 1 ポリペプチドをコードする) ; 図 9 0 のヌクレオチド 7 ~ 1 4 6 4 (配列番号 1 1 9) (これは、改変された野生型シグナル配列を有する g p l 2 0 ポリペプチドをコードする) ; 図 9 1 のヌクレオチド 7 ~ 1 9 7 7 (配列番号 1 2 0) (これは、野生型 8 _ 2 _ T V 1 _ C . Z A から改変されたシグナル配列 (例えば、「改変された野生型リーダー配列」) を含む g p l 4 0 ポリペプチドをコードする) ; 図 9 2 のヌクレオチド 7 ~ 1 9 7 7 (配列番号 1 2 1) (これは、改変された野生型 8 _ 2 _ T V 1 _ C . Z A シグナル配列を有する g p l 4 0 ポリペプチドをコードする) ; 図 9 3 のヌクレオチド 7 ~ 2 3 8 8 (配列番号 1 2 2) (これは、改変された野生型シグナル配列を有する g p l 6 0 ポリペプチドをコードする) ; 図 9 4 のヌクレオチド 7 ~ 2 5 2 0 (配列番号 1 2 3) (これは、改変された野生型 8 _ 2 _ T V 1 _ C . Z A シグナル配列を有する g p l 6 0 ポリペプチドをコードする) ; 図 9 5 のヌクレオチド 7 ~ 2 5 2 0 (配列番号 1 2 4) (これは、改変された野生型 8 _ 2 _ T V 1 _ C . Z A シグナル配列を有する g p l 6 0 ポリペプチドをコードする) ; 図 9 6 のヌクレオチド 1 3 ~ 2 6 0 4 (配列番号 1 2 5) (これは、T P A 1 シグナル配列を有する g p l 6 0 ポリペプチドをコードする) ; 図 9 7 のヌクレオチド 7 ~ 2 6 0 7 (配列番号 1 2 6) (これは、改変された野生型 8 _ 2 _ T V 1 _ C . Z A シグナル配列を有する g p l 6 0 ポリペプチドをコードする) ; 図 1 0 0 のヌクレオチド 1 ~ 2 0 4 9 (配列番号 1 3 1) (これは、T P A 1 シグナル配列を有する g p l 4 0 ポリペプチドをコードする) ; 図 9 8 のヌクレオチド 7 ~ 1 6 0 7 (配列番号 1 2 6) (これは、野生型 8 _ 2 _ T V 1 _ C . Z A シグナル配列を有する g p l 6 0 ポリペプチドをコードする) ; 配列番号 1 3 2 のヌクレオチド 7 ~ 2 0 6 4 (これは、野生型 8 _ 2 _ T V 1 _ C . Z A リーダー配列を有する g p l 4 0 ポリペプチドをコードする) ; および配列番号 1 3 3 のヌクレオチド 7 ~ 2 0 6 4 (これは、改変された野生型 8 _ 2 _ T V 1 _ C . Z A リーダー配列を有する g p l 4 0 ポリペプチドをコードする)。

【0015】

特定の実施形態において、E n v コード配列は、さらなる改変、例えば、g p l 2 0 ポリペプチドおよび g p 4 1 ポリペプチド (配列番号 1 2 1 および配列番号 1 2 4) への g p l 4 0 ポリペプチドの切断または可変領域 V 1 および / または V 2 (配列番号 1 1 9 ; 配列番号 1 2 0 ; 配列番号 1 2 1 ; 配列番号 1 2 2 ; 配列番号 1 2 3 ; および配列番号 1 2 4) の欠失を防ぐための切断部位の変異を含む。

【0016】

別の実施形態において、発現カセットは、H I V N e f 含有ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここで、N e f ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書中で教示される配列に対して、少なくとも約 8 5 %、好ましくは約 9 0 %、より好ましくは約 9 5 %、そして最も好ましくは約 9 8 % の配列同一性を有する配列を含む。N e f 含有ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列としては、以下のポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない : 図 2 6 において提示される配列 (配列番号 5 5) ; 図 7 2 で提示される配列 (配列番号 1 0 1) ; 図 2 8 で提示される配列 (配列番号 5 7) ; 図 6 7 で提示される配列 (配列番号 9 6) ; 図 1 0 3 で提示される配列 (配列番号 1 3 4) ; および図 1 0 4 で提示される配列 (配列番号 1 3 5)。

【0017】

別の実施形態において、発現カセットは、H I V R e v 含有ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここで、R e v ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書中で教示される配列に対して、少なくとも約 8 5 %、好ましくは約 9 0 %、より好ましくは約 9 5 %、そして最も好ましくは約 9 8 % の配列同一性を有する配列を含む。R e v 含有ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列としては、以下のポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない : 図 4 3 で提示される配列 (配列番号 7 2) ; 図 7 6 で提示される配列 (配列番号 1 0 5) ; 図 4

10

20

30

40

50

5で提示される配列（配列番号74）；図78で提示される配列（配列番号107）；および図62で提示される配列（配列番号91）。

【0018】

別の実施形態において、発現カセットは、H I V T a t 含有ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む、ここで、T a t ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書中で教示される配列に対して、少なくとも約85%、好ましくは約90%、より好ましくは約95%、そして最も好ましくは約98%の配列同一性を有する配列を含む。T a t 含有ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列としては、以下のポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない：図51で提示される配列（配列番号80）；図80で提示される配列（配列番号109）；図52で提示される配列（配列番号81）；図54で提示される配列（配列番号83）；および図82で提示される配列（配列番号111）。

10

【0019】

別の実施形態において、発現カセットは、H I V V i f 含有ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここで、V i f ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書中で教示される配列に対して、少なくとも約85%、好ましくは約90%、より好ましくは約95%、そして最も好ましくは約98%の配列同一性を有する配列を含む。V i f 含有ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列としては、以下のポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない：図56で提示される配列（配列番号85）；および図84で提示される配列（配列番号113）。

20

【0020】

別の実施形態において、発現カセットは、H I V V p r 含有ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここで、V p r ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書中で教示される配列に対して、少なくとも約85%、好ましくは約90%、より好ましくは約95%、そして最も好ましくは約98%の配列同一性を有する配列を含む。V p r 含有ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列としては、以下のポリヌクレオチドが挙げられるがこれらに限定されない：図58で提示される配列（配列番号87）；および図86で提示される配列（配列番号115）。

【0021】

別の実施形態において、発現カセットは、H I V V p u 含有ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ここで、V p u ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書中で教示される配列に対して、少なくとも約85%、好ましくは約90%、より好ましくは約95%、そして最も好ましくは約98%の配列同一性を有する配列を含む。V p u 含有ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列としては、以下のポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない：図60で提示される配列（配列番号89）；および図88で提示される配列（配列番号117）。

30

【0022】

本発明のさらなる実施形態としては、本明細書中で記載された配列のいずれかのの精製されたポリヌクレオチドが挙げられる。G a g 含有ポリペプチドをコードする例示的なポリヌクレオチド配列としては、以下のポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない：図1のヌクレオチド844～903（配列番号1）（G a g の主要な相同性領域）；図2のヌクレオチド841～900（配列番号2）（G a g の主要な相同性領域）；図1として提示される配列（配列番号3）；図2として提示される配列（配列番号4）；図22として提示される配列（配列番号51）；図70として提示される配列（配列番号99）；および図24として提示される（配列番号53）（G a g の主要な相同性領域）。

40

【0023】

E n v 含有ポリペプチドをコードする、例示的なポリヌクレオチド配列としては、以下

50

のポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない：図3のヌクレオチド1213～1353（配列番号5）（Env共通領域をコードする）；図17として示される配列（配列番号46）（97ヌクレオチド長のEnv共通領域をコードする）；配列番号47（144ヌクレオチド長のEnv共通領域をコードする）；図3のヌクレオチド82～1512（配列番号6）（gp120ポリペプチドをコードする）；図3のヌクレオチド82～2025（配列番号7）（gp140ポリペプチドをコードする）；図3のヌクレオチド82～2547（配列番号8）（gp160ポリペプチドをコードする）；配列番号49（gp160ポリペプチドをコードする）；図3のヌクレオチド1～2547（配列番号9）（シグナル配列を有するgp160ポリペプチドをコードする）；図3のヌクレオチド1513～2547（配列番号10）（gp41ポリペプチドをコードする）；図4のヌクレオチド1210～1353（配列番号11）（Env共通領域をコードする）；図4のヌクレオチド73～1509（配列番号12）（gp120ポリペプチドをコードする）；図4のヌクレオチド73～2022（配列番号13）（gp140ポリペプチドをコードする）；図4のヌクレオチド73～2565（配列番号14）（gp160ポリペプチドをコードする）；図4のヌクレオチド1～2565（配列番号15）（シグナル配列を有するgp160ポリペプチドをコードする）；図20として示される配列（配列番号49）（gp160ポリペプチドをコードする）；図68として示される配列（配列番号97）（gp160ポリペプチドをコードする）；図4のヌクレオチド1510～2565（配列番号16）（gp41ポリペプチドをコードする）；図90のヌクレオチド7～1464（配列番号119）（改変した野生型シグナル配列を有するgp120ポリペプチドをコードする）；図91のヌクレオチド7～1977（配列番号120）（野生型8__2__TV1__C. ZAから改変されたシグナル配列（例えば、「改変した野生型リーダー配列」）を含む、gp140ポリペプチドをコードする）；図92のヌクレオチド7～1977（配列番号121）（改変した野生型8__2__TV1__C. ZAシグナル配列を有するgp140ポリペプチドをコードする）；図93のヌクレオチド7～2388（配列番号122）（改変した野生型シグナル配列を有するgp160ポリペプチドをコードする）；図94のヌクレオチド7～2520（配列番号123）（改変した野生型8__2__TV1__C. ZAシグナル配列を有するgp160ポリペプチドをコードする）；図95のヌクレオチド7～2520（配列番号124）（改変した野生型8__2__TV1__C. ZAシグナル配列を有するgp160ポリペプチドをコードする）；図96のヌクレオチド13～2604（配列番号125）（TPA1シグナル配列を有するgp160ポリペプチドをコードする）；図97のヌクレオチド7～2607（配列番号126）（改変した野生型8__2__TV1__C. ZAシグナル配列を有するgp160ポリペプチドをコードする）；図100のヌクレオチド1～2049（配列番号131）（TPA1シグナル配列を有するgp140ポリペプチドをコードする）；図98のヌクレオチド7～1607（配列番号126）（野生型8__2__TV1__C. ZAシグナル配列を有するgp160ポリペプチドをコードする）；配列番号132のヌクレオチド7～2064（改変した野生型8__2__TV1__C. ZAリーダー配列を有するgp140ポリペプチドをコードする）；および配列番号133のヌクレオチド7～2064（野生型8__2__TV1__C. ZAリーダー配列を有するgp140ポリペプチドをコードする）。

【0024】

さらなるHIVポリヌクレオチドをコードする、例示的な精製されたポリヌクレオチドとしては、以下が挙げられる：Polをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号30、配列番号31；配列番号32；配列番号62；配列番号103；配列番号58；配列番号60；配列番号64；配列番号66；配列番号68；配列番号70；配列番号76；および配列番号78）；Nefをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号55；配列番号101；配列番号57；配列番号96）；Revをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号72；配列番号105；配列番号74；配列番号107；配列番号91）；Tatをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号80；配列番号109；配列番号81；配列番号83；配列番号111）；Vifをコードするポリヌクレオチ

ド（例えば、配列番号 85；配列番号 113）；ならびに V p r をコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号 87；配列番号 115）；V p u をコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号 89；配列番号 117）。

【0025】

他の実施形態において、本発明は、新規の C 型株より得られるネイティブの H I V ポリペプチドをコードする配列；これらのネイティブの配列のフラグメント；これらの野生型配列を含む発現カセット；ならびに、これらの配列、フラグメントおよび発現カセットの使用に関する。例示的な全長配列は、配列番号 33 および配列番号 45 に示される。種々の H I V 遺伝子産物をコードする例示的なフラグメントとしては、以下が挙げられる：図 19 に示される配列（配列番号 48）（E n v をコードする配列）；図 69 に示される配列（配列番号 98）（E n v をコードする配列）；図 21 に示される配列（配列番号 50）（g p 160 ポリペプチド）；図 23 に示される配列（配列番号 52）（G a g ポリペプチド）；図 71 に示される配列（配列番号 100）（G a g ポリペプチド）；図 25 に示される配列（配列番号 54）（G a g ポリペプチド）；図 27 に示される配列（配列番号 56）（N e f ポリペプチド）；図 73 に示される配列（配列番号 102）（N e f ポリペプチド）；図 30 に示される配列（配列番号 59）（p 15 R N A s e H ポリペプチド）；図 32 に示される配列（配列番号 61）（p 31 インテグラーゼポリペプチド）；図 34 に示される配列（配列番号 63）（P o l ポリペプチド）；図 75 に示される配列（配列番号 104）（P o l ポリペプチド）；図 36 に示される配列（配列番号 65）（P r o t ポリペプチド）；図 38 に示される配列（配列番号 67）（不活化 P r o t ポリペプチド）；図 40 に示される配列（配列番号 69）（不活化 P r o t ポリペプチドおよび R T ポリペプチド）；図 42 に示される配列（配列番号 71）（P r o t ポリペプチドおよび R T ポリペプチド）；図 44 に示される配列（配列番号 73）（R e v ポリペプチド）；図 77 に示される配列（配列番号 106）（R e v ポリペプチド）；図 46 に示される配列（配列番号 75）（R e v ポリペプチド）；図 79 に示される配列（配列番号 108）（R e v ポリペプチド）；図 48 に示される配列（配列番号 77）（R T ポリペプチド）；図 50 に示される配列（配列番号 79）（変異した R T ポリペプチド）；図 53 に示される配列（配列番号 82）（T a t ポリペプチド）；図 81 に示される配列（配列番号 110）（T a t ポリペプチド）；図 55 に示される配列（配列番号 84）（T a t ポリペプチド）；図 83 に示される配列（配列番号 112）（T a t ポリペプチド）；図 57 に示される配列（配列番号 86）（V i f ポリペプチド）；図 85 に示される配列（配列番号 114）（V i f ポリペプチド）；図 59 に示される配列（配列番号 88）（V p r ポリペプチド）；図 82 に示される配列（配列番号 116）（V p r ポリペプチド）；図 61 に示される配列（配列番号 90）（V p u ポリペプチド）；図 89 に示される配列（配列番号 118）（V p u ポリペプチド）；図 63 に示される配列（配列番号 92）（R e v ポリペプチド）；ならびに図 66 に示される配列（配列番号 95）（T a t ポリペプチド）。

【0026】

本発明の H I V ポリペプチドをコードするネイティブなポリヌクレオチド配列および合成ポリヌクレオチド配列は、代表的には、本明細書中に教示される配列と、少なくとも約 85%、好ましくは、約 90%、より好ましくは、約 95%、そして最も好ましくは、約 98% の配列同一性を有する。さらに、特定の実施形態において、本発明の H I V ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書中に教示される配列と、100% の配列同一性を示す。

【0027】

本発明のポリヌクレオチドは、組換え技術、合成技術またはそれらの組み合わせによって生成され得る。

【0028】

本発明は、さらに、選択した宿主細胞における使用のための組換え発現系を包含し、ここで、この組換え発現系は、本発明の 1 つ以上のポリヌクレオチドおよび発現カセットを

用いる。このような系において、ポリヌクレオチド配列は、選択した宿主細胞における発現と適合性のコントロールエレメントに作動可能に連結される。多数の発現コントロールエレメントが、当該分野で公知であり、これらとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：転写プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写終止シグナル、ポリアデニル化配列、翻訳の開始を最適化するための配列、および翻訳終止配列。例示的な転写プロモーターとしては、CMV、CMV+イントロンA、SV40、RSV、HIV-Ltr、MMLV-Ltrおよびメタロチオネンから誘導されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0029】

本発明の別の局面は、本発明の1つ以上の発現カセットを含む細胞を含み、ここで、ポリヌクレオチド配列は、選択された細胞における発現と適合性の制御エレメントに作動可能に連結される。1つの実施形態において、このような細胞は、哺乳動物細胞である。例示的な哺乳動物細胞としては、BHK細胞、VERO細胞、HT1080細胞、293細胞、RD細胞、COS-7細胞およびCHO細胞が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の実施において有用であり得る他の細胞、細胞型、組織型などとしては、以下から得られるものが挙げられるがこれらに限定されない：昆虫（例えば、Trichoplusia ni (Tn5) および Sf9）、細菌、酵母、植物、抗原提示細胞（例えば、マクロファージ、単球、樹状細胞、B細胞、T細胞、幹細胞およびそれらの前駆細胞）、一次細胞、不死化細胞、腫瘍誘導細胞。

【0030】

さらなる局面において、本発明は、免疫学的応答を産生するための組成物を包含し、ここで、この組成物は、代表的には、本発明の少なくとも1つの発現カセットを含有し、そして例えば、発現カセット（例えば、Polポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する1つ以上の発現カセット、Gagポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する1つ以上の発現カセット、付随ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ネイティブもしくは合成の、vpu、vpr、nef、vif、tat、rev）を有する1つ以上の発現カセット、および／またはEnvポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する1つ以上の発現カセット）の組み合わせを含有し得る。このような組成物は、さらに、アジュバント（単数または複数）を含有し得る。これらの組成物はまた、1つ以上のC型HIVポリペプチドを含有し得る。このC型HIVポリペプチドは、組成物中の発現カセットによってコードされるポリペプチドに対応し得るか、または発現カセットによってコードされるものとは異なり得る。組成物中に提供されるように、同じポリペプチドをコードする発現カセットにおけるポリヌクレオチドの例は、以下の通りである：この発現カセットにおけるポリヌクレオチドは、図1のGagポリペプチド（配列番号3）をコードし、そしてこのポリペプチド（配列番号17）は、図1に示される配列によってコードされるポリペプチドである。組成物中に提供されるように、異なるポリペプチドをコードする発現カセットにおけるポリヌクレオチドの例は、以下の通りである：Gagポリメラーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する発現カセット。そして、組成物中に提供されるこのポリペプチドは、Gagポリペプチドおよび／またはGagプロテアーゼポリペプチドであり得る。発現カセット（または、本発明のポリヌクレオチド）およびポリペプチドの両方を含有する組成物において、本発明の種々の発現カセットが混合され得、そして／または本明細書中に記載される種々のC型HIVポリペプチドと適合され得る。

【0031】

別の局面において、本発明は、被験体の免疫化の方法を包含する。本方法において、上記の組成物のいずれかは、被験体中の発現カセットの発現に適合性である条件下で、被験体中にある。1つの実施形態において、発現カセット（または、本発明のポリヌクレオチド）は、遺伝子送達ベクターを使用して導入され得る。この遺伝子送達ベクターは、例えば、非ウイルスベクター、またはウイルスベクターであり得る。例示的なウイルスベクターとしては、Sindbisウイルス由来ベクター、レトロウイルスベクターおよびレン

チウイルスベクターが挙げられるがこれらに限定されない。免疫学的応答を生じるために有用な組成物はまた、特定のキャリアを使用して送達され得る。さらに、このような組成物は、例えば、ゴールド粒子またはタングステン粒子、および例えば、遺伝子銃を使用して被験体に送達されるコーティングされた粒子上にコーティングされ得る。これらの組成物はまた、リポソームとして処方され得る。この方法の1つの実施形態において、被験体は、哺乳動物であり、そして例えば、ヒトであり得る。

【0032】

さらなる局面において、本発明は、被験体において免疫応答を生じる方法を包含する。本明細書中に記載される発現カセットのいずれかは、適切な細胞において発現されて、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるC型HIVポリペプチドの発現を提供し得る。次いで、ポリペプチドは単離（例えば、続いて精製）され、免疫応答を誘発するのに十分な量で被験体に投与される。特定の実施形態において、本方法は、本明細書中に記載される遺伝子送達技術のいずれかを使用して、本発明の1つ以上の発現カセットまたはポリヌクレオチドを投与する工程を包含する。他の実施形態において、本方法は、本発明の1つ以上の発現カセットまたはポリヌクレオチドおよび1つ以上のポリペプチドを同時投与する工程を包含し、ここで、これらのポリペプチドは、これらのポリヌクレオチドから発現され得るか、または他のサブタイプCのHIVポリペプチドであり得る。他の実施形態において、本方法は、本発明の複数の発現カセットまたはポリヌクレオチドを同時投与する工程を包含し得る。なおさらなる実施形態において、本方法は、複数のポリペプチド、例えば、本発明のポリヌクレオチドから発現されるポリペプチドおよび／または他のサブタイプCのHIVポリペプチドを同時投与する工程を包含し得る。

【0033】

本発明はさらに、被験体において免疫応答を生じる方法を包含し、ここで、被験体の細胞は、選択されたポリヌクレオチドの発現および目的のポリペプチド（例えば、本発明の任意の発現カセットによってコードされる）の産生が可能な条件下で、上記の発現カセットまたは本発明のポリヌクレオチドのいずれかを用いてトランスフェクトされる。この方法によって、ポリペプチドに対する免疫応答が、被験体で誘発される。細胞のトランスフェクションは、エキソビボで行われ得、そしてトランスフェクトされた細胞は、被験体に再導入される。あるいは、またはさらに、細胞は被験体においてインビボでトランスフェクトされ得る。免疫応答は、体液性および／または細胞媒介性（細胞性）であり得る。さらなる実施形態において、この方法はまた、被験体への発現カセットの導入前、導入時および／または導入後に、C型HIVポリペプチドを投与する工程を包含し得る。

【0034】

本発明は例えば、以下の項目を提供する：

（項目1） HIV Polポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットであって、ここで、該Polポリペプチドをコードする該ポリヌクレオチド配列が、図8（配列番号30）；図9（配列番号31）または図10（配列番号32）に示される配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、発現カセット。

（項目2） X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、（i）該X個連続したヌクレオチドが、配列番号46のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、（ii）Xが、Yと等しく、そして（iii）Yが、少なくとも97である、発現カセット。

（項目3） X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目2に記載の発現カセットであって、ここで、（i）該X個連続したヌクレオチドが、配列番号47のY個連続したヌクレオチド配列に対して、少なくとも90%のパーセント同一性を有し、（ii）Xが、Yと等しく、そして（iii）Yが、少なくとも144である、発現カセット。

（項目4） X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目3に記載の発現カセットであって、ここで、（i）該X個連続したヌクレオチドが、配列番号49ま

たは配列番号 97 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90 % のパーセント同一性を有し、(i i) X が、Y と等しく、そして (i i i) Y が、少なくとも 300 である、発現カセット。

(項目 5) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目 4 に記載の発現カセットであって、ここで、(i) 該 X 個連続したヌクレオチドが、配列番号 49 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90 % のパーセント同一性を有し、(i i) X が、Y と等しく、そして (i i i) Y が、2610 である、発現カセット。

(項目 6) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目 4 に記載の発現カセットであって、ここで、(i) 該 X 個連続したヌクレオチドが、配列番号 97 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90 % のパーセント同一性を有し、(i i) X が、Y と等しく、そして (i i i) Y が、2565 である、発現カセット。

(項目 7) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該 X 個連続したヌクレオチドが、配列番号 51 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90 % のパーセント同一性を有し、(i i) X が、Y と等しく、そして (i i i) Y が、1494 である、発現カセット。

(項目 8) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該 X 個連続したヌクレオチドが、配列番号 99 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90 % のパーセント同一性を有し、(i i) X が、Y と等しく、そして (i i i) Y が、1491 である、発現カセット。

(項目 9) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該 X 個連続したヌクレオチドが、配列番号 55 ; 配列番号 57 ; 配列番号 101 ; 配列番号 96 ; 配列番号 134 または配列番号 135 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90 % のパーセント同一性を有し、(i i) X が、Y と等しく、そして (i i i) Y が、少なくとも 60 である、発現カセット。

(項目 10) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目 9 に記載の発現カセットであって、ここで、(i) 該 X 個連続したヌクレオチドが、配列番号 55 ; 配列番号 57 ; 配列番号 101 ; 配列番号 96 ; 配列番号 134 または配列番号 135 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90 % のパーセント同一性を有し、(i i) X が、Y と等しく、そして (i i i) Y が、624 である、発現カセット。

(項目 11) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該 X 個連続したヌクレオチドが、配列番号 58 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90 % のパーセント同一性を有し、(i i) X が、Y と等しく、そして (i i i) Y が、354 である、発現カセット。

(項目 12) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該 X 個連続したヌクレオチドが、配列番号 60 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90 % のパーセント同一性を有し、(i i) X が、Y と等しく、そして (i i i) Y が、876 である、発現カセット。

(項目 13) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該 X 個連続したヌクレオチドが、配列番号 62 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90 % のパーセント同一性を有し、(i i) X が、Y と等しく、そして (i i i) Y が、3015 である、発現カセット。

(項目 14) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該 X 個連続したヌクレオチドが、配列番号 103 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90 % のパーセント同一性を有し、(i i) X が、Y と等しく、そして (i i i) Y が、3009 である、発現カセット。

(項目 15) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該 X 個連続したヌクレオチドが、配列番号 64 または配列番号 66 の Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90 % のパーセント同一性を有し、(i i) X が、Y と等しく、そして (i i i) Y が、297 である、発現カセット。

(項目 16) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットで

10

20

30

40

50

あって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号68のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、1965である、発現カセット。

(項目17) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号70のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、1977である、発現カセット。

(項目18) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号72または配列番号105のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、少なくとも30である、発現カセット。

(項目19) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目18に記載の発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号72または配列番号105のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、75である、発現カセット。

(項目20) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号74または107のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、少なくとも30である、発現カセット。

(項目21) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目20に記載の発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号74または配列番号107のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、246である、発現カセット。

(項目22) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号76のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、1680である、発現カセット。

(項目23) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号78のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、1668である、発現カセット。

(項目24) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号80、配列番号81または配列番号109のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、216である、発現カセット。

(項目25) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号83のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、93である、発現カセット。

(項目26) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号111のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、90である、発現カセット。

(項目27) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号85または配列番号113のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

(項目 39) X 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目 38 に記

載の発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号119、配列番号120；配列番号121；配列番号122；配列番号123；配列番号124；配列番号125；配列番号126；配列番号127；配列番号131；配列番号132または配列番号133のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、少なくとも300である、発現カセット。

(項目40) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目39に記載の発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号123または配列番号124のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、2433である、発現カセット。

(項目41) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目39に記載の発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号122のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、2301である、発現カセット。

(項目42) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目39に記載の発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号125のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、2517である、発現カセット。

(項目43) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目39に記載の発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号126または配列番号127のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、2520である、発現カセット。

(項目44) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目39に記載の発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号119のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、1377である、発現カセット。

(項目45) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目39に記載の発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号120または配列番号121のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、1839である、発現カセット。

(項目46) X個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む、項目39に記載の発現カセットであって、ここで、(i) 該X個連続したヌクレオチドが、配列番号132または配列番号133のY個連続したヌクレオチドに対して少なくとも90%のパーセント同一性を有し、(ii) Xが、Yと等しく、そして(iii) Yが、1890である、発現カセット。

(項目47) 配列番号33に示される配列またはそれから誘導されるフラグメントを含む、ポリヌクレオチド。

(項目48) 項目47に記載のポリヌクレオチドであって、ここで、前記フラグメントが、G a g、P o l、V i f、V p r、T a t、R e v、V p u、E n vおよびN e fからなる群より選択される遺伝子産物についてのコード配列を含む、ポリヌクレオチド。

(項目49) 前記フラグメントが、G a g遺伝子産物を含む、項目48に記載のポリヌクレオチド。

(項目50) 前記フラグメントが、E n v遺伝子産物を含む、項目48に記載のポリヌクレオチド。

(項目51) 前記E n v遺伝子産物が、g p l 6 0、g p l 4 0またはg p l 2 0である、項目50に記載のポリヌクレオチド。

(項目52) 配列番号45に示される配列またはそれから誘導されるフラグメントを含む

10

20

30

40

50

む、ポリヌクレオチド。

(項目53) 項目52に記載のポリヌクレオチドであって、ここで、前記フラグメントが、G a g、P o l、V i f、V p r、T a t、R e v、V p u、E n vおよびN e fからなる群より選択される遺伝子産物についてのコード領域を含む、ポリヌクレオチド。

(項目54) 前記フラグメントが、G a g遺伝子産物を含む、項目53に記載のポリヌクレオチド。

(項目55) 前記フラグメントが、E n v遺伝子産物を含む、項目53に記載のポリヌクレオチド。

(項目56) 前記E n v遺伝子産物が、g p l 6 0、g p l 4 0またはg p l 2 0である、項目55に記載のポリヌクレオチド。

(項目57) 配列番号128に示される配列またはそれから誘導されるフラグメントを含む、ポリヌクレオチド。

(項目58) 前記フラグメントが、E n v遺伝子産物g p l 6 0、g p l 4 0またはg p l 2 0についてのコード配列を含む、項目57に記載のポリヌクレオチド。

(項目59) 1つ以上のウイルスポリペプチドまたは抗原をコードする1つ以上の核酸をさらに含む、項目1～46のいずれか1項に記載の発現カセット。

(項目60) 前記ウイルスポリペプチドまたは抗原が、G a g、E n v、v i f、v p r、t a t、r e v、v p u、n e fおよびその組み合わせからなる群より選択される、項目59に記載の発現カセット。

(項目61) 1つ以上のサイトカインをコードする1つ以上の核酸をさらに含む、項目1～46のいずれかに記載の発現カセット。

(項目62) 項目1～46のいずれかに記載の発現カセットを含む、選択された宿主細胞における使用のための組換え発現系であって、前記ポリヌクレオチド配列が、該選択された宿主細胞における発現を駆動し得る制御エレメントをさらに含む、組換え発現系。

(項目63) 項目62に記載の組換え発現系であって、ここで、前記制御エレメントが、転写プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写終止シグナル、ポリアデニル化配列、翻訳の開始を最適化するための配列、および翻訳終止配列からなる群より選択される、組換え発現系。

(項目64) 項目62に記載の組換え発現系であって、ここで、前記転写プロモーターが、C M V、C M V+イントロンA、S V 4 0、R S V、H I V-L t r、M M L V-L t r、およびメタロチオネインからなる群より選択される、組換え発現系。

(項目65) 項目1～46のいずれかに記載の発現カセットを含む細胞であって、ここで、前記ポリヌクレオチド配列が、該選択された細胞における発現と適合性の制御エレメントをさらに含む、細胞。

(項目66) 前記細胞が、哺乳動物細胞、昆虫細胞、細菌細胞、酵母細胞、植物、抗原提示細胞、一次細胞、不死化細胞、および腫瘍由来の細胞からなる群より選択される、項目65に記載の細胞。

(項目67) 前記細胞が、B H K細胞、V E R O細胞、H T 1 0 8 0細胞、2 9 3細胞、R D細胞、C O S-7細胞、およびC H O細胞からなる群より選択される、項目66に記載の細胞。

(項目68) 前記細胞が、C H O細胞である、項目67に記載の細胞。

(項目69) 前記細胞が、T r i c h o p l u s i a n i (T n 5)またはS f 9昆虫細胞のいずれかである、項目66に記載の細胞。

(項目70) 前記抗原提示細胞が、マクロファージ、単球、樹状細胞、B細胞、T細胞、幹細胞、およびその前駆細胞からなる群より選択されるリンパ系細胞である、項目66に記載の細胞。

(項目71) 項目1～46のいずれかに記載の発現カセットを含む、免疫学的応答を生じるための組成物。

(項目72) 1つ以上のP o lポリペプチドをさらに含む、項目71に記載の組成物。

(項目73) アジュバントをさらに含む、項目72に記載の組成物。

10

20

30

40

50

(項目 7 4) 項目 5 2 に記載の発現カセットを含む、免疫学的応答を生じるための組成物。

(項目 7 5) P o l ポリペプチドをさらに含む、項目 7 4 に記載の組成物。

(項目 7 6) 項目 6 0 に記載の核酸分子によってコードされる 1 つ以上のポリペプチドをさらに含む、項目 7 4 に記載の組成物。

(項目 7 7) アジュバントをさらに含む、項目 7 6 に記載の組成物。

(項目 7 8) 被験体の免疫方法であって、該方法は、項目 7 1 に記載の組成物を、該被験体における前記発現カセットの発現と適合性である条件下で該被験体に導入する工程を包含する、方法。

(項目 7 9) 前記発現カセットが、遺伝子送達ベクターを使用して導入される、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 0) 前記遺伝子送達ベクターが、非ウイルスベクターである、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 1) 前記遺伝子送達ベクターが、ウイルスベクターである、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 2) 前記遺伝子送達ベクターが、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、A A V ベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、およびアルファウイルスベクターからなる群より選択される、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 3) 前記遺伝子送達ベクターが、シンドビスウイルス由来のベクターである、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 4) 前記遺伝子送達ベクターが、c D N A ベクターである、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 5) 前記遺伝子送達ベクターが、真核生物の層状ウイルス開始系 (E L V I S) である、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 6) 前記組成物が、粒子キャリアを使用して送達される、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 7) 前記組成物が、金またはタングステンの粒子上にコーティングされ、そして該コーティングされた粒子が、遺伝子銃を使用して前記被験体に送達される、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 8) 前記組成物が、リポソーム調製物にカプセル化されている、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 9) 前記被験体が、哺乳動物である、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 9 0) 前記哺乳動物が、ヒトである、項目 8 9 に記載の方法。

(項目 9 1) 被験体における免疫応答を生じる方法であって、該方法は、以下：

項目 1 ～ 4 6 のいずれかに記載の発現カセットを提供する工程、

適切な宿主細胞中で前記ポリペプチドを発現する工程、

該ポリペプチドを単離する工程、および

該ポリペプチドを、免疫応答を惹起するのに十分な量で該被験体に投与する工程、を包含する、方法。

(項目 9 2) 被験体における免疫応答を生じる方法であって、該方法は、該被験体の細胞に、項目 1 ～ 4 6 のいずれか 1 項に記載の発現カセットを、前記ポリヌクレオチドの発現および前記ポリペプチドの産生を可能にする条件下で導入し、これによって該ポリペプチドに対する免疫学的応答を誘発する工程を包含する、方法。

(項目 9 3) 前記方法が、H I V ポリペプチドの同時投与を包含する、項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 4) 前記被験体への前記ポリペプチドの同時投与が、前記発現カセットの導入の前に行われる、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 5) 前記被験体への前記ポリペプチドの同時投与が、前記発現カセットの導入と同時に進行される、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 6) 前記被験体への前記ポリペプチドの同時投与が、前記発現カセットの導入

10

20

30

40

50

の後に行われる、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 7) 前記ウイルスポリペプチドまたは抗原が、B 型肝炎由来のポリペプチド、C 型肝炎由来のポリペプチド、およびその組み合わせからなる群より選択される、項目 5 9 に記載の発現カセット。

本発明のこれらおよび他の実施形態は、本明細書中の開示の点から、当業者に容易に思い浮かぶことである。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図 1】図 1 (配列番号 3) は、合成 G a g ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。示されるヌクレオチド配列は、C 型 A F 1 1 0 9 6 5 株を改変することによって得られ、I N S のさらなる改変を含む。

【図 2】図 2 (配列番号 4) は、合成 G a g ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。示されるヌクレオチド配列は、C 型 A F 1 1 0 9 6 7 株を改変することによって得られ、I N S のさらなる改変を含む。

【図 3】図 3 (配列番号 9) は、合成 E n v ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。このヌクレオチド配列は、g p 1 6 0 (シグナルペプチドを含む) を示し、C 型 A F 1 1 0 9 6 8 株を改変することによって得られた。矢印は、種々の領域のポリヌクレオチドの位置を示しており、これらとしては、以下をコードする配列が挙げられる：シグナルペプチド (ヌクレオチド 1 ~ 8 1) (配列番号 1 8)、g p 1 2 0 ポリペプチド (ヌクレオチド 8 2 ~ 1 5 1 2) (配列番号 6)、g p 4 1 ポリペプチド (ヌクレオチド 1 5 1 3 ~ 2 5 4 7) (配列番号 1 0)、g p 1 4 0 ポリペプチド (ヌクレオチド 8 2 ~ 2 0 2 5) (配列番号 7) および g p 1 6 0 ポリペプチド (ヌクレオチド 8 2 ~ 2 5 4 7) (配列番号 8)。シグナルペプチドをコードするコドンは、ネイティブの H I V - 1 シグナル配列から (本明細書中に記載されるように) 改変される。

【図 4】図 4 (配列番号 1 5) は、合成 E n v ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。このヌクレオチド配列は、g p 1 6 0 (シグナルペプチドを含む) を示し、C 型 A F 1 1 0 9 7 5 株を改変することによって得られた。矢印は、種々の領域のポリヌクレオチドの位置を示しており、これらとしては、以下をコードする配列が挙げられる：シグナルペプチド (ヌクレオチド 1 ~ 7 2) (配列番号 1 9)、g p 1 2 0 ポリペプチド (ヌクレオチド 7 3 ~ 1 5 0 9) (配列番号 1 2)、g p 4 1 ポリペプチド (ヌクレオチド 1 5 1 0 ~ 2 5 6 5) (配列番号 1 6)、g p 1 4 0 ポリペプチド (ヌクレオチド 7 3 ~ 2 0 2 2) (配列番号 1 3) および g p 1 6 0 ポリペプチド (ヌクレオチド 7 3 ~ 2 5 6 5) (配列番号 1 4)。シグナルペプチドをコードするコドンは、ネイティブの H I V - 1 シグナル配列から (本明細書中に記載されるように) 改変される。

【図 5】図 5 は、A F 1 1 0 9 6 5 から誘導された合成 G a g 配列における、いくつかの残存する I N S の位置を示している。これらの配列に対してなされた変化が、図中で囲まれている。上の列は、示された株由来の G a g ポリペプチドの、コドンを改変された配列 (配列番号 2 0) を示している。囲んだ領域中の列の下に現れるヌクレオチドは、さらなる I N S を取り除かれ、かつ図 1 に示される配列 (配列番号 3) に対応するようになされた変化を示している。

【図 6】図 6 は、A F 1 1 0 9 6 7 から誘導された合成 G a g 配列における、いくつかの残存する I N S の位置を示している。これらの配列に対してなされた変化が、図中で囲まれている。上の列は、示された株由来の G a g ポリペプチドの改変された配列 (配列番号 2 1) を示している。囲んだ領域中の系列の下に現れるヌクレオチドは、さらなる I N S を取り除かれ、かつ図 2 に示される配列 (配列番号 4) に対応するようになされた変化を示している。

【図 7】図 7 は、H I V の P o l 領域における、選択されたドメインを示した概略図である。

【図 8】図 8 (配列番号 3 0) は、P R 9 7 5 (+) と表される合成構築物のヌクレオチド配列を示している。「(+)」は、逆転写が機能的であることを示している。この構築

10

20

30

40

50

物としては、以下由来の配列が挙げられる：p 2（配列番号 30 のヌクレオチド 16～54）；p 7（配列番号 30 のヌクレオチド 55～219）；p 1／p 6（配列番号 30 のヌクレオチド 220～375）；p r o t（配列番号 30 のヌクレオチド 376～672）、逆転写酵素（配列番号 30 のヌクレオチド 673～2352）；および図 7 に示される 6 のアミノ酸のインテグラーゼ（配列番号 30 のヌクレオチド 2353～2370）。さらに、この構築物は、導入遺伝子および Y M D D エピトープカセット（配列番号 30 のヌクレオチド 2371～2424）を挿入するための複数のクローニング部位（M C S、配列番号 30 のヌクレオチド 2425～2463）を含む。

【図 9】図 9（配列番号 31）は、P R 9 7 5 Y M と表される合成構築物のヌクレオチド配列を示している。図 7 に示されるように、R T 領域は、触媒中心における変異（m u t . c a t . c e n t e r）を含んでいる。「Y M」とは、ヌクレオチドがこの領域において、Y M D D ではなくアミノ酸 A P をコードする構築物をいう。逆転写酵素は、この構築物において機能的ではない。この構築物としては、P 2（配列番号 31 のヌクレオチド 16～54）；p 7（配列番号 31 のヌクレオチド 55～219）；p 1／p 6（配列番号 31 のヌクレオチド 220～375）；p r o t（配列番号 31 のヌクレオチド 376～672）、および図 7 に示される逆転写酵素（配列番号 31 のヌクレオチド 673～2346）由来の配列が挙げられるが、逆転写酵素タンパク質は、機能的ではない。さらに、この構築物は、導入遺伝子および Y M D D エピトープカセット（配列番号 31 のヌクレオチド 2365～2418）を挿入するための複数のクローニング部位（M C S、配列番号 31 のヌクレオチド 2419～2457）を含む。

【図 10】図 10（配列番号 32）は、P R 9 7 5 Y M W M と表される合成構築物のヌクレオチド配列を示している。「Y M」とは、ヌクレオチドがこの領域において、Y M D D ではなくアミノ酸 A P をコードする構築物をいう。「W M」とは、ヌクレオチドがこの領域において、W M G Y ではなくアミノ酸 P I をコードする構築物をいう。この構築物としては、p 2（配列番号 32 のヌクレオチド 16～54）；p 7（配列番号 32 のヌクレオチド 55～219）；p 1／p 6（配列番号 32 のヌクレオチド 220～375）；p r o t（配列番号 32 のヌクレオチド 376～672）、および図 7 に示される逆転写酵素（配列番号 32 のヌクレオチド 673～2340）由来の配列が挙げられるが、逆転写酵素タンパク質は、機能的ではない。さらに、この構築物は、導入遺伝子および Y M D D エピトープカセット（配列番号 32 のヌクレオチド 2359～2412）を挿入するための複数のクローニング部位（M C S、配列番号 32 のヌクレオチド 2413～2451）を含む。

【図 11-1】図 11（配列番号 33）は、8__5__T V 1__C. Z A のヌクレオチド配列を示す。種々の領域を、表 A に示す。

【図 11-2】図 11（配列番号 33）は、8__5__T V 1__C. Z A のヌクレオチド配列を示す。種々の領域を、表 A に示す。

【図 11-3】図 11（配列番号 33）は、8__5__T V 1__C. Z A のヌクレオチド配列を示す。種々の領域を、表 A に示す。

【図 11-4】図 11（配列番号 33）は、8__5__T V 1__C. Z A のヌクレオチド配列を示す。種々の領域を、表 A に示す。

【図 12】図 12（配列番号 34）は、p 2 g a g から p 7 g a g までの、A F 1 1 0 9 7 5 P o l の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 13】図 13（配列番号 35）は、p 1 からインテグラーゼタンパク質の最初の 6 アミノ酸の、A F 1 1 0 9 7 5 P o l の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 14】図 14（配列番号 36）は、逆転写酵素の I l e 1 7 8 ～セリン 1 9 1 をコードするカセットのヌクレオチド配列を示す。

【図 15】図 15（配列番号 37）は、逆転写酵素タンパク質の触媒中心領域中のエピトープを含むアミノ酸配列を示す。

【図 16-1】図 16（配列番号 45）は、1 2 - 5__1__T V 2__C. Z A のヌクレオチド配列を示す。

10

20

30

40

50

【図 1 6 - 2】図 1 6（配列番号 4 5）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C. Z A のヌクレオチド配列を示す。

【図 1 6 - 3】図 1 6（配列番号 4 5）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C. Z A のヌクレオチド配列を示す。

【図 1 6 - 4】図 1 6（配列番号 4 5）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C. Z A のヌクレオチド配列を示す。

【図 1 6 - 5】図 1 6（配列番号 4 5）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C. Z A のヌクレオチド配列を示す。

【図 1 7】図 1 7（配列番号 4 6）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A 由来の合成 E n v コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この配列は、短い（9 7 塩基対）共通領域に対応する。

【図 1 8】図 1 8（配列番号 4 7）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A 由来の合成 E n v コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この配列は、E n v 中の共通領域に対応する。

【図 1 9】図 1 9（配列番号 4 8）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A E n v の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 2 0】図 2 0（配列番号 4 9）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A 由来の合成 E n v g p 1 6 0 コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 2 1】図 2 1（配列番号 5 0）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A E n v g p 1 6 0 の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 2 2】図 2 2（配列番号 5 1）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A 由来の合成 G a g コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 2 3】図 2 3（配列番号 5 2）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A G a g の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 2 4】図 2 4（配列番号 5 3）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A 由来の合成 G a g コードポリヌクレオチド（主要な相同性領域）のヌクレオチド配列を示す。

【図 2 5】図 2 5（配列番号 5 4）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A G a g 主要相同性領域の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 2 6】図 2 6（配列番号 5 5）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A 由来の合成 N e f コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 2 7】図 2 7（配列番号 5 6）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A N e f の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 2 8】図 2 8（配列番号 5 7）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A 由来の合成 N e f コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この配列は、非機能遺伝子産物を生じる 1 2 5 位における変異を含む。

【図 2 9】図 2 9（配列番号 5 8）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A 由来の合成 R N A s e H コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。R n a s e H は、P o l 遺伝子の機能的ドメインであり、p 1 5 に対応する（表 A）。

【図 3 0】図 3 0（配列番号 5 9）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A R N A s e H の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 3 1】図 3 1（配列番号 6 0）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A 由来の合成 インテグラーゼ（I n t）コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。I n t は、P o l 遺伝子の機能的ドメインであり、p 3 1 に対応する（表 A）。

【図 3 2】図 3 2（配列番号 6 1）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A I n t の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 3 3】図 3 3（配列番号 6 2）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A 由来の合成 P o l コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 3 4】図 3 4（配列番号 6 3）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A P o l の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 3 5】図 3 5（配列番号 6 4）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C. Z A 由来の合成 プロテアー

10

20

30

40

50

ゼ (p r o t) コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 3 6】図 3 6 (配列番号 6 5) は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A P r o t の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 3 7】図 3 7 (配列番号 6 6) は、プロテアーゼの不活性化を生じる変異を含む、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成プロテアーゼ (p r o t) コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 3 8】図 3 8 (配列番号 6 7) は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 不活性化 P r o t の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 3 9】図 3 9 (配列番号 6 8) は、共に 8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来である、合成プロテアーゼ (p r o t) コードポリヌクレオチドおよび合成逆転写酵素 (R T) コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。P r o t 配列および R T 配列は、共に、遺伝子産物の不活性化を生じる変異を含む。

【図 4 0】図 4 0 (配列番号 6 9) は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 不活性化 P r o t / 変異 R T の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 4 1】図 4 1 (配列番号 7 0) は、共に 8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来である、合成プロテアーゼ (p r o t) コードポリヌクレオチドおよび合成逆転写酵素 (R T) コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 4 2】図 4 2 (配列番号 7 1) は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A P r o t および R T の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 4 3】図 4 3 (配列番号 7 2) は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 r e v コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この示した合成配列は、r e v のエキソン 1 に対応する。野生型 r e v は、2 つのエキソンを有する。

【図 4 4】図 4 4 (配列番号 7 3) は、R e v の 8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A エキソン 1 の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 4 5】図 4 5 (配列番号 7 4) は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 r e v コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この示した合成配列は、r e v のエキソン 2 に対応する。

【図 4 6】図 4 6 (配列番号 7 5) は、R e v の 8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A エキソン 2 の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 4 7】図 4 7 (配列番号 7 6) は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 R T コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 4 8】図 4 8 (配列番号 7 7) は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A R T の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 4 9】図 4 9 (配列番号 7 8) は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 R T コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この合成ポリヌクレオチドは、遺伝子産物を不活性にする R T コード配列中の変異を含む。

【図 5 0】図 5 0 (配列番号 7 9) は、R T 遺伝子産物を不活性化する変異を含む、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A R T の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 5 1】図 5 1 (配列番号 8 0) は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 T a t コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この示した合成配列は、T a t のエキソン 1 に対応し、さらに、T a t 遺伝子産物を非機能的にする変異を含む。野生型 T a t は、2 つのエキソンを有する。

【図 5 2】図 5 2 (配列番号 8 1) は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 T a t コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。示した合成配列は、T a t のエキソン 1 に対応する。

【図 5 3】図 5 3 (配列番号 8 2) は、T a t の 8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A エキソン 1 の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 5 4】図 5 4 (配列番号 8 3) は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 T a t コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。示した合成配列は、T a t のエキソン 2 に対応する。

10

20

30

40

50

【図 5 5】図 5 5（配列番号 8 4）は、T a t の 8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A エキソン 2 の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 5 6】図 5 6（配列番号 8 5）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 V i f コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 5 7】図 5 7（配列番号 8 6）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A V i f の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 5 8】図 5 8（配列番号 8 7）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 V p r コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 5 9】図 5 9（配列番号 8 8）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A V p r の野生型ヌクレオチド配列を示す。

10

【図 6 0】図 6 0（配列番号 8 9）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 V p u コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 6 1】図 6 1（配列番号 9 0）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A V p u の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 6 2】図 6 2（配列番号 9 1）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 r e v コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この示した合成配列は、r e v のエキソン 1 および 2 に対応する。

【図 6 3】図 6 3（配列番号 9 2）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の r e v のエキソン 1 および 2 の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 6 4】図 6 4（配列番号 9 3）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 T a t コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この合成ポリヌクレオチドは、T a t のエキソン 1 および 2 の両方を含み、そしてさらに、この遺伝子産物を非機能的にするエキソン 1 中の変異を含む。

20

【図 6 5】図 6 5（配列番号 9 4）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 T a t コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この合成ポリヌクレオチドは、T a t のエキソン 1 および 2 の両方を含む。

【図 6 6】図 6 6（配列番号 9 5）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の T a t のエキソン 1 および 2 の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 6 7】図 6 7（配列番号 9 6）は、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 由来の合成 N e f コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この配列は、非機能的遺伝子産物を生じる 1 2 5 位の変異および N e f 遺伝子産物のミリストイル化を排除する変異を含む。

30

【図 6 8】図 6 8（配列番号 9 7）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 由来の合成 E n v g p 1 6 0 コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 6 9】図 6 9（配列番号 9 8）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 由来の E n v g p 1 6 0 の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 7 0】図 7 0（配列番号 9 9）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 由来の合成 G a g コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 7 1】図 7 1（配列番号 1 0 0）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 由来の G a g の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 7 2】図 7 2（配列番号 1 0 1）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 由来の合成 N e f コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

40

【図 7 3】図 7 3（配列番号 1 0 2）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 由来の N e f の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 7 4】図 7 4（配列番号 1 0 3）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 由来の合成 P o l コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 7 5】図 7 5（配列番号 1 0 4）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 由来の P o l の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図 7 6】図 7 6（配列番号 1 0 5）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 由来の R e v のエキソン 1 由来の合成 R e v コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図 7 7】図 7 7（配列番号 1 0 6）は、1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 由来の R e v

50

のエキソン1の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図78】図78（配列番号107）は、12-5__1__TV2__C。ZA由来のRevのエキソン2由来の合成Revコードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図79】図79（配列番号108）は、12-5__1__TV2__C。ZA由来のRevのエキソン2の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図80】図80（配列番号109）は、12-5__1__TV2__C。ZA由来のTatエキソン1由来の、合成Tatコードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図81】図81（配列番号110）は、12-5__1__TV2__C。ZA由来のTatのエキソン1の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図82】図82（配列番号111）は、12-5__1__TV2__C。ZA由来のTatエキソン2由来の、合成Tatコードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図83】図83（配列番号112）は、12-5__1__TV2__C。ZA由来のTatのエキソン2の野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図84】図84（配列番号113）は、12-5__1__TV2__C。ZA由来の合成Vifコードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図85】図85（配列番号114）は、12-5__1__TV2__C。ZA由来のVifの野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図86】図86（配列番号115）は、12-5__1__TV2__C。ZA由来の合成Vprコードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図87】図87（配列番号116）は、12-5__1__TV2__C。ZA由来のVprの野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図88】図88（配列番号117）は、12-5__1__TV2__C。ZA由来の合成Vpuコードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

【図89】図89（配列番号118）は、12-5__1__TV2__C。ZA由来のVpuの野生型ヌクレオチド配列を示す。

【図90】図90（配列番号119）は、8__2__TV1__C。ZA由来の合成Env gp120コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。V2領域は、欠失している。この配列は、EcoRI制限部位（ヌクレオチド1～6）；コドン改変されたシグナルペプチドリーダー配列（ヌクレオチド7～87）；gp120コード配列（ヌクレオチド88～1464）；終止コドン（ヌクレオチド1465～1467）；XhoI制限部位（ヌクレオチド1468～1473）を含む。

【図91】図91（配列番号120）は、8__2__TV1__C。ZA由来の合成Env gp140コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。V2領域は、欠失している。この配列は、EcoRI制限部位（ヌクレオチド1～6）；改変シグナルペプチドリーダー配列（ヌクレオチド7～87）；gp140コード配列（ヌクレオチド88～1977）；終止コドン（ヌクレオチド1978～1980）；XhoI制限部位（ヌクレオチド1981～1986）を含む。

【図92】図92（配列番号121）は、8__2__TV1__C。ZA由来の合成Env gp140コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。V2領域は、欠失し、この配列は、gp140ポリペプチドのgp120ポリペプチドおよびgp41ポリペプチドへの切断を予防する切断部位中の変異を含む。この配列は、EcoRI制限部位（ヌクレオチド1～6）；改変シグナルペプチドリーダー配列（ヌクレオチド7～87）；gp140コード配列（ヌクレオチド88～1977）；終止コドン（ヌクレオチド1978～1980）；XhoI制限部位（ヌクレオチド1981～1986）を含む。

【図93】図93（配列番号122）は、8__2__TV1__C。ZA由来の合成Env gp160コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。V1/V2領域は、欠失している。この配列は、EcoRI制限部位（ヌクレオチド1～6）；改変シグナルペプチドリーダー配列（ヌクレオチド7～87）；gp160コード配列（ヌクレオチド88～2388）；終止コドン（ヌクレオチド2389～2391）；XhoI制限部位（ヌクレオチド2392～2397）を含む。

10

20

30

40

50

【図 9 4】図 9 4（配列番号 1 2 3）は、8__2__TV1__C. Z A 由来の合成 Env g p 1 6 0 コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。V 2 領域は、欠失している。この配列は、E c o R I 制限部位（ヌクレオチド 1～6）；改変シグナルペプチドリーダー配列（ヌクレオチド 7～8 7）；g p 1 6 0 コード配列（ヌクレオチド 8 8～2 5 2 0）；終止コドン（ヌクレオチド 2 5 2 1～2 5 2 3）；X h o I 制限部位（ヌクレオチド 2 5 2 4～2 5 2 9）を含む。

【図 9 5】図 9 5（配列番号 1 2 4）は、8__2__TV1__C. Z A 由来の合成 Env g p 1 6 0 コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。V 2 領域は、欠失し、そして切断部位が変異している。この配列は、E c o R I 制限部位（ヌクレオチド 1～6）；改変シグナルペプチドリーダー配列（ヌクレオチド 7～8 7）；g p 1 6 0 コード配列（ヌクレオチド 8 8～2 5 2 0）；終止コドン（ヌクレオチド 2 5 2 1～2 5 2 3）；X h o I 制限部位（ヌクレオチド 2 5 2 4～2 5 2 9）を含む。

10

【図 9 6】図 9 6（配列番号 1 2 5）は、8__2__TV1__C. Z A 由来の合成 Env g p 1 6 0 コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。このヌクレオチド配列は、T P A 1 リーダー配列を含む。この配列は、S a l I 制限部位（ヌクレオチド 1～6）；コザック配列（ヌクレオチド 7～1 2）；T P A 1 シグナルペプチドリーダー配列（ヌクレオチド 1 3～8 7）；g p 1 6 0 コード配列（ヌクレオチド 8 8～2 6 0 4）；終止コドン（ヌクレオチド 2 6 0 5～2 6 0 7）；X h o I 制限部位（ヌクレオチド 2 6 0 8～2 6 1 3）を含む。

【図 9 7】図 9 7（配列番号 1 2 6）、8__2__TV1__C. Z A 由来の合成 Env g p 1 6 0 コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この配列は、E c o R I 制限部位（ヌクレオチド 1～6）；改変シグナルペプチドリーダー配列（ヌクレオチド 7～8 7）；g p 1 6 0 コード配列（ヌクレオチド 8～2 6 0 7）；終止コドン（ヌクレオチド 2 6 0 8～2 6 1 0）；X h o I 制限部位（ヌクレオチド 2 6 1 1～2 6 1 6）を含む。

20

【図 9 8】図 9 8（配列番号 1 2 7）は、8__2__TV1__C. Z A 由来の合成 Env g p 1 6 0 コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。このヌクレオチド配列は、野生型リーダー配列を含む。この配列は、E c o R I 制限部位（ヌクレオチド 1～6）；ネイティブ（未改変）シグナルペプチドリーダー配列（ヌクレオチド 7～8 7）；g p 1 6 0 コード配列（ヌクレオチド 8 8～2 6 0 7）；終止コドン（ヌクレオチド 2 6 0 8～2 6 1 0）；X h o I 制限部位（ヌクレオチド 2 6 1 1～2 6 1 6）を含む。

30

【図 9 9】図 9 9（配列番号 1 2 8）は、8__2__TV1__C. Z A. 由来の野生型 g p 1 6 0 のヌクレオチド配列を示す。

【図 1 0 0】図 1 0 0（配列番号 1 3 1）は、8__2__TV1__C. Z A. 由来の合成 Env g p 1 4 0 コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。このヌクレオチド配列は、T P A 1 リーダー配列（ヌクレオチド 1～7 5）；g p 1 4 0 コード配列（ヌクレオチド 7 6～2 0 4 9）；終止コドン（ヌクレオチド 2 0 5 0～2 0 5 2）；を含む。

【図 1 0 1】図 1 0 1（配列番号 1 3 2）は、8__2__TV1__C. Z A. 由来の合成 g p 1 4 0 コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。このヌクレオチド配列は、E c o R I 制限部位（ヌクレオチド 1～6）；TV1__C. Z A 野生型リーダー配列から改変されたリーダー配列（ヌクレオチド 7～8 7）；g p 1 4 0 コード配列（ヌクレオチド 8 8～2 0 6 4）；終止コドン（ヌクレオチド 2 0 6 5～2 0 6 7）；X h o I 制限部位（ヌクレオチド 2 0 6 8～2 0 7 3）；を含む。

40

【図 1 0 2】図 1 0 2（配列番号 1 3 3）は、8__2__TV1__C. Z A. 由来の合成 g p 1 4 0 コードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。このヌクレオチド配列は、野生型 TV1__C. Z A 非改変リーダー配列を含む。このヌクレオチド配列は、制限部位（ヌクレオチド 1～6）；野生型リーダー配列（ヌクレオチド 7～8 7）；g p 1 4 0 コード配列（ヌクレオチド 8 8～2 0 6 4）；終止コドン（ヌクレオチド 2 0 6 5～2 0 6 7）；X h o I 制限部位（ヌクレオチド 2 0 6 8～2 0 7 3）；を含む。

【図 1 0 3】図 1 0 3（配列番号 1 3 4）は、1 2-5__1__TV2__C. Z A. 由来の

50

合成Nefコードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この配列は、非機能的遺伝子産物を生じる位置125の変異を含む。

【図104】図104（配列番号135）は、12-5__1__TV2__C. Z A. 由来の合成Nefコードポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。この合成ポリヌクレオチドは、Nef遺伝子産物のミリストイル化部位を排除する変異を含む。

【図105A】図105は、種々のHIV単離体由来のEnvポリペプチドの整列を示す。矢印の間の領域は、欠失および／または短縮され得るβおよび／または架橋シート領域における（TV1クローンおよびTV2クローンの）領域を示す。「*」は、（TV1クローンおよびTV2クローンの）N連結グリコシル化部位を意味する。その1つ以上が改変（例えば、欠失および／または変異）され得る。

10

【図105B】図105は、種々のHIV単離体由来のEnvポリペプチドの整列を示す。矢印の間の領域は、欠失および／または短縮され得るβおよび／または架橋シート領域における（TV1クローンおよびTV2クローンの）領域を示す。「*」は、（TV1クローンおよびTV2クローンの）N連結グリコシル化部位を意味する。その1つ以上が改変（例えば、欠失および／または変異）され得る。

【図105C】図105は、種々のHIV単離体由来のEnvポリペプチドの整列を示す。矢印の間の領域は、欠失および／または短縮され得るβおよび／または架橋シート領域における（TV1クローンおよびTV2クローンの）領域を示す。「*」は、（TV1クローンおよびTV2クローンの）N連結グリコシル化部位を意味する。その1つ以上が改変（例えば、欠失および／または変異）され得る。

20

【発明を実施するための形態】

【0036】

（発明の詳細な説明）

本発明の実施は、他で示されない限り、当業者の範囲内の、化学、生化学、分子生物学、免疫学および薬理学の従来の方法を用いる。このような技術は、文献において十分に説明される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. ColowickおよびN. Kaplan編、Academic Press, Inc.); および Handbook of Experimental Immunology, 第I~IV巻 (D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編、1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、1989); Short Protocols in Molecular Biology, 第4版 (Ausubelら編、1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Reamら編、1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series)、第二版 (Newton & Graham編、1997, Springer Verlag) を参照のこと。

30

40

本明細書中および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形、「1つの(a, an)」および「この、その(the)」は、内容が別に明確に指示されない限り、複数の対象を含む。従って、例えば、参考として「1つの抗原(an antigen)」は、このような因子の2以上の混合物を含む。

【0037】

（1. 定義）

本発明の記載において、以下の用語が用いられ、そして以下に示すように規定されることが意図される。

【0038】

本明細書において用いる場合、「合成」配列とは、C型HIVポリペプチドをコードす

50

るポリヌクレオチドであって、その発現が本明細書において記載されるように、例えば、コドン置換および阻害性配列の不活性化によって、改変されているポリヌクレオチドをいう。「野生型」または「ネイティブ」の配列とは、本明細書において用いる場合、ポリペプチドコード配列であって、それが天然に見出されるかのように本質的であるポリペプチドコード配列をいう。例えば、C型単離体において見出されるような、Gag、Pol、Vif、Vpr、Tat、Rev、Vpu、Env、および／またはNefのコード配列（例えば、AF110965、AF110967、AF110968、AF110975、8__5__TV1__C.ZA、8__2__TV1__C.ZAまたは12-5__1__TV2__C.ZA。HIVゲノムの種々の領域を、8__5__TV1__C.ZA（配列番号33）に対して番号付けをして、表Aに示す。従って、用語「Pol」は、以下のポリペプチドの1つ以上をいう：ポリメラーゼ（p6Pol）；プロテアーゼ（prot）；逆転写酵素（p66RTまたはRT）；RNAseH（p15RNAseH）；および／またはインテグラーゼ（p31IntまたはInt）。

10

【0039】

本明細書において用いる場合、用語「ウイルス様粒子」または「VLP」とは、以下にさらに考察する任意のいくつかのウイルス由来の非複製性、ウイルスシェルをいう。VLPは、一般に1つ以上のウイルスタンパク質（例えば、キャプシドタンパク質、コートタンパク質、シェルタンパク質、表面タンパク質、および／またはエンベロープタンパク質と呼ばれるタンパク質が挙げられるがこれらに限定されない）、またはこれらのタンパク質由来の粒子形成ポリペプチドから構成される。VLPは、適切な発現系におけるタンパク質の組み換え発現の際に自然に形成され得る。特定のVLPを生成するための方法は当該分野で公知であり、そして以下にさらに詳細に考察される。ウイルスタンパク質の組み換え発現後のVLPの存在は、当該分野で公知の従来の技術を用いて（例えば、顕微鏡検査（法）、X線結晶学、などによって）検出され得る。例えば、Bakerら、Biophys. J.（1991）60：1445～1456；Hagenseeら、J. Virol.（1994）68：4503～4505を参照のこと。例えば、VLPを、密度勾配遠心分離によって単離するか、および／または特徴的密度バンド形成によって同定し得る。あるいは、低温電子顕微鏡検査（法）を、問題のVLP調製物のガラス化されたサンプル上で実施し、そして適切な曝露条件下で画像を記録し得る。

20

【0040】

特定のウイルスタンパク質由来の「粒子形成ポリペプチド」とは、VLP形成を支持する条件下でVLPを形成する能力を有する、全長またはほぼ全長のウイルスタンパク質、ならびにそのフラグメント、または内部欠失を有するウイルスタンパク質を意味する。従って、このポリペプチドは、参照分子の全長配列、フラグメント、短縮配列および部分配列、ならびにアナログ形態および前駆体形態を含み得る。従って、この用語は、このポリペプチドがVLPを形成する能力を保持する限り、この配列に対して欠失、付加、および置換を意図する。従ってこの用語は、特定化されたポリペプチドの天然のバリエーションを含む。なぜならコートタンパク質におけるバリエーションがしばしば、ウイルス単離体の間で生じるからである。この用語は、このタンパク質がVLPを形成する能力を保持する限り、参照タンパク質において天然に存在しない欠失、付加、および置換を含む。好ましい置換は、事実上保存的である置換（すなわち、アミノ酸の側鎖に関連してアミノ酸のファミリー内に生じる置換）である。詳細には、アミノ酸は、一般に、以下の4つのファミリーに分類される：（1）酸性－アスパラギン酸、およびグルタミン酸；（2）塩基性－リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性－アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および（4）非荷電極性－グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、時々、芳香族アミノ酸として分類される。

30

40

【0041】

「抗原」とは、宿主の免疫系を刺激して、体液性および／または細胞性抗原特異的応答

50

を起こす1以上のエピトープ（線状、高次構造的、またはその両方のいずれか）を含む分子をいう。この用語は、用語「免疫原」と交換可能に用いられる。通常、B細胞エピトープは、少なくとも約5アミノ酸を含むが、3～4アミノ酸まで小さくても可能である。T細胞エピトープ（例えば、CTLエピトープ）は、少なくとも約7～9アミノ酸を含み、そしてヘルパーT細胞エピトープは、少なくとも約12～20アミノ酸を含む。通常、エピトープは、約7と15の間のアミノ酸（例えば、9、10、12、または15アミノ酸）を含む。用語「抗原」とは、サブユニット抗原（すなわち、その抗原が天然に関連している生物全体から分離し、区別される抗原）ならびに、殺傷されるか、弱毒化されるか、または不活性化された細菌、ウイルス、真菌、寄生生物、もしくは他の微生物の両方を示す。抗体（例えば、抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメント、および抗原または抗原決定基を模倣し得る合成ペプチドミモトープ）もまた、本明細書中で使用され得る抗原の定義に入る。同様に、例えば、遺伝子治療およびDNA免疫適用においてインビボで抗原または抗原性決定基を発現するオリゴヌクレオチドまたはポリペプチドもまた、本明細書中の抗原の定義に含まれる。

【0042】

本発明の目的のために、抗原は、以下でより十分に記載されるように、いくつかの公知のウイルス、細菌、寄生生物、および真菌に由来し得る。この用語はまた、種々の腫瘍抗原のいずれかを意図し得る。さらに、本発明の目的のために、「抗原」とは、本明細書中に定義しているように、タンパク質が免疫学的応答を誘発する能力を維持する限り、ネイティブ配列に対する改変（例えば、欠失、付加、および置換（一般的には、事実上保存性））を含むタンパク質をいう。これらの改変は、部位特異的変異誘発を通してのような意図的なものであり得るか、または抗原を産生する宿主の変異を通してのような偶然によるものであり得る。

【0043】

抗原または組成物に対する「免疫応答」は、目的の組成物中に存在する抗原に対する体液性および／または細胞性免疫応答の被験体における発生である。本発明の目的のために、「体液性免疫応答」とは、抗体分子によって媒介される免疫応答をいうが、一方、「細胞性免疫応答」は、Tリンパ球および／または他の白血球によって媒介される免疫応答である。細胞性免疫の1つの重要な局面は、細胞溶解性T細胞（「CTL」）による抗原特異的応答を含む。CTLは、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）によってコードされるタンパク質に付随して存在するペプチド抗原、および細胞表面上で発現するペプチド抗原に対する特異性を有する。CTLは、細胞内微生物の破壊の誘導および促進を補助するか、またはこのような微生物に感染した細胞の溶解を補助する。細胞性免疫の別の局面は、ヘルパーT細胞による抗原特異的応答を含む。ヘルパーT細胞は、細胞表面上でMHC分子に結合するペプチド抗原を提示する細胞に対して、その機能を刺激すること、および非特異的エフェクター細胞の活性を集中することを補助するように作用する。「細胞性免疫応答」はまた、サイトカイン、ケモカイン、および活性化されたT細胞および／または他の白血球（CD4+およびCD8+ T細胞から誘導される白血球を含む）によって産生される他のそのような分子の産生をいう。

【0044】

細胞性免疫応答を誘発する組成物またはワクチンは、細胞表面でのMHC分子と結合する抗原の提示によって、脊椎動物被験体感を感作するように働き得る。細胞媒介性免疫応答は、それらの表面で抗原を提示する細胞に、またはその細胞の近傍に方向付けられる。さらに、抗原特異的Tリンパ球は、免疫された宿主の将来の防御を可能にするために産生され得る。

【0045】

特定の抗原が細胞媒介性の免疫学的応答を刺激する能力は、多くのアッセイ（例えば、リンパ球増殖（リンパ球活性化）アッセイ、CTL細胞毒性細胞アッセイ、または感作された被験体中で抗原について特異的なTリンパ球についてアッセイすること）によって決定され得る。このようなアッセイは、当該分野で周知である。例えば、Ericson

ら、J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doeら、Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376を参照のこと。細胞媒介免疫応答を測定する最近の方法には、細胞内サイトカインまたはT細胞集団によるサイトカイン分泌の測定、またはエピトープ特異的T細胞の測定（例えば、テトラマー技術による）(McMichael, A. J. およびO'Callaghan, C. A., J. Exp. Med. 187(9):1367-1371、1998; Mcheyzer-Williams, M. G. ら、Immunol. Rev. 150:5-21、1996; Lallvani, A. ら、J. Exp. Med. 186:859-865、1997によって概説される)が含まれる。

【0046】

従って、本明細書中で使用されるような免疫学的応答は、CTLの産生および／またはヘルパーT細胞の産生または活性化を刺激するものであり得る。目的の抗原はまた、抗体媒介免疫応答を誘発し得る。従って、免疫学的応答は、以下の1つ以上の効果を含み得る：B細胞による抗体の産生；および／またはサブレッサーT細胞の活性化および／または目的の組成物もしくはワクチン中に存在する抗原に特異的に方向付けられた $\gamma\delta$ T細胞。これらの応答は、感染性を中和するように、および／または抗体-補体もしくは抗体依存性細胞毒性(ADCC)を媒介するように働き、免疫された宿主に対する防御を提供し得る。このような応答は、当該分野で周知の標準的なイムノアッセイおよび中和アッセイを用いて決定され得る。

【0047】

「免疫原性組成物」とは、被験体への組成物の投与が、目的の抗原性分子に対して体液性免疫応答および／または細胞性免疫応答のこの被験体における発生を生じる抗原性分子を含む組成物である。この免疫原性組成物は、注射投与、吸入投与、経口投与、経鼻投与、および粘膜投与（例えば、経直腸的または経膈的に）などによって、レシピエント被験体に直接導入され得る。

【0048】

「サブユニットワクチン」とは、目的の病原体由来（例えば、ウイルス、細菌、寄生物、または真菌由来）の抗原に由来するか、またはそれに対して相同な、1つ以上の選択された抗原（ただし全ての抗原ではない）を含むワクチン組成物を意味する。このような組成物は、インタクトな病原性細胞もしくは病原性粒子、またはこのような細胞もしくは粒子の溶解物を実質的に含まない。従って、「サブユニットワクチン」は、この病原体由来の、少なくとも部分的に精製された（好ましくは実質的に精製された）免疫原性ポリペプチド、またはそのアナログから調製され得る。従って、このサブユニットワクチンに含まれる抗原を得る方法は、標準的な精製技術、組み換え生成、または合成生成を含み得る。

【0049】

「実質的に精製された」とは、一般に、物質（化合物、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ポリペプチド組成物）が、サンプル（この物質が存在する）の大部分のパーセントを含むようなこの物質の単離をいう。代表的に、実質的に精製された成分は、サンプル中で、このサンプルの50%、好ましくは80~85%、より好ましくは90~95%を含む。目的のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの精製のための技術は、当該分野で周知であり、そして例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、および密度による沈降を含む。

【0050】

「コード配列」または選択されたポリペプチドを「コードする」配列とは、適切な調節配列（すなわち、「制御エレメント」）の制御下に配置された場合、インビボで転写され（DNAの場合）、そしてポリペプチドに翻訳される（mRNAの場合）、核酸分子である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドン、および3'（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンによって決定される。コード配列としては、ウイルス、原核生物のmRNAまたは真核生物のmRNA由来のcDNA、ウイルスDNAまたは原核生物DN

A由来のゲノムDNA配列、および合成DNA配列さえ挙げられるがこれらに限定されない。終止コドンのような転写終止配列は、コード配列の3'に配置され得る。

【0051】

代表的な「制御エレメント」としては、転写プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写終止シグナル、ポリアデニル化配列（翻訳終止コドンの3'側に位置する）、翻訳の開始の至適化のための配列（コード配列の5'側に位置する）、および翻訳終止配列が挙げられるがこれらに限定されない。

【0052】

「ポリヌクレオチドコード配列」、または選択されたポリペプチドを「コードする」配列とは、適切な調節配列（すなわち、「制御エレメント」）の制御下に配置された場合、インビボで転写され（DNAの場合）、そしてポリペプチドに翻訳される（mRNAの場合）、核酸分子である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドン、および3'（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンによって決定される。例示的なコード配列は、本発明の改変されたウイルスポリペプチドコード配列である。転写終止配列は、コード配列の3'に配置され得る。代表的な「制御エレメント」としては、転写調節因子（例えば、プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写終止シグナル、およびポリアデニル化配列）；および翻訳の開始の至適化のための配列のような翻訳調節因子（例えば、シャイン・ダルガーノ（リボソーム結合部位）配列、Kozak配列（すなわち、例えば、コード配列の5'側に位置する、翻訳の至適化のための配列）、リーダー配列、翻訳開始コドン（例えば、ATG）、ならびに翻訳終止配列が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、1つ以上の翻訳調節配列または開始配列（例えば、リーダー配列）が、野生型の翻訳開始配列（すなわち、ネイティブ状態でコード領域の翻訳を調節する配列）に由来する。本明細書において記載される方法を用いて改変された野生型のリーダー配列はまた、本発明における用途を見出す。プロモーターとしては、誘導性プロモーター（このプロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現は、分析物、補因子、調節性タンパク質などによって誘導される）、抑制性プロモーター（このプロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現は、分析物、補因子、調節性タンパク質などによって抑制される）、および構成的プロモーターが挙げられる。

【0053】

「核酸」分子としては、原核生物配列、真核生物mRNA、真核生物mRNA由来のcDNA、真核生物（例えば、哺乳動物）DNA由来のゲノムDNA配列、および合成DNA配列でさえ挙げられるがこれらに限定されない。この用語はまた、DNAおよびRNAの任意の既知の塩基性アナログを含む配列を包含する。

【0054】

「作動可能に連結した（された）」とは、このように記載される成分が、それらの通常の機能を実行するように構成されるエレメントの配置をいう。従って、コード配列に作動可能に連結される所定のプロモーターは、適切な酵素が存在する場合、コード配列の発現を行い得る。プロモーターは、その発現を指向するように機能する限り、コード配列と連続である必要はない。従って、例えば、翻訳されないが転写される、介在する配列は、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてプロモーター配列は、なお、コード配列に「作動可能に連結される」と考えられ得る。

【0055】

「組換え体」は、核酸分子を記載するために本明細書中で使用される場合、その起源または操作によって：（1）天然には関連していないポリヌクレオチドの全部または一部と関連していないか、および／または、（2）現実には連結されているポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドに連結している、ゲノム、cDNA、半合成、または合成起源のポリヌクレオチドを意味する。用語、「組換え体」は、タンパク質またはポリペプチドに関して使用される場合、組換えポリヌクレオチドの発現によって産生されるポリペプチドを意味する。「組み換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞株」、「細胞培養物」、および単細胞物として培養される原核生物微生物または真核生物細胞株を意味する他

のこのような用語は、互換可能に用いられ、そして組み換えベクターまたは他の転移RNAのためのレシピエントとして用いられ得るか、またはレシピエントとして用いられた細胞をいい、そしてトランスフェクトされたもとの細胞の子孫を含む。単一の親細胞の子孫は、偶発的な変異または意図的な変異に起因して、形態もしくはゲノムにおいて、またはもとの親に相補的な総DNAにおいて、完全に同一である必要はないことが理解される。関連の特性（例えば、所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列の存在）によって特徴付けられるように親に対して十分類似している親細胞の子孫は、この定義によって意図される子孫に含まれ、そして上記の用語によって包含される。

【0056】

アミノ酸配列「類似性」を決定する技術は、当該分野で周知である。一般に、「類似性」とは、2つ以上のポリペプチドの、適切な部位で比較される、アミノ酸とアミノ酸の的確さを意味し、ここで、アミノ酸は、同一であるか、または類似した化学的特性および／もしくは物理的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する。次いで、いわゆる、用語「類似パーセント」とは、比較するポリペプチド配列間で決定され得る。核酸配列およびアミノ酸配列の同一性を決定する技術もまた、当該分野で周知であって、遺伝子に対するmRNAのヌクレオチド配列を決定する工程（通常、cDNA中間物を介する）およびこれらにコードされるアミノ酸配列を決定する工程、ならびにこれを第2のアミノ酸配列と比較する工程を含む。一般に、「同一性」とは、それぞれ2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列に対応するヌクレオチドとヌクレオチドもしくはアミノ酸とアミノ酸の的確さをいう。

【0057】

2つ以上のポリヌクレオチド配列を、これらの「同一性パーセント」を決定することによって比較し得る。同様に、2つ以上のアミノ酸配列を、「同一性パーセント」を決定することによって比較し得る。核酸配列またはペプチド配列のいずれかに関わらず2つの配列の同一性パーセントは一般に、2つの整列した配列間での確に一致する数を、短い方の配列の長さで除算して、100を掛けた数字によって、記載される。核酸配列に対する適切な整列は、SmithおよびWaterman、Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981)の局所的相同性アルゴリズムにより、規定される。このアルゴリズムを拡張して、Dayhoff、Atlas of Protein Sequences and Structure (M. O. Dayhoff編、第5補遺、3:353-358、National Biomedical Research Foundation、Washington, D. C.、USA)により開発されたスコア付けマトリックスを用いて、ペプチド配列に使用し得、Gribskov、Nucl. Acids Res. 14(6):6745-6763 (1986)により基準化され得る。このアルゴリズムを核酸配列およびペプチド配列に対して実行することは、Genetics Computer Group (Madison, WI)により、これらのBestFit utilityの適用において、規定される。この方法についての初期パラメーターは、Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (Genetics Computer Group, Madison, WIから入手可能)に記載される。他の等しく適切な、配列間の同一性パーセントおよび類似パーセントを計算するプログラムは、一般に当該分野で公知である。

【0058】

例えば、特定のヌクレオチド配列の参照配列に対する同一性パーセントは、SmithおよびWatermanの相同性アルゴリズムを、6つのヌクレオチド位置の初期スコア付け表およびギャップペナルティーと共に用いて決定し得る。本発明の脈絡における、同一性パーセントを確立する別の方法は、MPSEARCHパッケージのプログラム (University of Edinburghに著作権があり、John F. CollinsおよびShane S. Sturrokにより開発され、そしてIntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA)により配布される)を用

いることである。このパッケージソフトから、S m i t h - W a t e r m a n アルゴリズムを利用し得、ここで初期パラメータをスコア付け表に使用する（例えば、12のギャップオープンペナルティー、1のギャップエクステンションペナルティーおよび6のギャップ）。生じたデータから、「一致」した値は、「配列同一性」を示す。配列間の同一性パーセントまたは類似性パーセントを計算する他の適切なプログラムは、一般に当該分野で公知であり、例えば、整列プログラムBLASTもまた初期パラメータで使用し得る。例えば、BLASTNおよびBLASTPは、以下の初期パラメータで使用され得る：g e n e t i c c o d e = s t a n d a r d ; f i l t e r = n o n e ; s t r a n d = b o t h ; c u t o f f = 6 0 ; e x p e c t = 1 0 ; M a t r i x = B L O S U M 6 2 ; D e s c r i p t i o n s = 5 0 配列 ; s o r t b y = H I G H S C O R E ; D a t a b a s e s = n o n - r e d u n d a n t , G e n B a n k + E M B L + D D B J + P D B + G e n B a n k C D S t r a n s l a t i o n s + S w i s s p r o t e i n + S p u p d a t e + P I R。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスで見出され得る：<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>。

10

【0059】

当業者は、適切な検索パラメータ（典型的には、好ましいS m i t h W a t e r m a nに基づいたパラメータが上で規定される）を容易に決定し得て、所定の配列に対して使用し得る。例えば、検索パラメータは、該当する配列の大きさに基づいて変化し得る。従って、本発明のポリヌクレオチド配列に対して、本明細書で開示されるポリヌクレオチド配列の長さは、選択されるデータベースに対して検索され、そして基本的に同じ長さの配列に対して比較して、同一性パーセントを決定する。例えば、本発明の代表的な実施形態としては、X個連続するヌクレオチドを有する単離されたポリヌクレオチドが挙げられ、ここで（i）X個連続するヌクレオチドは、少なくとも、およそ選択されたレベルの同一性パーセントを、本明細書に記載される、Y個連続するヌクレオチドの配列に関して有し、そして（ii）検索目的のために、 $X=Y$ であり、ここでYは、選択された参照ポリヌクレオチドの規定された長さである。

20

【0060】

本発明の配列としては、配列のフラグメント（例えば、約15ヌクレオチドから本明細書に記載の全長配列に存在するヌクレオチド数まで（上記の範囲の全ての整数値を含む）（例えば、配列表、図および特許請求の範囲を参照のこと））が挙げられ得る。例えば、本発明のポリヌクレオチド配列のフラグメントは、30～60ヌクレオチド、60～120ヌクレオチド、120～240ヌクレオチド、240～480ヌクレオチド、480～1000ヌクレオチドおよびこれらの間の全ての整数値のヌクレオチドであり得る。

30

【0061】

本発明の配列が、例えば配列データベースに対して問い合わせ配列として使用される場合、本発明の合成発現カセット（および精製されたポリヌクレオチド）としては、約80%～100%の配列同一性、80～85%を超える配列同一性、好ましくは90～92%を超える配列同一性、より好ましくは95%を超える配列同一性、そして最も好ましくは98%を超え100%まで（これらの記載される範囲にある全ての整数値を含む）の配列同一性を、本明細書で開示される、合成発現カセット（および精製されたポリヌクレオチド）配列（例えば、特許請求の範囲の配列または本発明の他の配列）に対して有する、関連ポリヌクレオチド配列が挙げられる。

40

【0062】

2つの核酸フラグメントは、本明細書で記載される場合、「選択的にハイブリダイズ」とみなされる。2つの核酸配列分子間の配列同一性の程度は、これらの分子間のハイブリダイゼーション事象の効率および強度に影響する。部分的に同一の核酸配列は、完全に同一の配列が標的分子にハイブリダイズするのを、少なくとも部分的に阻害する。完全に同一の配列のハイブリダイゼーションを阻害することは、当該分野で周知のハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、サザンブロット、ノザンブロット、溶液ハイブリダイゼ

50

ーションなど（Sambrookら、前出またはAusubelら、前出を参照のこと）を用いて評価し得る。このようなアッセイは、選択性の程度を変えること（例えば、低ストリンジェンシーから高ストリンジェンシーに変化する条件の利用）を利用して実施され得る。低ストリンジェンシーの条件を用いる場合、非特異的結合が存在しないことを、配列同一性を不完全な程度でさえも持っていない2次プローブ（例えば、標的分子に約30%未満の配列同一性を有するプローブ）を用いて評価し得、その結果、非特異的な結合事象が存在しない場合、この2次プローブは、標的にハイブリダイズしない。

【0063】

ハイブリダイゼーションに基づいた検出システムを利用する場合、標的核酸配列に相補的である核酸プローブが選択され、次いで、適切な条件を選択することによって、プローブと標的配列が、各々に「選択的にハイブリダイズ」、すなわち結合して、ハイブリッド分子を形成する。標的配列に、「中程度のストリンジェント」の下で選択的にハイブリダイズし得る核酸分子は、典型的に、少なくとも約70%の配列同一性を、選択された核酸プローブの配列に有する、少なくとも約10～14個のヌクレオチド長の標的核酸配列の検出が可能な条件下で、ハイブリダイズする。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、典型的に、約90～95%を超える配列同一性を、選択される核酸プローブの配列に有する、少なくとも約10～14個のヌクレオチド長の標的核酸配列の検出を可能にする。プローブ／標的のハイブリダイゼーションに有用なハイブリダイゼーション条件（プローブおよび標的は、特定の程度の配列同一性を有する）は、当該分野で公知のように決定され得る（例えば、Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, B. D. HamesおよびS. J. Higgins編（1985）Oxford; Washington, DC; IRL Pressを参照のこと）。

【0064】

ハイブリダイゼーションについてのストリンジェンシー条件に関して、多くの等価な条件を用い得て、特定のストリンジェンシーを、例えば、以下の因子を変えることで確立し得ることは、当該分野で周知である：プローブおよび標的配列の長さおよび性質、種々の配列の塩基組成、塩および他のハイブリダイゼーション溶液組成物の濃度、ハイブリダイゼーション溶液中にブロッキング因子（例えば、ホルムアミド、硫酸デキストランおよびポリエチレングリコール）が存在するかしないか、ハイブリダイゼーション反応温度および時間のパラメータ、ならびに洗浄条件の変更。特定のセットのハイブリダイゼーション条件の選択は、当該分野の標準的方法に従って選択される（例えば、Sambrookら、前出、またはAusubelら、前出を参照のこと）。

【0065】

第1のポリヌクレオチドが、第2のポリヌクレオチド、そのcDNA、これらの相補体領域と同じかもしくは実質的に同じ塩基対配列を、有する場合または第1のポリヌクレオチドが、上記のような配列同一性を示す場合に、第1のポリヌクレオチドは、第2のポリヌクレオチドに「由来」する。

【0066】

第1のポリペプチドが、（i）第2のポリヌクレオチドに由来する第1のポリヌクレオチドによってコードされる場合、または（ii）第1のポリペプチドが、上記のような配列同一性を第2のポリペプチドに対して示す場合に、第1のポリペプチドは、第2のポリペプチドに「由来」する。

【0067】

ウイルスポリペプチドが、（i）ウイルスのポリヌクレオチド（ウイルス性ポリヌクレオチド）のオープンリーディングフレームによってコードされる場合、または（ii）ウイルスポリペプチドが、上記のような配列同一性をウイルスのポリペプチドに対し示す場合に、一般に、ウイルスポリペプチドは、ウイルスの特定のポリペプチド（ウイルス性ポリペプチド）に「由来」する。

【0068】

10

20

30

40

50

「コードされる」とは、ポリペプチド配列をコードする核酸配列に関連し、ここでこのポリペプチド配列またはその一部は、この核酸配列によりコードされるポリペプチドに由来する、少なくとも3～5個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも8～10個のアミノ酸、そしてさらにより好ましくは少なくとも15～20個のアミノ酸からなる配列を含む。免疫学的にこの配列によってコードされるポリペプチドと同一視され得るポリペプチド配列もまた含まれる。さらに、ポリタンパク質は、ポリペプチドまたはペプチド産物をコードする、2つ以上のポリヌクレオチド配列をインフレーム融合することによって構築され得る。さらに、ポリシストロン (polycistronic) 配列コード配列は、互いに隣接するポリペプチド産物をコードする2つ以上のポリヌクレオチド配列を、典型的には1つのプロモーターの制御下に、配置することで産生され得、ここで各ポリペプチドコード配列は、内部リボソーム結合部位に対する配列を含むよう改変され得る。

10

【0069】

「精製されたポリヌクレオチド」とは、基本的に、目的のポリヌクレオチドと自然の状態に関連するタンパク質が除かれた（例えば、そのタンパク質の約50%未満、好ましくは約70%未満、そしてより好ましくは約90%未満を含む）、目的のポリヌクレオチドまたはそのフラグメントに関する。目的のポリヌクレオチドを精製する技術は、当該分野で周知であり、例えば、ポリヌクレオチドを含む細胞を、カオトロピック剤で破壊し、そしてポリヌクレオチドおよびタンパク質を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよび密度に依存した沈殿法により分離する工程を含む。

【0070】

「核酸免疫化」とは、1つ以上の選択された抗原をコードする核酸分子を、宿主細胞に、抗原またはエピトープのインビボ発現のため導入することを意味する。核酸分子は、レシピエント被験体中に直接導入（例えば、注射、吸入、経口投与、鼻腔内投与および粘膜投与など）され得るか、または宿主から取り出された細胞中にエキソビボ導入され得る。後者の場合に、形質転換された細胞は、被験体中に再導入され、免疫応答が、この核酸分子によってコードされる抗原に対して生じ得る。

20

【0071】

「遺伝子移入」または「遺伝子送達」とは、目的のDNAを宿主細胞に正確に挿入する方法またはシステムをいう。このような方法は、組みこまれていない移入DNAの一過性の発現、染色体外複製および移入レプリコン（例えば、エピソーム）の発現、または移入遺伝子物質の宿主細胞ゲノムDNA中への組みこみを生じ得る。遺伝子送達発現ベクターとしては、アルファウイルス、ボックスウイルスおよびワクシニアウイルス由来のベクターが挙げられるが、これらに限定されない。免疫化に用いる場合、このような遺伝子送達発現ベクターは、ワクチンまたはワクチンベクターと呼ばれ得る。

30

【0072】

「Tリンパ球」または「T細胞」は、抗体を産生しないリンパ球であり、免疫系の細胞性の備えの一部を構成する。T細胞は、骨髄から胸腺に遊走した未成熟なリンパ球から生じ、これらは、胸腺ホルモンの指令のもとで成熟過程を経ていく。ここで成熟リンパ球は、急速に分裂して、非常に多数に増加する。成熟T細胞は、特定の抗原を認識および結合する能力に基づいて、免疫応答性になる。抗原がリンパ球表面レセプター結合した場合、免疫応答性T細胞の活性化は、誘発される。

40

【0073】

用語「トランスフェクション」は、外来DNAの、細胞による取り込みを示すために使用される。外因性DNAが細胞膜内に導入された場合、細胞は、「トランスフェクト」されている。多くのトランスフェクション技術は、当該分野で一般に公知である。例えば、Grahamら、(1973) Virology, 52:456, Sambrookら、(1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davisら、(1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier、およびChuら、(1981) Gene

50

13:197を参照のこと。このような技術を用いて、1つ以上の外来DNA部分を、適切な宿主細胞中に導入し得る。この用語は、遺伝子物質の安定な取り込みおよび一過性の取り込みの両方を意味し、そしてペプチド結合DNAまたは抗体結合DNAの取り込みを含む。

【0074】

「ベクター」は、遺伝子配列を、標的細胞へ移入し得る（例えば、ウイルスベクター、非ウイルスベクター、粒子性キャリアおよびリボソーム）。典型的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」および「遺伝子移入ベクター」は、目的の遺伝子発現を指向し得る任意の核酸構築物をいい、これらは、遺伝子配列を、標的細胞に移入し得る。従って、この用語は、クローニングおよび発現ビヒクル、ならびにウイルスベクターを含む。

10

【0075】

「自殺遺伝子」（例えば、薬物感受性遺伝子）の標的細胞への移入は、正常細胞に対して比較的無毒である化合物または組成物に対して、細胞を感受性にする。Moolten, F. L. (1994) Cancer Gene Ther. 1:279-287. 自殺遺伝子の例は、単純疱疹ウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-tk)、シトクロムP450 (Manomeら、(1996) Gene Therapy 3:513-520)、ヒトデオキシシチジンキナーゼ (Manomeら、(1996) Nature Medicine 2(5):567-573) および細菌性酵素シトシンデアミナーゼ (Dongら、(1996) Human Gene Therapy 7:713-720) である。これらの遺伝子を発現する細胞は、比較的無毒のプロドラッグであるガンシクロビル (HSV-tk)、シクロホスファミド (シトクロムP450 2B1)、シトシンアラビノシド (ヒトデオキシシチジンキナーゼ) または5-フルオロシトシン (細菌性シトシンデアミナーゼ) の影響に対し、感受性にされる。Culverら、(1992) Science 256:1550-1552, Huberら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:8302-8306。

20

【0076】

「選択マーカー」または「レポーターマーカー」とは、遺伝子移入ベクターに含まれるヌクレオチド配列をいい、これらは治療的活性を持たないが、むしろ遺伝子移入ベクターのより単純な調製、製造、特徴づけまたは試験を可能にするために含まれる。

【0077】

「特異的結合因子」とは、分子の特定の結合対のメンバーをいい、ここでこれらの分子の1つは、第2の分子に対し、化学的および／または物理的手段を介して、特異的に結合する。特異的結合因子の1つの例は、選択された抗原に対して指向する抗体である。

30

【0078】

「被験体」とは、脊椎動物の亜門のいずれかのメンバー（ヒトおよび他の霊長類（例えば、チンパンジーおよび他の類人猿、ならびに猿種などのヒト以外の霊長類を含む）；家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマ）；家庭向けの哺乳動物（例えば、イヌおよびネコ）；実験動物（例えば、マウス、ラットおよびモルモットなどのげっ歯類を含む）；鳥（家庭向けの鳥、野生の鳥および狩猟鳥を含む（例えば、ニワトリ、シチメンチョウおよび他の家禽の鳥、アヒル、ダチョウなど））を含むが、これらに限定されない）を意味する。この用語は、特定の年齢を示さない。従って、成体および新生仔の個体が意図され、含まれる。これらの脊椎動物の全ての免疫系は、同様に機能するので、上記のシステムは、上記脊椎動物種のいずれかにおける使用が意図される。

40

【0079】

「薬学的に受容可能」または「薬理学的に受容可能」は、生物学的でない物質またはさもなくば所望されない物質に関する。すなわち、この物質は、処方物または組成物で個体に投与され得て、任意の所望されない生物学的影響を引き起こすことも、有害な様式で、含まれる組成物成分のいずれかと相互作用することない。

【0080】

「生理学的pH」または「生理学的範囲にあるpH」とは、約7.2～8.0に含まれ

50

る範囲にあるpHを意味し、より典型的には、約7.2～7.6に含まれる範囲にある。

【0081】

本明細書で使用される場合、「処置」とは、以下のいずれかをいう：(I)従来のワクチンにおけるような、感染または再感染の予防、(ii)症状の軽減または除去、および(iii)該当する病原体の実質的除去または完全な除去。処置は、予防的に(感染前に)または治療的に(感染後に)実施され得る。

【0082】

「同時投与」とは、2つ以上の組成物または分子を投与することをいう。従って、同時投与は、同じ投与経路または異なる投与経路を介して、同時に投与する工程または連続して投与する(任意の順番で)工程を含む。同時投与レジメンの限定しない例としては、核酸およびペプチドの同時投与；異なる核酸の同時投与(例えば、本明細書に記載されるような異なる発現カセットおよび/または異なる遺伝子送達ベクター)；および異なるポリペプチドの同時投与(例えば、異なるHIVポリペプチドおよび/または異なるアジュバント)が挙げられる。この用語はまた、同時投与される分子または組成物のうちいずれか1つを複数回投与する工程を含む(例えば、本明細書に記載される1つ以上の発現カセットの複数回投与後の、ポリペプチド含有組成物の1回以上の投与)。分子または組成物が連続して送達される場合に、各投与間の時間は、本明細書の教示を考慮することで、当業者により容易に決定され得る。

【0083】

「レンチウイルスベクター」および「組換えレンチウイルスベクター」とは、目的の核酸分子を運ぶ核酸構築物をいい、そして特定の実施形態において、目的の核酸分子の発現を指向し得る。レンチウイルスベクターは、少なくとも1つの転写プロモーター/エンハンサーもしくは遺伝子座規定エレメント、または遺伝子発現を他の手段(例えば、選択的スプライシング、核RNA輸出、メッセンジャーの翻訳後修飾またはタンパク質の転写後修飾)により制御する他のエレメントを含む。このようなベクター構築物はまた、パッケージングシグナル、長い末端反復配列(LTRs)またはこれらの一部、ならびに使用するレトロウイルスに適した正および負のプライマー鎖結合部位を含まなければならない(これらがまだ、レトロウイルスベクターに存在していない場合)。必要に応じて、組換えレンチウイルスベクターはまた、ポリアデニル化を指向するシグナル、選択マーカー(例えば、Neo、TK、ハイグロマイシン、プレオマイシン、ヒスチジノールまたはDHFR)、ならびに1つ以上の制限酵素認識部位および翻訳終結配列を含み得る。例として、このようなベクターは、典型的に、5'LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、第2鎖DNA合成の起点および3'LTRまたはこれらの一部を含む。

【0084】

「レンチウイルスベクター粒子」とは、本発明の範囲内で使用される場合、少なくとも1つの目的の遺伝子を保持するレンチウイルスをいう。このレトロウイルスはまた、選択マーカーを含み得る。この組換えレンチウイルスは、その遺伝物質(RNA)をDNAに逆転写し得、そして感染の際にこの遺伝物質を宿主細胞のDNAに組み込み得る。レンチウイルスベクター粒子は、レンチウイルスエンベロープ、非レンチウイルスエンベロープ(例えば、両性(ampho)エンベロープまたはVSV-Gエンベロープ)またはキメラエンベロープを有し得る。

【0085】

「核酸発現ベクター」または「発現カセット」とは、目的の配列または遺伝子の発現を指向し得る構築物をいう。核酸発現ベクターは、目的の配列または遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。他の制御エレメントも同様に存在し得る。本明細書中に記載される発現カセットは、プラスミド構築物内に含まれ得る。この発現カセットの成分に加えて、このプラスミド構築物はまた、細菌複製起点、1以上の選択マーカー、プラスミド構築物が一本鎖DNAとして存在することを可能にするシグナル(例えば、M13複製起点)、マルチクロニングサイトおよび「哺乳動物」複製起点(例えば、SV40またはアデノウイルスの複製起点)を含み得る。

10

20

30

40

50

【0086】

「パッケージング細胞」とは、組換えレトロウイルスベクターを欠く感染性組換えレトロウイルスの産生のために必要なエレメントを含む細胞をいう。代表的には、このようなパッケージング細胞は、Gag、polおよびenvタンパク質をコードする、タンパク質を発現し得る1以上の発現カセットを含む。

【0087】

「プロデューサー細胞」または「ベクター産生細胞」とは、組換えレトロウイルスベクター粒子の産生のために必要な全てのエレメントを含む細胞をいう。

【0088】

(2. 本発明を実行する様式)

本発明を詳細に記載する前に、本発明は、特定の処方またはプロセスパラメーターに限定されず、このようなものは、当然異なり得ることが理解されるべきである。本明細書中で使用される専門用語は、本発明の特定の実施形態のみを記載する目的のためであり、限定することを意図しないこともまた、理解されるべきである。

【0089】

本明細書中に記載の方法および材料に類似するかまたは等価である多くの方法および材料が、本発明の実行において使用され得るが、好ましい材料および方法が、本明細書中に記載される。

【0090】

(2. 1. HIVゲノム)

HIVゲノムおよび種々のポリペプチドコード領域を、表Aに示す。ヌクレオチド位置は、8__5__TV1__C. ZA (配列番号33、図11) に対して与えられる。しかし、本発明の開示の技術の観点から、例えば、配列比較プログラム (例えば、本明細書中に記載されるBLASTなど) または構造的特徴の同定およびアラインメント (例えば、種々の領域を同定し得る、本明細書中に記載される「ALB」プログラムのようなプログラム) を使用して、他のHIV株または改変体 (例えば、単離株HIV_{111b}、HIV_{SF2}、HIV-1_{SF162}、HIV-1_{SF170}、HIV_{LA V}、HIV_{LA I}、HIV_{MN}、HIV-1_{CM235}、HIV-1_{US4})、種々のサブタイプ由来の他のHIV-1株 (例えば、サブタイプA~G、およびO)、HIV-2株および種々のサブタイプ (例えば、HIV-2_{UC1}およびHIV-2_{UC2})、ならびにサル免疫不全ウイルス (SIV) (これらおよび他の関連のウイルスの記載について、例えば、Virology、第三版 (W. K. Joklik編、1988) ; Fundamental Virology、第二版 (B. N. FieldsおよびD. M. Knipe編、1991) ; Virology、第三版 (Fields, BN, DM Knipe, PM Howley、編者、1996、Lippincott-Raven、Philadelphia, PA) を参照のこと) 中の対応する領域を決定する方法は、当業者に容易に明らかである。

【0091】

10

20

30

【表 1 A】

表 A: 8_5_TV1_C.ZA に対する HIV ゲノムの領域

領域	ヌクレオチド配列中の位置
5'LTR	1-636
U3	1-457
R	458-553
U5	554-636
NFkB II	340-348
NFkB I	354-362
Sp1 III	379-388
Sp1 II	390-398
Sp1 I	400-410
TATA ボックス	429-433
TAR	474-499
ポリ A シグナル	529-534
PBS	638-655
p7 結合領域、パッケージングシグナル	685-791
Gag:	792-2285
p17	792-1178
p24	1179-1871
サイクロフィリンA 結合	1395-1505
MHR	1632-1694
p2	1872-1907
p7	1908-2072
フレームシフトスリップ	2072-2078
p1	2073-2120
p6Gag	2121-2285
Zn-モチーフ I	1950-1991
Zn-モチーフ II	2013-2054

10

20

30

(表A 続き)

Pol:	2072-5086	
p6Pol	2072-2245	
Prot	2246-2542	
p66RT	2543-4210	
p15RNaseH	3857-4210	
p31Int	4211-5086	
Vif:	5034-5612	
親水性領域	5292-5315	10
Vpr:	5552-5839	
オリゴマー化	5552-5677	
両親媒性 α -ヘリックス	5597-5653	
Tat:	5823-6038 および 8417-8509	
Tat-1 エキソン	5823-6038	
Tat-2 エキソン	8417-8509	
N-末端ドメイン	5823-5885	20
トランス活性化ドメイン	5886-5933	
形質導入ドメイン	5961-5993	
Rev:	5962-6037 および 8416-8663	
Rev-1 エキソン	5962-6037	
Rev-2 エキソン	8416-8663	
高親和性結合部位	8439-8486	
Leu-リッチエフェクタードメイン	8562-8588	
Vpu:	6060-6326	
膜貫通ドメイン	6060-6161	30
細胞質ドメイン	6162-6326	

(表A 続き)

Env (gp160):	6244-8853
シグナルペプチド	6244-6324
gp120	6325-7794
V1	6628-6729
V2	6727-6852
V3	7150-7254
V4	7411-7506
V5	7663-7674
C1	6325-6627
C2	6853-7149
C3	7255-7410
C4	7507-7662
C5	7675-7794
CD4 結合	7540-7566
gp41	7795-8853
融合ペプチド	7789-7842
オリゴマー化ドメイン	7924-7959
N-末端7反復	7921-8028
C-末端7反復	8173-8280
免疫優性領域	8023-8076
Nef:	8855-9478
ミリストイル化	8858-8875
SH3 結合	9062-9091
ポリプリン区域	9128-9154
SH3 結合	9296-9307

10

20

当業者が、表Aに示される任意の配列を整列させて、任意の特定のHIV遺伝子の相対的な位置を容易に決定し得ることは、容易に明らかである。例えば、本明細書中に記載されるアラインメントプログラムの1つ（例えば、BLAST）を使用して、他のC型HIVの配列を、8__5__TV1__C.ZAと共に整列させて（表A）、遺伝子の位置を決定し得る。

30

【0092】

ポリペプチド配列も同様に整列し得る。例えば、図103は、種々の株由来のEnvポリペプチド配列の、SF-162に対するアラインメントを示す。共有に係るWO/39303に詳細に記載されるように、Envポリペプチド（例えば、gp120、gp140およびgp160）は、βシートを形成する4つのアンチパラレルβ鎖（β-2、β-3、β-20およびβ21）からなる「架橋（bridging）シート」を含む。第一の対のβ鎖（β-2およびβ-3）からの突出は、2つのループ（V1およびV2）である。SF-162に対して、このβ-2シートは、ほぼアミノ酸残基113（Cys）～アミノ酸残基117（Thr）を占めるが、β-3は、ほぼアミノ酸残基192（Ser）～アミノ酸残基194（Ile）を占める（図103を参照のこと）。この「V1/V2領域」は、SF-162に対して、ほぼアミノ酸残基120（Cys）～アミノ酸残基189（Cys）を占める。β鎖の第二の対（β-20およびβ-21）からの突出は、「小ループ」構造であり、本明細書中で「架橋シート小ループ」とも称される。小ループおよび架橋シート小ループの両方の位置は、本明細書中およびWO/39303の技術に従って、HXB-2に対して決定され得る。図103A～Cにおいて、矢印によって、βシート領域からの欠失配列のおおよその部位もまた示される。「*」は、本明細書の技術

40

50

に従って変異され得るNグリコシル化部位を示す。

【0093】

(2.2 合成発現カセット)

(2.2.1 C型HIV-1の、Pol-、Prot-、Rt-、Int-、Gag、Env、Tat、Rev、Nef、RnaseH、Vif、VprおよびVpuの核酸コード配列の改変)

本発明の1つの局面は、対応する野生型配列に対して改善された発現を有する、C型HIV-1コード配列および関連配列の作製である。

【0094】

(2.2.1.1. Gagの核酸コード配列の改変)

HIV-1サブタイプCのAF110965株およびAF110967株から得られたGagタンパク質の野生型配列を改変することによる、本発明の例示的な実施形態が、本明細書中に示される(例えば、Korberら(1998) Human Retroviruses and Aids、Los Alamos、New Mexico: Los Alamos National Laboratory; Novitskyら、(1999) J. Virol. 73(5): 4427-4432(ボツワナ由来の種々のサブタイプCクローンの分子クローニングについて)を参照のこと)。新規単離株8__5__TV1__C. ZA(TV001またはTV1とも呼ばれる)および12-5__1__TV2__C. ZA(TV002またはTV2とも呼ばれる)に由来する野生型配列の改変もまた、本明細書中に示される。配列番号52は、8__5__TV1__C. ZA由来のGagの野生型配列を示し、そして配列番号54は、同じ株由来のGagの主要な相同領域(表Aのヌクレオチド1632~1694)の野生型配列を示す。配列番号100は、12-5__1__TV2__C. ZAのGagの野生型配列を示す。

【0095】

他のC型HIV-1改変体から得られたGag配列は、本明細書の技術に従って類似の様式で操作され得る。このような他の改変体としては、C型HIV-1の単離株から得られたGagタンパク質コード配列(例えば、Novitskyら(1999)、前出; Myersら、後出; Virology、第三版(W. K. Joklik編、1988); Fundamental Virology、第二版(B. N. FieldsおよびD. M. Knipe編、1991); Virology、第三版(Fields, BN、DM Knipe、PM Howley、編者、1996、Lippincott-Raven、Philadelphia, PA)ならびにワールドワイドウェブ(インターネット)(例えば、<http://hiv-web.lanl.gov/cgi-bin/hivDB3/public/wdb/ssampublic>および<http://hiv-web.lanl.gov>。)に記載される)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0096】

最初に、HIV-1のコドン用法パターンを、得られた核酸コード配列が、高度に発現されるヒト遺伝子において見出されるコドン用法と匹敵するように、改変した(実施例1)。HIVコドン用法は、コドントリプレットのヌクレオチドAおよびTの高含量を反映する。HIV-1コドン用法の影響は、mRNAの減少した翻訳能力および不安定性を生じる、DNA配列中の高いAT含量である。対照的に、高度に発現されるヒトコドンは、ヌクレオチドGまたはCを好む。Gagコード配列を、高度に発現されるヒト遺伝子において見出されるコドン用法に匹敵するように改変した。

【0097】

第二に、Gagコード配列のコード配列内に位置する阻害(または不安定)エレメント(INS)が存在する。RREは、HIVがコードするRevタンパク質と相互作用して、INSの発現ダウンレギュレーション効果を克服する、二次RNA構造である。RREおよびRevの転写後活性化機構を克服するために、不安定エレメントは、コードされたタンパク質のリーディングフレームを変更しない複数の点変異を導入することによって、不活化され得る。不活化されたRRE部位を有する、サブタイプCのGagコード配列は

、例えば、図1（配列番号3）、図2（配列番号4）、図5（配列番号20）および図6（配列番号26）に示される。同様に、他のサブタイプC株に由来する他の合成ポリヌクレオチドは、RRE部位を不活化するために改変され得る。

【0098】

Gagポリペプチドコード配列の改変は、多くの哺乳動物細胞株（ならびに昆虫細胞を含むがこれに限定されない他の型の細胞株）において、野生型コード配列に対して改善された発現を生じる。さらに、これらの配列の発現は、これらの細胞株によるウイルス様粒子（VLP）の産生を生じる（以下を参照のこと）。

【0099】

（2.2.1.2 Env核酸コード配列の改変）

同様に、本発明はまた、合成Envコードポリヌクレオチドおよび改変されたEnvタンパク質を含む。野生型のEnv配列は、C型HIV-1のAF110968株およびAF110975株ならびに新規株8__5__TV1__C.ZA（配列番号33）および12-5__1__TV2__C.ZA（配列番号45）から得られる（例えば、ボツワナ由来の種々のサブタイプCクロンの分子コロニーングについて、Novitskyら（1999）J. Virol. 73（5）：4427-4432を参照のこと）。8__5__TV1__C.ZAの野生型Env配列は、例えば、配列番号48（野生型Env共通領域、表Aに示されるヌクレオチド7486～7629）；および配列番号50（野生型gp160、表Aに示されるヌクレオチド6244～8853）に示される。12-5__1__TV2__C.ZAの野生型Env gp160は、配列番号98に示される。本明細書中の開示から、Env gp160（例えば、gp120、gp41、gp140）のフラグメントをコードするポリヌクレオチドが、本明細書中に開示されるより大きい全長配列から容易に得られ得ることが、容易に明らかである。他の改変（例えば、V1および／またはV2領域のような領域の欠失；切断部位の変異など）がなされ得ることもまた、容易に明らかである（実施例1を参照のこと）。このような改変の例示的配列は、配列番号119～127に示される。

【0100】

さらに、C型HIV-1改変体から得られるEnv配列は、本明細書の技術に従って類似の様式で操作され得る。このような他の改変体としては、上記のC型HIV-1単離株から得られるEnvタンパク質コード配列が挙げられるが、これに限定されない。

【0101】

Envについてのコドン用法パターンを、Gagについて上記のように改変し、その結果、得られた核酸コード配列は、高度に発現されるヒト遺伝子において見出されるコドン用法に匹敵した。本発明を支持して、実行された実験は、合成Env配列がネイティブなEnv配列と比較して、高レベルのタンパク質を産生し得たことを示す。

【0102】

Envポリペプチドコード配列の改変は、多くの哺乳動物細胞株（ならびに昆虫細胞を含むがこれに限定されない他の型の細胞株）において、野生型コード配列に対して改善された発現を生じる。類似のEnvポリペプチドコード配列は、種々の単離株（Gagについて上記された株を含む）から得られ得、改変され得、そして改善された発現について試験され得る。

【0103】

Envのさらなる改変は、その中に変異および／または欠失を有するEnvポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを作製することを含むが、これに限定されない。例えば、超可変領域（V1および／またはV2）は、本明細書中に記載のように欠失され得る。さらに、例えば、Env内の架橋シート領域および／またはN-グリコシル化部位に対する他の改変もまた、本明細書中の技術に従って実行され得る（図130A～CおよびWO／39303を参照のこと）。これらの改変の種々の組み合わせは、本明細書中で記載されるような合成発現カセットを作製するために使用され得る。

【0104】

(2. 2. 1. 3 HIV-1 Pol 核酸コード配列を含む配列の改変)

本発明はまた、合成 Pol 配列を含む発現カセットを包含する。上記のように、「Pol」は、図 7 に示されるようなタンパク質コード領域（例えば、ポリメラーゼ、プロテアーゼ、逆転写酵素および／またはインテグラーゼ含有配列）を含むが、これに限定されない。図 7 に示される領域は、例えば、Wan ら (1996) *Biochem. J.* 316 : 569-573 ; Kohl ら (1988) *PNAS USA* 85 : 4686-4690 ; Krausslich ら (1988) *J. Virol.* 62 : 4393-4397 ; Coffin 「*Retroviridae and their Replication*」、*Virology*、1437-1500 頁 (Raven、New York、1990) ; Patel ら (1995) *Biochemistry* 34 : 5351-5363 に記載される。従って、本明細書中で例示される合成発現カセットは、1 以上のこれらの領域および得られるアミノ酸配列に対する 1 以上の変化を含む。

【0105】

野生型の Pol 配列を、C 型 HIV-1 の AF110975 株、8__5__TV1__C. ZA 株および 12-5__1__TV2__C. ZA 株から得た（例えば、ボツワナ由来の種々のサブタイプ C クローンの分子クローニングについて、Novitsky ら (1999) *J. Virol.* 73 (5) : 4427-4432 を参照のこと）。配列番号 34 は、Pol の p2~p7 領域由来の AF110975 の野生型配列を示す（図 7 および表 A を参照のこと）。配列番号 35 は、p1~インテグラーゼの最初の 6 アミノ酸由来の AF110975 の野生型配列を示す（図 7 および表 A を参照のこと）。配列番号 63 および配列番号 104 は、それぞれ、8__5__TV1__C. ZA および 12-5__1__TV2__C. ZA 由来の Pol の野生型配列を示す（また表 A を参照のこと）。

【0106】

他の C 型 HIV-1 改変体から得られた配列は、本明細書の技術に従って類似の様式で操作され得る。このような他の改変体としては、本明細書中に記載される C 型 HIV-1 単離株から得られた Pol タンパク質コード配列が挙げられるが、これに限定されない。

【0107】

Pol についてのコドン用法パターンを、Gag および Env について上記されたように改変し、その結果、得られた核酸コード配列は、高度に発現されるヒト遺伝子において見出されるコドン用法と匹敵した。

【0108】

表 B は、本明細書中で例示される Pol 構築物（例えば、配列番号 30~32）において見出される種々の領域のヌクレオチド位置を示す。

【0109】

10

20

30

【表 1 B】

表 B

領域	構築物中のヌクレオチド配列における位置		
	PR975(+) 配列番号30	PR975YM 配列番号31	PR975(+) YMWM 配列番号32
Sal I 制限部位	1-6	1-6	1-6
Kozak 開始コドン	7-16	7-16	7-16
p2	16-54	16-54	16-54
p7	55-219	55-219	55-219
p1/p6 pol	220-375	220-375	220-375
インフレーションについての挿入変異	225	225	225
p10プロテアーゼ	376-672	376-672	376-672
p66RT	673-2352	673-2346	673-2340
p51RT	673-1992	673-1986	673-1980
p15RNaseH	1993-2352	1993-2346	1993-2340
触媒中心領域 (YMDD)	1219-1230	1219-1224	1219-1224
プライマーグリップ領域 (WMGY)	1357-1368	1351-1362	1351-1356
6aa インテグラーゼ	2353-2370	2347-2364	2341-2358
YMDD エピトープカセット (5'+3'Glyを含む)	2371-2424	2365-2418	2359-2412
MCS (マルチクローニングサイト)	2425-2463	2419-2457	2413-2451
EcoR I 制限部位	2464-2469	2458-2463	2452-2457

表 B に示すように、例示的な構築物を、種々の様式で改変した。例えば、本明細書中で例示される発現構築物は、インテグラーゼペプチドの最初の 6 つのアミノ酸をコードする配列を含む。この 6 アミノ酸の領域は、H I V プロテアーゼによって認識される、切断認識部位を提供すると考えられる（例えば、Mc Cornack ら（1997）F E B S L e t t e r s 414:84-88 を参照のこと）。上記のように、本明細書中に例示される特定の構築物は、1 つ以上の導入遺伝子の挿入のための、マルチクローニングサイト（M C S）を、代表的にはこの構築物の 3' 末端に含む。さらに、R T において触媒中心から誘導された触媒中心エピトープをコードするカセットは、代表的に、インテグラーゼの 6 アミノ酸をコードする配列の 3' 末端を含んだ。このカセット（配列番号 36）は、R T の I l e 178～セリン 191（配列番号 37 のアミノ酸 3～16）をコードし、そしてこの十分に保存された領域を、可能な C T L エピトープとして維持するために添加された。さらに、これらの構築物は、挿入変位（配列番号 30～32 の 225 位）を含み、リーディングフレームを保存する（例えば、Park ら（1991）J. V i r o l. 65:5111 を参照のこと）。

【0110】

特定の実施形態において、R T の触媒中心および／またはプライマーグリップ領域が、改変される。R T の触媒中心およびプライマーグリップ領域は、例えば、P a t e l ら（1995）B i o c h e m. 34:5351 および P a l a n i a p p a n ら（1997）J. B i o l. C h e m. 272(17):11157 に記載されている。例えば、P R 975 Y M（配列番号 31）と称される構築物において、p 66 R T の 183 位～185 位（A F 110975 に対して番号付けられた）においてアミノ酸 Y M D D をコードする野生型配列は、アミノ酸「A P」をコードする配列と置換される。P R 975 Y M W M（配列番号 32）と称される構築物において、Y M D D における同じ変位がなされ、そしてさらに、プライマーグリップ領域（アミノ酸 W M G Y、p 66 R T の残基 229～232（A F 110975 に対して番号付けられた））が、アミノ酸「P I」をコードする配列で置換される。

【0111】

10

20

30

40

50

P o l 配列に対して、コドン利用の変化は、代表的に、-1 までのフレームシフトの領域に制限されており、そして再度、G a g リーディングフレームの末端において開始する；しかし、フレームシフト翻訳領域内の領域も同様に改変され得る。最後に、プロテアーゼポリペプチドコード配列のコード配列内に位置する阻害（すなわち、不安定）エレメント（I N S）も同様に、変更され得る。

【0112】

本発明の支持によって実験を実施して、合成 P o l 配列がネイティブ P o l 配列と比較してより高レベルのタンパク質を産生し得たことを示し得る。P o l ポリペプチドコード配列の改変は、多くの哺乳動物細胞株（および他の型の細胞（昆虫細胞が挙げられるがこれらに限定されない））において、野生型コード配列と比較して、改善された発現を生じる。種々の単離物（G a g および E n v に関して上記したものを含む）からの改善された発現のために改変および試験された、類似の P o l ポリペプチドコード配列が得られ得る。

10

【0113】

（2. 2. 1. 4 他の H I V 配列の改変）

本発明はまた、G a g、E n v および P o l 以外の、合成 C 型 H I V 配列由来の H I V 遺伝子（G a g、E n v、P o l、ならびに例えば、8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A（配列番号 33）または 12 _ 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A（配列番号 45）由来の v i f、v p r、t a t、r e v、v p u、および n e f 内の領域が挙げられるが、これらに限定されない）を含む、発現カセットを包含する。他の株から得られた配列は、本明細書の教示に従って類似の様式で操作され得る。

20

【0114】

上記のように、コドン利用パターンは、G a g、E n v および P o l に関して上記したように改変され、その結果、得られる核酸コード配列は、高度に発現されるヒト遺伝子において見出されるコドン利用に匹敵する。本発明の支持によって実験を実施して、これらの合成配列が、ネイティブの配列と比較してより高レベルのタンパク質を産生し得たこと、および野生型ポリペプチドコード配列の改変が、多くの哺乳動物細胞株（および他の型の細胞（昆虫細胞が挙げられるがこれらに限定されない））において、野生型コード配列と比較して改善された発現を生じることを示し得る。さらに、核酸配列もまた改変されて、遺伝子の 1 つ以上の領域に変異を導入し、例えば、その遺伝子産物を非機能的にし得、そして／または N e f におけるミリストイル化部位を排除し得る。

30

【0115】

本明細書中で例示される合成発現カセットは、以下を含む：配列番号 49 および配列番号 97（それぞれ 8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 野生型および 12 _ 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 野生型に基づいて改変された E n v g p 160 コード配列）；配列番号 51 および配列番号 99（それぞれ 8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 野生型および 12 _ 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 野生型に基づいて改変された G a g コード配列）；配列番号 53（8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 野生型に基づいて改変された G a g の主要な相同性領域）；配列番号 55 および配列番号 101（それぞれ 8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 野生型および 12 _ 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 野生型に基づいて改変された N e f コード配列）；配列番号 57 および配列番号 134（それぞれ 8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 野生型および 12 _ 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 野生型に基づいて改変された、125 位における変異を有して非機能的な遺伝子産物を生じる N e f コード配列）；配列番号 58（8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 野生型に基づいて改変された R N A s e H コード配列）；配列番号 60（8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 野生型に基づいて改変されたインテグラーゼコード配列）；配列番号 62 および配列番号 103（それぞれ 8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 野生型および 12 _ 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A 野生型に基づいて改変された P o l コード配列）；配列番号 64（8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 野生型に基づいて改変されたプロテアーゼコード配列）；配列番号 66（8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 野生型に基づいて改変された不活化プロテアーゼコード配列）；配列番号 68（8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A 野生型に基づいて改変された不活化プロテアーゼおよび R T 変

40

50

異配列)；配列番号70(8__5__TV1__C. ZA野生型に基づいて改変されたプロテアーゼおよび逆転写酵素のコード配列)；配列番号72および配列番号105(それぞれ8__5__TV1__C. ZA野生型および12-5__1__TV2__C. ZA野生型に基づいて改変された、Revのエキソン1)；配列番号74および配列番号107(それぞれ8__5__TV1__C. ZA野生型および12-5__1__TV2__C. ZA野生型に基づいて改変された、Revのエキソン2)；配列番号76(8__5__TV1__C. ZA野生型に基づいて改変された逆転写酵素コード配列)；配列番号78(8__5__TV1__C. ZA野生型に基づいて改変された変異逆転写酵素)；配列番号80(8__5__TV1__C. ZA野生型に基づいて改変された、非機能的Tatを生じる変異を含むTatのエキソン1)；配列番号81および配列番号109(それぞれ8__5__TV1__C. ZA野生型および12-5__1__TV2__C. ZA野生型に基づいて改変された、Tatのエキソン1)；配列番号83および配列番号111(それぞれ8__5__TV1__C. ZA野生型および12-5__1__TV2__C. ZA野生型に基づいて改変された、Tatのエキソン2)；配列番号85および配列番号113(それぞれ8__5__TV1__C. ZA野生型および12-5__1__TV2__C. ZA野生型に基づいて改変されたVifコード配列)；配列番号87および配列番号115(それぞれ8__5__TV1__C. ZA野生型および12-5__1__TV2__C. ZA野生型に基づいて改変されたVprコード配列)；配列番号89および配列番号117(それぞれ8__5__TV1__C. ZA野生型および12-5__1__TV2__C. ZA野生型に基づいて改変されたVpuコード配列)；配列番号91(8__5__TV1__C. ZA野生型に基づいて改変された、Revのエキソン1およびエキソン2の配列)；配列番号93(8__5__TV1__C. ZA野生型に基づいて改変された、Tatの変異エキソン1およびTatのエキソン2の配列(ここでエキソン1の変異は、非機能的Tatを生じる))；配列番号94(8__5__TV1__C. ZA野生型に基づいて改変された、Tatのエキソン1およびエキソン2の配列)；配列番号96および配列番号135(それぞれ8__5__TV1__C. ZA野生型および12-5__1__TV2__C. ZAに基づいて改変された、ミリストイル化部位を排除する変異を含むNefコード配列)。

【0116】

(2. 2. 1. 5 HIV-1 核酸コード配列を含む配列のさらなる改変)

本明細書中に記載される、C型HIVポリペプチドコード発現カセットはまた、例えば、1つ以上の導入遺伝子をコードする、1つ以上のさらなる配列を含み得る。本発明の実施において有用なさらなる配列(例えば、導入遺伝子)としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：さらなるウイルスエピトープ／抗原{HCV抗原(例えば、E1、E2；Houghton, M. . ら、米国特許第5, 714, 596号(1998年2月3日発行)；Houghton, M. . ら、米国特許第5, 712, 088号(1998年1月27日発行)；Houghton, M. . ら、米国特許第5, 683, 864号(1997年11月4日発行)；Weiner, A. J. ら、米国特許第5, 728, 520号(1998年3月17日発行)；Weiner, A. J. ら、米国特許第5, 766, 845号(1998年6月16日発行)；Weiner, A. J. ら、米国特許第5, 670, 152号(1997年9月23日発行))、HIV抗原(例えば、tat、rev、nefおよび／またはenv由来のもの)を含むがこれらに限定されない}をコードするさらなる配列；および腫瘍抗原／エピトープをコードする配列。さらなる配列はまた、非ウイルス供給源に由来し得る(例えば、インターロイキン-2(IL-2)、幹細胞因子(SCF)、インターロイキン3(IL-3)、インターロイキン6(IL-6)、インターロイキン12(IL-12)、G-CSF、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-1α(IL-1I)、インターロイキン-11(IL-11)、MIP-1I、腫瘍壊死因子(TNF)、白血病抑制因子(LIF)、c-kitリガンド、トロンボポエチン(TPO)およびflt3リガンドのようなサイトカイン(例えば、Genzyme(Framingham, MA)、Genentech(South San Francisco, CA)、Amgen(Thousa

nd Oaks, CA)、R&D Systems and Immunex (Seattle, WA) のようないくつかの販売元から市販されている) をコードする配列)。さらなる配列は、例えば 2. 3 節で、以下に記載されている。また、Gag および他のコード配列の、互いに対する配向のバリエーションは、以下に記載されている。

【0117】

HIV ポリペプチドコード配列は、他の C 型 HIV 単離物から得られ得る。例えば、Myers ら、Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); Myers ら、Human Retroviruses and Aids, 1997, Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory を参照のこと。合成発現カセットは、このようなコード配列を出発物質として使用して、本明細書の教示に従って、生成され得る (例えば、実施例 1 を参照のこと)。

【0118】

さらに、本発明の合成発現カセットは、本明細書中に開示される合成発現カセット配列 (例えば、配列番号 30~32; 配列番号 3、4、20、および 21、ならびに配列番号 5~17) に対して、85% より大きい、好ましくは 90% より大きい、より好ましくは 95% より大きい、そして最も好ましくは 98% より大きい配列同一性を有する、関連するポリペプチド配列を含む。種々のコード領域が、図 3 および 4 に示されており、例えば図 3 (AF110968) においては、ヌクレオチド 1~81 (配列番号 18); ヌクレオチド 82~1512 (配列番号 6) は、gp120 ポリペプチドをコードし、ヌクレオチド 1513~2547 (配列番号 10) は、gp41 ポリペプチドをコードし、ヌクレオチド 82~2025 (配列番号 7) は、gp140 ポリペプチドをコードし、そしてヌクレオチド 82~2547 (配列番号 8) は、gp160 ポリペプチドをコードする。同様に、図 98 (配列番号 127、株 8__2__TV1__C. ZA) においては、ヌクレオチド 1~6 は、EcoRI 制限部位であり; ヌクレオチド 7~87 は、野生型 (8__2__TV1__C. ZA 由来) リーダーシグナルペプチドをコードし; ヌクレオチド 88~1563 は、gp120 ポリペプチドをコードし; ヌクレオチド 88~2064 は、gp140 ポリペプチドをコードし; ヌクレオチド 88~2607 は、gp160 ポリペプチドをコードする。

【0119】

(2. 3. 3 HIV-1 サブタイプ C および関連するポリペプチドをコードする、合成配列の発現)

本発明の合成 HIV コード配列 (発現カセット) は、発現のレベルを評価するため、および Gag の場合には、VLP の産生を評価するために、多数の異なる発現ベクターにクローニングされ得る。HIV ポリペプチドに対する合成 DNA フラグメントは、真核生物発現ベクター (一過性発現ベクター、CMV プロモーターに基づく哺乳動物ベクター、およびバキュロウイルス発現系において使用するためのシャトルベクターが挙げられる) にクローニングされ得る。対応する野生型配列もまた、同じベクターにクローニングされ得る。

【0120】

次いで、これらのベクターは、いくつかの異なる細胞型 (種々の哺乳動物細胞株 (293、RD、COS-7、および CHO、例えば、A. T. C. C. から入手可能な細胞株) が挙げられる) にトランスフェクトされ得る。次いで、細胞株は、適切な条件下で培養され、そして任意の適切なポリペプチド産物のレベルが、上清中で評価され得る (表 A および実施例 2 を参照のこと)。例えば、p24 は、Gag 発現を評価するために使用され得る; gp160、gp140 または gp120 は、Env 発現を評価するために使用され得る; p6pol は、Pol 発現を評価するために使用され得る; prot は、プロテアーゼを評価するために使用され得る; p15 は、RNAse H を評価するために使用され得る; p31 は、インテグラーゼを評価するために使用され得る; そして他の適切なポ

リペプチドは、V i f、V p r、T a t、R e v、V p uおよびN e fを評価するために使用され得る。さらに、改変されたポリペプチドがまた使用され得、例えば、他のE n vポリペプチドとしては、例えば、ネイティブg p 1 6 0、オリゴマーg p 1 4 0、モノマーg p 1 2 0、ならびにこれらのポリペプチドの改変配列および／または合成配列が挙げられるが、これらに限定されない。これらのアッセイの結果は、合成H I Vポリペプチドコード配列の発現が、対応する野生型配列より有意に高いことを実証する。

【0121】

さらに、ウェスタンブロット分析を使用して、合成発現カセットを含む細胞が、ネイティブ発現カセットを含む細胞より高い細胞あたりの濃度で、予測されたタンパク質を発現することを示し得る。H I Vタンパク質は、細胞溶解物と上清との両方において見られ得る。本発明の合成発現カセットでトランスフェクトされた細胞については、産生のレベルは、細胞上清において有意により高い。

10

【0122】

合成発現カセットでトランスフェクトされた哺乳動物細胞からの上清の分画を使用して、これらのカセットが、野生型配列と比較して、H I Vタンパク質の優れた産生（そしてG a gの場合には、V L Pの産生）を提供することを示し得る。

【0123】

これらのH I V含有ポリペプチドの、哺乳動物細胞株における効率的な発現は、以下の利点を提供する：ポリペプチドは、バキュロウイルス夾雑物を含まない；確立された方法による産生がF D Aによって認可されている；増加した純度；より高い収率（ネイティブコード配列と比較して）；およびC H O細胞におけるサブタイプC H I V含有ポリペプチドの産生（これは、本発明の構築物を使用して得られる増加した発現の非存在下では実行不可能である）の新規方法。例示的な哺乳動物細胞株としては、B H K、V E R O、H T 1 0 8 0、2 9 3、2 9 3 T、R D、C O S - 7、C H O、J u r k a t、H U T、S U P T、C 8 1 6 6、M O L T 4／クローン8、M T - 2、M T - 4、H 9、P M 1、C E M、およびC E M X 1 7 4が挙げられるが、これらに限定されず、このような細胞株は、例えば、A . T . C . C . から入手可能である。

20

【0124】

本発明の合成G a g発現カセットはまた、昆虫細胞にトランスフェクトされる場合に、高レベルの発現およびV L P産生を示す。本明細書中に記載される合成発現カセットはまた、昆虫細胞において高レベルの発現を示す。さらに、より高い全タンパク質収率に加えて、合成ポリペプチドからの最終生成物は、一貫して、ネイティブのC型配列からの最終生成物より低い量の夾雑バキュロウイルスタンパク質を含む。

30

【0125】

さらに、本発明の合成発現カセットはまた、酵母ベクターに導入され得、このベクターは次に、酵母細胞（*Saccharomyces cerevisiae*；Rosenberg, S. およびTekamp-Olson, P., 米国再発行特許発明第35, 749号（1998年3月17日発行）に記載されるようなベクターを使用する）に形質転換され得、そして酵母細胞によって効率的に発現され得る。

【0126】

哺乳動物ベクターおよび昆虫ベクターに加えて、本発明の合成発現カセットは、選択された発現制御エレメントを使用して、種々の発現ベクターに組み込まれ得る。任意の所定の細胞型に適切なベクターおよび制御エレメントは、本明細書の教示、および発現ベクターについて当該分野において公知の情報を考慮して、当業者によって選択され得る。

40

【0127】

例えば、合成発現カセットは、所望のコード配列に作動可能に連結された制御エレメントを含むベクターに挿入され得、これによって、選択された細胞型における遺伝子の発現が可能となる。例えば、哺乳動物細胞発現のための代表的なプロモーターとしては、とりわけ、S V 4 0初期プロモーター、C M Vプロモーター（例えば、C M V極初期プロモーター（C M VプロモーターはイントロンAを含み得る））、R S V、H I V - L t r、マ

50

ウス乳腺癌ウイルスLTRプロモーター (MMLV-ltr)、アデノウイルスの主要後期プロモーター (Ad MLP)、および単純疱疹ウイルスプロモーターが挙げられる。他の非ウイルスプロモーター (例えば、マウスメタロチオネイン遺伝子由来のプロモーター) もまた、哺乳動物発現のために用途を見出す。代表的に、転写終結配列およびポリアデニル化配列もまた存在し、翻訳終止コドンに対して3'に位置する。好ましくは、翻訳の開始の最適化のための配列もまた存在し、コード配列に対して5'に位置する。転写終結シグナル/ポリアデニル化シグナルの例としては、Sambrookら、前出に記載されるようなSV40由来のシグナル、およびウシ成長ホルモントミナー配列が挙げられる。スプライスドナー部位およびアクセプター部位を含むイントロンもまた、本発明と共に使用するための構築物中に設計され得る (Chapmanら, Nuc. Acids Res. (1991) 19:3979-3986)。

【0128】

エンハンサーエレメントもまた、本明細書中において使用されて、哺乳動物構築物の発現レベルを増加させ得る。例としては、Dijkemaら, EMBO J. (1985) 4:761に記載されるようなSV40初期遺伝子エンハンサー、Gormanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79:6777に記載されるようなラウス肉腫ウイルスの長末端反復 (LTR) 由来のエンハンサー/プロモーター、およびBoshartら, Cell (1985) 41:521に記載されるようなヒトCMV由来のエレメント (例えば、CMVイントロンA配列に含まれるエレメント (Chapmanら, Nuc. Acids Res. (1991) 19:3979-3986)) が挙げられる。

【0129】

所望の合成ポリペプチドをコードする配列は、多数の市販のベクターにクローニングされて、このポリペプチドの、適切な宿主系における発現を生じさせ得る。これらの系としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：バキュロウイルス発現 {Reilly, P. R. ら, BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992); Beamesら, Biotechniques 11:378 (1991); Pharmingen; Clontech, Palo Alto, CA}、ワクシニア発現 {Earl, P. L. ら, 「Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia」Current Protocols in Molecular Biology. (F. M. Ausubelら編), Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, New York (1991); Moss, B. ら, 米国特許第5, 135, 855号 (1992年8月4日発行)}、細菌における発現 {Ausubel, F. M. ら, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons, Inc., Media PA; Clontech}、酵母における発現 {Rosenberg, S. およびTekamp-Olson, P., 米国再発行特許発明第35, 749号 (1998年3月17日発行); Shuster, J. R., 米国特許第5, 629, 203号 (1997年5月13日発行); Gellissen, G., ら, Antonie Van Leeuwenhoek, 62 (1-2): 79-93 (1992); Romanos, M. A., ら, Yeast 8 (6): 423-488 (1992); Goeddel, D. V., Methods in Enzymology 185 (1990); Guthrie, C., およびG. R. Fink, Methods in Enzymology 194 (1991)}、哺乳動物細胞における発現 {Clontech; Gibco-BRL, Ground Island, NY; 例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株 (Haynes, J. ら, Nuc. Acid. Res. 11:687-706 (1983); 1983, Lau, Y. F. ら, Mol. Cell. Biol. 4:1469-1475 (1984); Kaufman, R. J., 「Selection and coamplification o

f heterologous genes in mammalian cells」
、Methods in Enzymology, 第185巻, 537-566頁、Academic Press, Inc., San Diego CA (1991)}、および植物細胞における発現 {植物クローニングベクター、Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA、およびPharmacia LKB Biotechnology, Inc., Piscataway, NJ; Hood, E. ら, J Bacteriol. 168:1291-1301 (1986); Nagel, R. ら, FEMS Microbiol. Lett. 67:325 (1990); Anら, 「Binary Vectors」、およびPlant Molecular Biology Manual A3:1-19 (1988); Miki, B. L. A. ら, 249-265頁における他のもの、ならびにPlant DNA Infectious Agents (Hohn, T. ら編) Springer-Verlag, Wien, Austria, (1987); Plant Molecular Biology: Essential Techniques, P. G. JonesおよびJ. M. Sutton, New York, J. Wiley, 1997; Miglani, Gurba chan Dictionary of Plant Genetics and Molecular Biology, New York, Food Products Press, 1998; Henry, R. J., Practical Applications of Plant Molecular Biology, New York, Chapman & Hall, 1997における他のもの}。 10

【0130】

本発明にはまた、コード配列、および適切な宿主におけるコード領域の発現を可能にする発現制御エレメントを含む発現ベクターが含まれる。これらの制御エレメントは、一般に、プロモーター、翻訳開始コドン、および翻訳終止配列および転写終止配列、ならびにベクターへ挿入を導入するための挿入部位を含む。転写制御エレメントは、M. Kozakによって概説されている (例えば、Kozak, M., Mamm. Genome 7 (8): 563-574, 1996; Kozak, M., Biochimie 76 (9): 815-821, 1994; Kozak, M., J Cell Biol 108 (2): 229-241, 1989; Kozak, M., およびShatkin, A. J., Methods Enzymol 60:360-375, 1979)。 20 30

【0131】

酵母系における発現は、工業的生産の利点を有する。ワクシニアおよびCHO細胞株による組換えタンパク質の産生は、哺乳動物発現系であるという利点を有する。さらに、ワクシニアウイルスの発現は、以下を含むいくつかの利点を有する: (i) その広範な宿主範囲; (ii) 組換えタンパク質の正確な転写後修飾、プロセッシング、折り畳み、輸送、分泌および構築; (iii) 比較的可溶性の組換えタンパク質の高レベルな発現; ならびに (iv) 外来DNAに適合する大きな能力。

【0132】

合成HIVポリペプチドコード発現カセットから組換え的に発現されたポリペプチドは、典型的に、溶解された細胞および培養培地から単離される。精製は、当該分野で公知の方法 (塩分画、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、サイズ排除クロマトグラフィー、サイズ分画およびアフィニティークロマトグラフィーを含む) によって、実施され得る。免疫親和性クロマトグラフィーは、例えば、HIV抗原に基づいて作製された抗体を使用して、用いられ得る。 40

【0133】

哺乳動物細胞を使用して本発明のタンパク質を発現させる利点としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 産生のスケールアップのための十分に確立されたプロトコル; VLPを生成する能力; 細胞株が優良製造プロセス (GMP) 基準を満たすように適合されること; 哺乳動物細胞の培養条件が当該分野で公知であること。

【0134】

本明細書中に記載される本発明の異なる実施形態の様々な形態は、組み合わせられてもよい。

【0135】

(2.3 ウイルス様粒子の生成およびパッケージング細胞株を作製するための本発明の構築物の使用)

ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)の群特異的抗原(Gag)は、発芽によって種々の真核生物細胞から放出される非感染性ウイルス様粒子(VLP)に自己構築する(Freed, E. O., Virology 251:1-15, 1998による総説)。本発明の合成発現カセットは、種々の異なる細胞型(哺乳動物細胞が挙げられるが、これに限定されない)を使用するHIV-Gagウイルス様粒子(VLP)の生成に有効な手段を提供する。

10

【0136】

ウイルス粒子は、宿主の免疫系に対する、この粒子に捕捉または結合された抗原の適切な提示のためのマトリクスとして、使用され得る。

【0137】

(2.3.1 本発明の合成発現カセットを使用するVLP生成)

本発明を支持して実験を行って、本発明の合成発現カセットが、ネイティブのGagコード配列と比較して、Gagタンパク質およびVLPの両方の優れた生成を提供することを証明し得る。さらに、VLP生成の電子顕微鏡評価により、推定サイズの遊離の発芽している未成熟ウイルス粒子は、この合成発現カセットを含む細胞によって生成されることが示され得る。

20

【0138】

ウイルス様粒子の生成のために、ネイティブのGagコード配列ではなく、本発明の合成発現カセットを使用することは、いくつかの利点を提供する。第1に、VLPは、増大した量で生成され得、これによりこのVLPの単離および精製がより容易になり得る。第2に、VLPは、この合成発現カセットを使用して種々の細胞型で生成され得、特に、哺乳動物細胞株(例えば、CHO細胞)は、VLP生成のために使用され得る。CHO細胞を使用する生成は、以下を提供する:(i) VLP形成;(ii) 正確なミリスティル化および発芽;(iii) 非哺乳動物細胞混入物(例えば、昆虫ウイルスおよび/または細胞)の非存在;および(iv) 精製の容易さ。本発明の合成発現カセットはまた、哺乳動物細胞株以外の細胞型における発現を増大するために有用である。例えば、この合成発現カセットをコードするバキュロウイルスベクターで昆虫細胞を感染することにより、高レベルのGagタンパク質の全収率およびより高いレベルのVLP生成が生じる(野生型コード配列と比較して)。さらに、バキュロウイルスGag合成発現カセットに感染した昆虫由来の最終産物は、野生型コード配列を使用した場合の最終産物より少ない量の混入昆虫タンパク質を一貫して含む。

30

【0139】

VLPは、目的の粒子形成ポリペプチドが適切な宿主細胞において組換え発現される場合に、自然に形成され得る。従って、本発明の合成発現カセットを使用して生成されるVLPは、組換え技術を使用して簡便に調製される。下記のように、本発明のGagポリペプチドコード合成発現カセットは、目的の他のポリペプチドコード配列(例えば、HIVプロテアーゼ、HIVポリメラーゼ、HCVコア、Env、合成Env;実施例1を参照のこと)を含み得る。このような合成発現カセットの発現は、Gagポリペプチドを含むVLPならびに目的のポリペプチドを生じる。

40

【0140】

一旦、所望の粒子形成ポリペプチドのコード配列が単離または合成されると、これらのコード配列は、発現に適切な任意のベクターまたはレプリコンにクローニングされ得る。多数のクローニングベクターが、当業者に公知であり、適切なクローニングベクターの選択が可能である。一般的には、Sambrookら(前出)を参照のこと。次いで、このベクターは、適切な宿主細胞を形質転換するために使用される。適切な組換え発現系とし

50

ては、細菌発現系、哺乳動物発現系、バキュロウイルス／昆虫発現系、ワクシニア発現系、セムリキ森林熱ウイルス（SFV）発現系、アルファウイルス（例えば、シンドビスウイルス、ベネズエラウマ脳脊髄炎（VEE）ウイルス）発現系、哺乳動物発現系、酵母発現系およびゼノプス発現系が挙げられるが、これらに限定されず、これらは当該分野で周知である。特に好まし発現系は、哺乳動物細胞株、ワクシニア、シンドビス、昆虫および酵母発現系である。

【0141】

例えば、多数の哺乳動物細胞株が当該分野で公知であり、そしてAmerican Type Culture Collection (A. T. C. C.) から入手可能な不死化細胞株を含み、この不死化細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、新生ハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（COS）などが挙げられるが、これらに限定されない。同様に、細菌宿主（例えば、E. coli、Bacillus subtilisおよびStreptococcus spp.）は、本発明の発現構築物を用いる用途を見出す。本発明において有用な酵母宿主としては、特に、Saccharomyces cerevisiae、Candida albicans、Candida maltosa、Hansenula polymorpha、Kluyveromyces fragilis、Kluyveromyces lactis、Pichia guillierimondii、Pichia pastoris、Schizosaccharomyces pombeおよびYarrowia lipolyticaが挙げられる。バキュロウイルス発現ベクターと共に使用するための昆虫細胞としては、特に、Aedes aegypti、Autographa californica、Bombyx mori、Drosophila melanogaster、Spodoptera frugiperdaおよびTrichoplusia ni. が挙げられる。例えば、SummersおよびSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) を参照のこと。

【0142】

ウイルスベクター（例えば、ボックスファミリーのウイルス（ワクシニアウイルスおよび鳥類ボックスウイルスを含む）由来のベクター）は、真核生物細胞における粒子の生成のために使用され得る。さらに、ワクシニアベースの感染／トランスフェクション系はまた、Tomeiら、J. Virol. (1993) 67: 4017-4026およびSelbyら、J. Gen. Virol. (1993) 74: 1103-1113に記載されるように、本発明を伴う用途を見出す。この系において、細胞を、始めに、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス組換え体で、インビトロで感染させる。このポリメラーゼは、T7プロモーターを保有するテンプレートを転写するのみであるという点で、優れた特異性を示す。感染後、細胞を、T7プロモーターにより駆動される目的のDNAでトランスフェクトする。ワクシニアウイルス組換え体由来の細胞質において発現されるポリメラーゼは、このトランスフェクトされたDNAをRNAに転写し、このRNAは次いで、宿主翻訳機構によりタンパク質に翻訳される。あるいは、T7は、精製タンパク質として添加され得るか、または「前駆体」系の場合には酵素として添加される（StudierおよびMoffatt, J. Mol. Biol. (1986) 189: 113-130）。この方法は、多量のRNAおよびその翻訳産物の高レベルの一過性の細胞質生成を提供する。

【0143】

選択された発現系および宿主に依存して、VLPは、粒子形成ポリペプチドが発現されてVLPが形成され得る条件下で、発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を増殖することにより生成される。適切な増殖条件の選択は、当業者の範囲内である。VLPが細胞内で形成される場合、この細胞は、細胞を溶解するがVLPを実質的にインタクトなまま保つ、化学的手段、物理的手段または機械的手段を使用して破壊される。このような方法は、当業者に公知であり、そして例えば、Protein Purification

Applications: A Practical Approach (E. L. V. Harris および S. Angal 編、1990) に記載される。

【0144】

次いで、この粒子は、それらの完全性を保存する方法（例えば、勾配遠心分離（例えば、塩化セシウム（CsCl）スクロース勾配、ペレット化など）（例えば、Kirnbauerら、J. Virol. (1993) 67: 6939-6936を参照のこと）、ならびに標準的な精製技術（例えば、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィー）によって、単離される（または実質的に精製される）。

【0145】

本発明の合成発現カセットを含む細胞により生成されるVLPは、被験体に投与された場合に免疫応答を引き起こすために、使用され得る。本発明の1つの利点は、VLPが、以前には不可能であったレベルで、合成発現カセットを有する哺乳動物細胞により生成され得るということである。上記のように、このVLPは、Gagポリペプチド（例えば、Gag-プロテアーゼ、Gag-ポリメラーゼ、Env、合成Envなど）に加えて、種々の抗原を含み得る。本発明の合成発現カセットを使用して生成される、精製VLPは、通常はワクチン組成物の形態で、脊椎動物被験体に投与され得る。組み合わせワクチンもまた使用され得、ここで、このようなワクチンは、例えば、アジュバントサブユニットタンパク質（例えば、Env）を含む。投与は、単独で処方されたVLPまたは他の抗原と共に処方されたVLPを使用して、行われ得る。さらに、このVLPは、DNA免疫（以下を参照のこと）および／または他のワクチンの送達のための合成発現カセットの送達の前か、これと同時に、またはこれに続いて投与され得る。また、VLP投与の部位は、投与されている他のワクチン組成物と同じであっても異なってもよい。遺伝子送達は、多数の方法によって達成され得、この方法としては、DNA、アルファウイルスベクター、ポックスウイルスベクターおよびワクシニアウイルスベクターでの免疫が挙げられるが、これらに限定されない。

【0146】

VLP免疫刺激（または、ワクチン）組成物は、種々の賦形剤、アジュバント、キャリア、補助物質、調節剤などを含み得る。免疫刺激組成物は、免疫学的応答を開始するのに十分な量のVLP／抗原を含む。適切な有効量は、当業者によって決定され得る。このような量は、慣用的な試験により決定され得る比較的広い範囲内に含まれ、一般に、約0.1 μg～約1000 μg、より好ましくは約1 μg～約300 μgの程度のVLP／抗原の量である。

【0147】

キャリアが必要に応じて存在し、ここでこのキャリアは、組成物を受ける個体に対して有害な抗体の生成をそれ自体は引き起こさない分子である。適切なキャリアは、典型的には、ゆっくりと代謝される大きな高分子（例えば、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、高分子アミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集体（例えば、油滴またはリポソーム）、および不活性なウイルス粒子）である。粒子性キャリアの例としては、ポリメチルメタクリレートポリマーから誘導されるキャリア、ならびにポリ（ラクチド）およびポリ（ラクチド-co-グリコリド）（PLGとして公知）から誘導される微粒子が挙げられる。例えば、Jefferyら、Pharm. Res. (1993) 10: 362-368; McGee JPら、J. Microencapsul. 14 (2): 197-210, 1997; O'Hagan DTら、Vaccine 11 (2): 149-54, 1993を参照のこと。このようなキャリアは、当業者に周知である。さらに、これらのキャリアは、免疫刺激因子（「アジュバント」）として機能し得る。さらに、抗原は、細菌毒素（例えば、ジフテリア、テタヌス、コレラなど由来の毒素）、およびE. coli由来の毒素に結合され得る。

【0148】

アジュバントはまた、組成物の効力を増大するために使用され得る。このようなアジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：（1）アルミニウム塩（

ミョウバン) (例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど) ; (2) 水中油型エマルジョン処方物 (ムラミルペプチド (以下を参照のこと) または細菌細胞壁成分のような他の特定の免疫刺激因子を含むかまたは含まない) (例えば、(a) MF59 (国際公開番号WO90/14837) (これは5% スクアレン、0.5% Tween 80 および0.5% Span 85 を含む (必要に応じて種々の量のMTP-PEを含む (以下を参照のこと) が、必要ではない)、Model 110Y マイクロフルイダイザー (Microfluidics, Newton, MA) のようなマイクロフルイダイザーを使用してサブミクロンの粒子に処方される)、(b) SAF (これは、10% スクアレン、0.4% Tween 80、5% プルロニックブロックポリマー (pluronic-blocked Polymer) L121、およびthr-MDP (以下を参照のこと) を含む、サブミクロンエマルジョンに微小流体化されるか、または大きな粒子サイズのエマルジョンを作製するためにボルテックスされるかのいずれかである)、および(c) RibiTTM アジュバント系 (RAS) (Rib Immunochem, Hamilton, MT) (これは2% スクアレン、0.2% Tween 80、およびモノホスホリルリピド A (MPL)、トレハロースジミコレート (TDM) および細胞壁骨格 (CWS) からなる群から選択される1つ以上の細菌細胞壁成分 (好ましくは、MPL+CWS (DetoxTM) を含む)) ; (3) StimulonTM (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) のようなサポニンアジュバントが使用され得るか、またはこれから作製された粒子 (例えば、ISCOM (免疫刺激複合体) が使用され得る ; (4) 完全フロイントアジュバント (CFA) および不完全フロイントアジュバント (IFA) ; (5) サイトカイン (例えば、インターロイキン (IL-1、IL-2 など)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、腫瘍壊死因子 (TNF) など ; (6) 免疫刺激性 CpG モチーフをコードするオリゴヌクレオチドまたはポリマー分子 (Davis, H. L. ら、J. Immunology 160:870-876, 1998 ; Sato, Y. ら、Science 273:352-354, 1996)、または抗原/オリゴヌクレオチドの複合体 {ポリマー分子は、二本鎖および一本鎖のRNA およびDNA、それらの骨格改変体 (例えば、メチルホスホネート結合) を含む ; あるいは (7) 細菌ADP-リボシル化毒素 (LT) (例えば、コレラ毒素 (CT)、百日咳毒素 (PT) もしくはE. coli 熱不安定性毒素 (LT)、特に、LT-K63 (ここでリジンが、63位の野生型アミノ酸と置換される)、LT-R72 (ここでアルギニンが、72位の野生型アミノ酸と置換される)、CT-S109 (ここでセリンが、109位の野生型アミノ酸と置換される)、およびPT-K9/G129 (ここでリジンが、9位の野生型アミノ酸と置換され、グリシンが129位で置換される)) の無毒化変異体 (例えば、国際公開番号WO93/13202 およびWO92/19265 を参照のこと) ; および (8) 免疫刺激因子として働き、組成物の効力を増大する他の物質。さらに、このようなポリマー分子は、代替のポリマー骨格構造 (例えば、ポリビニル骨格 (Pitha, Biochem Biophys Acta, 204:39, 1970a ; Pitha, Biopolymers, 9:965, 1970b)、およびモルホリノ骨格 (Summerton, J. ら、米国特許第5, 142, 047号、08/25/92 発行 ; Summerton, J. ら、米国特許第5, 185, 444号、02/09/93 発行) (これらに限定されない)) を含む。種々の他の電荷および無電荷のポリヌクレオチドアナログが報告されている。多数の骨格修飾が当該分野で公知であり、この修飾には、無電荷結合 (例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデートおよびカルバメート) および電荷結合 (例えば、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエート) が挙げられるが、これらに限定されない。} ; ならびに (7) 免疫刺激因子として働いてVLP免疫刺激 (またはワクチン) 組成物の有効性を増大する他の物質。ミョウバン、CpGオリゴヌクレオチドおよびMF59 が好ましい。

【0149】

ムラミルペプチドとしては、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグル

タミン (t h r - M D P)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (n o r - M D P)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン (M T P - P E) などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0150】

V L P 組成物を用いる投薬処置は、単回用量スケジュールまたは複数用量スケジュールであり得る。複数用量スケジュールは、ワクチン接種の一次過程に、1~10の別個の用量が用いられ、続いて他の用量が後の時間間隔（これは、免疫応答を維持および／または強化するように選択される、例えば、第2の用量について1~4ヶ月）で与えられ、そして必要に応じて、数ヶ月後に引き続く用量（単数または複数）が与えられる、スケジュールである。投薬レジメンはまた、少なくとも部分的に、被験体の要求によって決定され、そしてこれは、医師の判断に依存する。

10

【0151】

疾患の予防が所望される場合、抗原保有 V L P は一般に、目的の病原体の一次感染の前に投与される。処置（例えば、症状および再発の減少）が所望される場合、V L P 組成物は一般に、一次感染の後に投与される。

【0152】

(2. 3. 2 パッケージング細胞株を作製するための本発明の合成発現カセットの使用)

20

多数のウイルスベースの系は、哺乳動物宿主細胞に対する遺伝子移入ベクターとして使用するために開発されてきた。例えば、レトロウイルス（特に、レンチウイルスベクター）は、遺伝子送達系に好都合なプラットフォームを提供する。目的のコード配列（例えば、遺伝子治療の用途に有用な配列）は、遺伝子送達ベクターに挿入され得、当該分野で公知の技術を使用してレトロウイルス粒子中にパッケージングされる。次いで、組換えウイルスが単離され、そしてインビボまたはエキソビボのいずれかで、被験体の細胞に送達され得る。多数のレトロウイルス系は、例えば、以下に記載される：米国特許第5, 219, 740号；Millerら(1989) BioTechniques 7:980；Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5；Scarpaら(1991) Virology 180:849；Burnsら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033；Boris-Lawrieら、(1993) Cure. Opin. Genet. Develop. 3:102；GB 2200651；EP 0415731；EP 0345242；WO 89/02468；WO 89/05349；WO 89/09271；WO 90/02806；WO 90/07936；WO 90/07936；WO 94/03622；WO 93/25698；WO 93/25234；WO 93/11230；WO 93/10218；WO 91/02805；U. S. 5, 219, 740；；U. S. 4, 405, 712；U. S. 4, 861, 719；U. S. 4, 980, 289およびU. S. 4, 777, 127；米国出願番号07/800, 921；およびVile(1993) Cancer Res 53:3860-3864；Vile(1993) Cancer Res 53:962-967；Ram(1993) Cancer Res 53:83-88；Takamiya(1992) J Neurosci Res 33:493-503；Baba(1993) J Neurosurg 79:729-735；Mann(1983) Cell 33:153；Cane(1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:6349；ならびにMiller(1990) Human Gene Therapy 1。

30

40

【0153】

他の実施形態において、遺伝子移入ベクターは、サイトカインまたは他の免疫調節性分子をコードするように構築され得る。例えば、ネイティブの I L - 2 および γ - インターフェロンをコードする核酸配列は、それぞれ、米国特許第4, 738, 927号および同

50

第5, 326, 859号に記載される様にして、得られ得、一方、これらのタンパク質の有用なムテインは、米国特許第4, 853, 332号に記載されるようにして得られ得る。mCSFの短い形態および長い形態をコードする核酸配列は、それぞれ、米国特許第4, 847, 201号および同第4, 879, 227号に記載されるようにして得られ得る。本発明の特定の局面において、サイトカインを発現するレトロウイルスベクターまたは免疫調節性遺伝子は、本明細書中（例えば、本発明のパッケージング細胞株を使用する）および国際出願番号PCT US 94/02951（表題「Compositions and Methods for Cancer Immunotherapy」）に記載されるようにして、生成され得る。

【0154】

本明細書中で使用するために適切な免疫調節性分子の例としては、以下が挙げられる：IL-1およびIL-2（Karupiahら、（1990）J. Immunology 144:290-298, Weberら、（1987）J. Exp. Med. 166:1716-1733, Gansbacherら、（1990）J. Exp. Med. 172:1217-1224および米国特許第4, 738, 927号）；IL-3およびIL-4（Tepperら、（1989）Cell 503-512, Golumbekら、（1991）Science 254:713-716および米国特許第5, 017, 691）；IL-5およびIL-6（Brakenhofら（1987）J. Immunol. 139:4116-4121および国際公開番号WO90/06370）；IL-7（米国特許第4, 965, 195号）；IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12およびIL-13（Cytokine Bulletin, Summer 1994）；IL-14およびIL-15； α -インターフェロン（Finterら、（1991）Drugs 42:749-765, 米国特許第4, 892, 743号および同第4, 966, 843号、国際公開番号WO85/02862, Nagataら（1980）Nature 284:316-320, Familettaら（1981）Methods in Enz. 78:387-394, Twuら（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2046-2050, およびFaktorら、（1990）Oncogene 5:867-872）； β -インターフェロン（Seifら、（1991）J. Virol. 65:664-671）； γ -インターフェロン（Radfordら（1991）The American Society of Hepatology 20082015, Watanabeら（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9456-9460, Gansbacherら（1990）Cancer Research 50:7820-7825, Maioら、（1989）Can. Immunol. Immunother. 30:34-42、ならびに米国特許第4, 762, 791号および同第4, 727, 138号）；G-CSF（米国特許第4, 999, 291号および同第4, 810, 643号）；GM-CSF（国際公開番号WO85/04188）。

【0155】

免疫調節性因子はまた、これらの分子に対するアゴニスト、アンタゴニストまたはリガンドであり得る。例えば、可溶性形態のレセプターは、しばしば、変異形態の因子自体と同様に、これらの型の因子に対するアンタゴニストとして挙動し得る。

【0156】

上記の基質をコードする核酸分子、本発明での使用に有利である他の核酸分子は、種々の供給源（例えば、American Type Collectionのような寄託所を含む）から、またはBritish Bio-Technology Limited（Cowley, Oxford England）のような商業的供給源から容易に得られ得る。代表的な例としては、BBG12（127個のアミノ酸の成熟タンパク質をコードするGM-CSF遺伝子を含む）、BBG6（これは、 γ インターフェロンをコードする配列を含む）、A. T. C. C. 寄託番号39656（これは、TNFをコードする配列を含む）、A. T. C. C. 寄託番号20663（これは、 α インターフェロンをコー

10

20

30

40

50

ドする配列を含む)、A. T. C. C. 寄託番号31902、31902および39517 (これは、βインターフェロンをコードする配列を含む)、A. T. C. C. 寄託番号67024 (これは、インターロイキン1bをコードする配列を含む)、A. T. C. C. 寄託番号39405、39452、39516、39626および39673 (これは、インターロイキン2をコードする配列を含む)、59399、59398および67326 (これは、インターロイキン3をコードする配列を含む)、A. T. C. C. 寄託番号57592 (これは、インターロイキン4をコードする配列を含む)、A. T. C. C. 寄託番号59394および59395 (これは、インターロイキン5をコードする配列を含む)、ならびにA. T. C. C. 寄託番号67153 (これは、インターロイキン6をコードする配列を含む) が挙げられる。

10

【0157】

サイトカイン遺伝子または免疫調節遺伝子を含むプラスミド (国際公開番号WO94/02951およびWO96/21015) は、適切な制限酵素で消化され得、そして目的の特定の遺伝子を含むDNAフラグメントは、標準的な分子生物学的技術 (例えば、Sambrookら、前出、またはAusbelら (編) Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing and Wiley-Interscience) を使用して、遺伝子伝達ベクターに挿入され得る。

【0158】

上記の分子をコードするポリヌクレオチド配列は、例えば、遺伝子を発現するcDNAおよびゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、またはこれを含むことで公知のベクターから遺伝子を誘導することによって得られ得る。例えば、変更された細胞産物をコードする配列を含むプラスミドは、A. T. C. C. のような寄託所からまたは商業的供給源から得られ得る。目的のヌクレオチド配列を含むプラスミドは、適切な制限酵素で消化され得、そしてこのヌクレオチドを含むDNAフラグメントは、標準的な分子生物学的な技術を使用して遺伝子伝達ベクターに挿入され得る。

20

【0159】

あるいは、本発明での使用のためのcDNA配列は、標準的な技術 (例えば、フェノール抽出およびcDNAまたはゲノムDNAのPCR) を使用して、配列を発現するか、または含む細胞から得られ得る。例えば、Sambrookら、前出 (DNAを得るためおよびDNAを単離するために使用される技術の記載) を参照のこと。簡潔には、目的の遺伝子を発現する細胞由来のmRNAは、オリゴdTまたはランダムポリマーを使用して、逆転写酵素で逆転写され得る。次いで、この単鎖cDNAは、所望の配列のいずれかの側の配列に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、PCRによって増幅され得る (米国特許第4,683,202号、銅第4,683,195号、および同第4,800,159号を参照のこと、またPCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich (編), Stockton Press, 1989を参照のこと)。

30

【0160】

目的のヌクレオチド配列はまた、DNA合成器 (例えば、Applied Biosystems Model 392 DNA Synthesizer (ABI、Foster City, Californiaから市販されている)) を使用して、クローン化ではなく合成により生成され得る。このヌクレオチド配列は、所望される発現産物の適切なコドンを用いて設計され得る。完全な配列が、標準的な方法によって調製されたオーバーラップオリゴヌクレオチドから構築され、そして完全なコード配列に構築される。例えば、Edge (1981) Nature 292:756; Nambairら (1984) Science 223:1299; Jayら (1984) J. Biol. Chem. 259:6311を参照のこと。

40

【0161】

本発明の合成発現カセットは、レンチウイルスベクターを使用するために、パッケージ

50

ング細胞株を構築において使用され得る。

【0162】

1つの型のレトロウイルス、マウスの白血病ウイルス、または「MLV」は、遺伝子治療適用のために広範に利用されている（一般に、Mannら（Cell 133:153, 1993）、CaneおよびMulligan（Proc, Nat'l Acad. Sci. USA 81:6349, 1984）、ならびにMillerら、Human Gene Therapy 1:5-14, 1990を参照のこと）。

【0163】

レンチウイルスベクターは、代表的に、5'レンチウイルスLTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、1個以上の目的の遺伝子に作動可能に連結したプロモーター、第2のDNA鎖合成の起点、3'レンチウイルスLTRを含み、ここで、このレンチウイルスベクターは、核輸送エレメントを含む。この核輸送エレメントは、目的のコード配列（例えば、目的の合成Gagまたは合成Envの発現カセット）の上流（5'）または下流（3'）のいずれかに配置され得る。特定の実施形態において、核輸送エレメントは、RREではない。一実施形態において、パッケージングシグナルは、伸長されたパッケージングシグナルである。他の実施形態において、このプロモーターは、組織特異的なプロモーターであるか、あるいはCMVのようなプロモーターである。他の実施形態において、このレンチウイルスベクターは、内部リボソーム導入部位（entry site）をさらに含む。

【0164】

広範な種々のレンチウイルスは、本発明の範囲内で利用され得、これには、例えば、HIV、HIV-1、HIV-2、FIVおよびSIVからなる群から選択されるレンチウイルスが挙げられる。

【0165】

本発明の一実施形態において、合成Gagポリメラーゼ発現カセット（プロモーター、ならびに合成Gagポリメラーゼおよびvpr、vpu、nefまたはvifのうち少なくとも1個をコードする配列を含む）が提供され、ここで、このプロモーターは、Gagポリメラーゼおよびvpr、vpu、nefまたはvifに作動可能に連結される。

【0166】

本発明のなお別の局面において、宿主細胞（例えば、パッケージング細胞株）（本明細書中に記載される発現カセットのいずれかを含む）が、提供される。例えば、一局面内において、パッケージング細胞株（合成Gagポリメラーゼをコードする配列、および核輸送エレメントを含む発現カセットを含む）が、提供され、ここで、このプロモーターは、Gagポリメラーゼをコードする配列に作動可能に連結される。パッケージング細胞株は、tat、rev、またはエンベロープを含むプロモーターおよび配列をさらに含み得、ここで、このプロモーターは、tat、rev、Envをコードする配列、またはこれらのタンパク質の改変バージョンをコードする配列に作動可能に連結される。このパッケージング細胞株は、nef、vif、vpuまたはvpr（野生型または合成）のうちいずれか1つ以上をコードする配列をさらに含み得る。

【0167】

一実施形態において、発現カセット（例えば、合成Gagポリメラーゼを保有する）は、安定的に組み込まれる。このパッケージング細胞株は、レンチウイルスベクターの導入により、代表的に粒子を生成する。この合成発現カセットのプロモーター調節発現は、誘導性であり得る。代表的に、このパッケージング細胞株は、レンチウイルスベクターの導入により、複製コンピテントウイルスを本質的に含まない粒子を生成する。

【0168】

パッケージング細胞株（合成Gagポリメラーゼ遺伝子の発現を指向する発現カセットを含むか、または本明細書中に記載される合成Env遺伝子の発現を指向する発現カセットを含む）が、提供される。（他の改変Env配列の記載に関して、Andre, S.ら、Journal of Virology 72(2):1497-1503, 199

8 ; Haas, J. ら、Current Biology 6 (3) : 315-324、1996も参照のこと)。レンチウイルスベクターは、ベクター産生細胞株を産生するためにパッケージング細胞株に導入される。

【0169】

上記のように、レンチウイルスベクターは、目的の選択された遺伝子または配列を保有または発現するように設計され得る。レンチウイルスベクターは、広範の種々のレンチウイルスから容易に構築され得る (RNA Tumor Viruses, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985を参照のこと)。レンチウイルスの代表的な例としては、HIV、HIV-1、HIV-2、FIVおよびSIVが挙げられる。このようなレンチウイルスは、患者の単離物から、またはより好ましくは、the American Type Culture Collectionのような寄託機関または収集機関から得られるか、あるいは、利用可能な技術を使用して公知の供給源から単離されるかのいずれかである。

10

【0170】

レンチウイルス遺伝子送達ベクター (またはビヒクル) の部分は、異なるウイルス由来であり得る。例えば、所定の組換えレンチウイルスベクターにおいて、LTRは、HIV、SIV由来のパッケージングシグナル、およびHIV-2由来の第2の鎖合成の起点由来であり得る。レンチウイルスベクター構築物は、5' レンチウイルスLTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、1以上の異種配列、第2のDNA鎖合成の起点、および3' LTRを含み得、ここで、このレンチウイルスベクターは、RREではない核輸送エレメントを含む。

20

【0171】

簡潔には、末端繰返し配列 (「LTR」) は、U5、RおよびU3と命名された3つのエレメントに分けられる。これらのエレメントは、レトロウイルスの生物学的な活性に寄与する種々のシグナルを含み、これには、例えば、U3内に配置されるプロモーターエレメントおよびエンハンサーエレメントが挙げられる。LTRは、このゲノムのいずれかの末端でのそれらの正確な複製に起因して、プロウイルス (組み込まれたDNA形態) において容易に同定され得る。本明細書中で使用される場合、5' LTRは、5' プロモーターエレメントおよび十分なLTR配列を含み、逆転写およびこのベクターのDNA形態の組み込みを可能にすることが理解されるべきである。この3' LTRは、ポリアデニル化シグナル、および十分なLTR配列を含み、逆転写およびこのベクターのDNA形態の組み込みを可能にすることが理解されるべきである。

30

【0172】

tRNA結合部位および第2のDNA鎖合成の起点はまた、レトロウイルスが生物学的に活性となるのに重要であり、そして当業者によって容易に同定され得る。例えば、レトロウイルスは、Watson-Crick塩基対によってtRNA結合部位に結合し、そしてウイルス粒子中にこのレトロウイルスゲノムを運搬する。次いでこのtRNAは、逆転写酵素によってDNA合成のためのプライマーとして利用される。このtRNA結合部位は、5' LTRからちょうど下流の位置に基づいて容易に同定され得る。同様に、第2のDNA鎖合成の起点は、その名前から暗示されるように、レトロウイルスの第2のDNA鎖合成のために重要である。この領域 (この領域は、ポリプリントラクト (tract) との呼ばれる) は、3' LTRのちょうど上流に位置する。

40

【0173】

5' LTRおよび3' LTR、tRNA結合部位、および第2のDNA鎖合成の起点に加えて、組換えレトロウイルスベクター構築物はまた、パッケージングシグナル、および目的の1つ以上の遺伝子またはコード配列を含み得る。さらに、このレンチウイルスは、核輸送エレメント (好ましい実施形態において、RREではない) を有する。適切な核輸送エレメントの代表的な例としては、ラウス肉腫ウイルスのエレメント (Ogertr、J Virol 70、3834-3843、1996)、ラウス肉腫ウイルスのエレメント (Liu & Mertz、Genes & Dev.、9、1766-1789、

50

1995) およびシミアンレトロウイルス I 型のゲノムのエレメント (Zolotukhin ら、J Virol. 68、7944-7952、1994) が挙げられる。他の潜在的なエレメントとしては、ヒストン遺伝子のエレメント (Kedes、Annu. Rev. Biochem. 48、837-870、1970)、 α -インターフェロン遺伝子 (Nagata ら、Nature 287、401-408、1980)、 β -アドレナリン作用性レセプター遺伝子 (Koilka ら、Nature 329、75-79、1987)、ならびに c-Jun 遺伝子 (Hattorie ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85、9148-9152、1988) が挙げられる。

【0174】

組換えレンチウイルスベクターは、代表的に、Gag ポリメラーゼコード配列および Env コード配列の両方を欠失している。組換えレンチウイルスベクターは、代表的に、20 個未満、好ましくは、15 個、より好ましくは、10 個、そして最も好ましくは、8 個の連続したヌクレオチド (Gag ポリメラーゼおよび Env 遺伝子中に見出される) を含む。本発明の 1 つの利点は、合成 Gag ポリメラーゼ発現カセット (これは、組換えレトロウイルスベクター構築のためにパッケージング細胞株を構築するために使用され得る) が、野生型 Gag ポリメラーゼ配列に対してほとんど相同性を有さず、従って、合成配列と野生型配列との間の相同組換えの可能性をかなり減少または排除することである。

【0175】

レンチウイルスベクターはまた、目的の 1 個以上の遺伝子または配列の発現を駆動する組織特異的プロモーターを含み得る。

【0176】

レンチウイルスベクター構築物は、目的の 1 個以上の遺伝子発現されるように生成され得る。これは、ジシストロンカセットまたはオリゴシストロンカセット (例えば、このコード領域は、80 個以下のヌクレオチドによって分離される (一般的に、Levin ら、Gene 108:167-174、1991 を参照のこと)) の使用を介して、または内部リボソーム導入部位 (IRES) の使用を介して達成され得る。

【0177】

上記の組換えレトロウイルスベクター構築物と共に使用するのに適したパッケージング細胞株は、本明細書中で提供される開示から容易に調製され得る。簡潔に、このパッケージング細胞株が由来する親の細胞株は、種々の哺乳動物の細胞株から選択され得、これには、例えば、293、RD、COS-7、CHO、BHK、VERO、HT1080、および骨髓腫細胞が挙げられる。

【0178】

パッケージング細胞株の生成のために適切な宿主細胞の選択後、1 個以上の発現カセットが、欠失されているベクター成分をトランスで捕捉または供給するために、細胞株中に導入される。

【0179】

適切な発現カセットの代表的な例は、本明細書中に記載されており、そして合成 Env、合成 Gag、合成 Gag プロテアーゼ、および合成 Gag ポリメラーゼの発現カセットを含み、これらは、プロモーター、ならびに、例えば、Gag ポリメラーゼおよび vpr、vpu、nef または vif のうち少なくとも 1 個をコードする配列を含み、ここで、このプロモーターは、Gag ポリメラーゼおよび vpr、vpu、nef または vif に作動可能に連結される。上記のように、ネイティブなコード配列および/または合成コード配列はまた、これらの発現カセットにおいて利用され得る。

【0180】

上記の発現カセットを利用することにより、広範な種々のパッケージング細胞株が産生され得る。例えば、一局面において、パッケージング細胞株 (合成 Gag ポリメラーゼをコードする配列、および核輸送エレメントを含む発現カセットを含む) が、提供され、ここで、このプロモーターは、Gag ポリメラーゼをコードする配列に作動可能に連結され

る。他の局面において、パッケージング細胞株（プロモーター、および *tat*、*rev*、*Env*、もしくは他の *HIV* 抗原、またはそれら由来のエピトープをコードする配列を含む）が、提供され、ここで、このプロモーターは、*tat*、*rev*、*Env*、もしくは他の *HIV* 抗原またはエピトープをコードする配列に作動可能に連結される。さらなる実施形態において、このパッケージング細胞株は、*nef*、*vif*、*vpu* または *vpr* のうちいずれか 1 個以上をコードする配列を含み得る。例えば、このパッケージング細胞株は、*nef*、*vif*、*vpu* または *vpr* 単独、*nef* と *vif*、*nef* と *vpu*、*nef* と *vpr*、*vif* と *vpu*、*vif* と *vpr*、*vpu* と *vpr*、*nef*、*vif* と *vpu*、*nef*、*vif* と *vpr*、*nef*、*vpu* と *vpr*、*vif*、*vpu* と *vpr*、または *nef*、*vif*、*vpu* と *vpr* の 4 つ全てのみを含み得る。

10

【0181】

1 つの実施形態において、この発現カセットは、安定的に組み込まれる。別の実施形態において、このパッケージング細胞株は、レンチウイルスベクターの組み込みにより、粒子を生成する。さらなる実施形態において、このプロモーターは、誘導性である。本発明の特定の好ましい実施形態において、このパッケージング細胞株は、レンチウイルスベクターの導入により、複製コンピテントウイルスを含まない粒子を生成する。

【0182】

改変されたコード配列を含む合成カセットは、選択された細胞株にトランスフェクトされる。（i）代表的に、*HIV* コード配列の組み込まれた安定的なコピーを保有し、そして（ii）これらのポリペプチドの受容可能なレベルを発現する、トランスフェクトされた細胞が選択される（発現は、当該分野で公知の方法により評価され得る（例えば、実施例 1～4 を参照のこと））。この細胞株が *VL P* を産生する能力はまた、変化し得る。

20

【0183】

目的の配列は、上記のように適切なウイルスベクター中に構築される。次いで、この不完全なウイルスは、パッケージング細胞株にトランスフェクトされる。このパッケージング細胞株は、ウイルス用粒子を産生するのに必要なウイルス性機能を提供し、この粒子に目的の配列を含む不完全なウイルスゲノムをパッケージングする。次いで、これらの *VL P* が単離され、そして例えば、遺伝子送達または遺伝子治療に使用され得る。

【0184】

さらに、このようなパッケージング細胞株はまた、*VL P* のみを産生するために使用され得、この *VL P* は、例えば、他の抗原と共に投与するためのアジュバンドとして、またはワクチン組成物に使用され得る。また、パッケージング細胞株中の、ポリペプチド（例えば、抗原）をコードする選択された目的の配列の同時発現はまた、結果として、この選択されたポリペプチドの *VL P* 中への包埋および／またはこの選択されたポリペプチドの *VL P* との結合を生じ得る。

30

【0185】

本発明の異なる実施形態の種々の形態（例えば、構築物）が、組み合わせられ得る。

【0186】

（2. 4 DNA 免疫および遺伝子送達）

種々の *HIV* ポリペプチド抗原、特に C 型 *HIV* 抗原は、本発明の粒子中で使用され得る。*HIV* 抗原は、DNA 免疫構築物中に含まれ得、この構築物は、例えば、インフレーション中で、ポリペプチド抗原（合成または野生型）のコード配列に融合される合成 *Gag* 発現カセットを含み、この構築物の発現により、目的の抗原を提示する *VL P* が得られる。

40

【0187】

本発明の実施に使用される特定の目的の *HIV* 抗原としては、*tat*、*rev*、*nef*、*vif*、*vpu*、*vpr* および他の *HIV* 抗原またはそれら由来のエピトープが挙げられる。これらの抗原は、合成（本明細書中で記載される）または野生型であり得る。さらに、パッケージング細胞株は、以下を含む：*nef* のみ、および *HIV-1*（*HTLV-III*、*LAV*、*ARV* などとしても知られる）（例えば、*gp120*、*gp41*、*gp160*（ネイティブおよび改変体の両方）が挙げられるが、これらに限定されない）；*G*

50

ag ; ならびに種々の単離体由来の pol (多様なサブタイプ由来の HIV₁_{IIIB}、HIV_{SF2}、HIV-1_{SF162}、HIV-1_{SF170}、HIV_{LAV}、HIV_{LA1}、HIV_{MN}、HIV-1_{CM235}、HIV-1_{US4}、種々のサブタイプ (例えば、サブタイプ A~G、および O) 由来の他の HIV-1 株、HIV-2 株および種々のサブタイプ (例えば、HIV-2_{UC1} および HIV-2_{UC2}) が挙げられるが、これらに限定されない)。例えば、Myers ら、Los Alamos Database、Los Alamos National Laboratory、Los Alamos、New Mexico ; Myers ら、Human Retroviruses and Aids、1990、Los Alamos、New Mexico ; Los Alamos National Laboratory を参照のこと。

10

【0188】

効力を評価するために、本発明の合成発現カセットを使用して有効な DNA 免疫が実施され得、例えば、実施例 4 に記載されるように実施され得る。マウスは、Gag (および/または Env) 合成発現カセットならびに Gag (および/または Env) 野生型発現カセットの両方で免疫される。プラスミド DNA を用いたマウスの免疫化は、この合成発現カセットがネイティブな発現カセットに対して免疫原性の明瞭な改良を提供することを示す。また、第 2 のブースト免疫は、例えば、約 2 週間後に、第 2 の免疫応答を誘導する。さらに、CTL アッセイの結果は、DNA 免疫化による細胞毒性 T リンパ球 (CTL) 応答の誘導について、合成 Gag (および/または Env) 発現カセットの増強した効力を示す。

20

【0189】

本発明は、広範の種々の抗原に対する免疫応答を固定し、そしてこれにより、HIV 感染、特に C 型 HIV 感染を処置または予防するために使用され得ることが容易に明らかである。

【0190】

(2. 4. 1 本発明の合成発現カセットの送達)

上記の分子をコードするポリヌクレオチド配列は、組換え方法を使用して、例えば、この遺伝子を発現する細胞からの cDNA およびゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、または遺伝子を含むことが知られているベクターから遺伝子を誘導することによって、得られ得る。さらに、所望の遺伝子は、標準的な技術 (例えば、cDNA またはゲノム DNA のフェノール抽出および PCR) を使用して、この遺伝子を含む細胞および組織から直接的に単離され得ることが容易に理解される。DNA を得るためおよび単離するために使用される技術の記載について、例えば、Sambrook ら、前出を参照のこと。目的の遺伝子はまた、クローン化ではなく、合成により産生され得る。このヌクレオチド配列は、所望される特定のアミノ酸配列について、適切なコドンで設計され得る。一般に、配列が発現される、意図される宿主に対して、好ましいコドンを選択する。完全な配列は、標準的な方法によって調製されるオーバーラップオリゴヌクレオチドから構築され、そして完全なコード配列へと構築される。例えば、Edge、Nature (1981) 292:756 ; Nambair ら、Science (1984) 223:1299 ; Jay ら、J. Biol. Chem. (1984) 259:6311 ; Stemmer、W. P. C.、(1995) Gene 164:49~53 を参照のこと。

30

40

【0191】

次に、所望の抗原をコードする遺伝子配列は、本発明の合成発現カセットを含むベクターに挿入され得る。特定の実施形態において、抗原は、Gag コード配列に挿入され、その結果、複合配列が発現される場合に、Gag ポリペプチドおよび目的の抗原 (例えば、Env (ネイティブまたは改変体) または HIV 由来の他の抗原 (ネイティブまたは改変体)) を含む VLP の産物を生じる。挿入は、コード配列内またはコード配列のいずれかの末端 (発現された Gag ポリペプチドの 5' アミノ末端 ; または発現された Gag ポリペプチドの 3' カルボキシル末端) で作製され得る (Wagner, R ら、Arch Virol. 127:117-137、1992 ; Wagner, R. ら、Virolog

50

y 200:162-175、1994; Wu, X. ら、J. Virol. 69 (6): 3389-3398、1995; Wang, C-T. ら、Virology 200:524-534、1994; Chazal, N. ら、Virology 68 (1): 111-122、1994; Griffiths, J. C. ら、J. Virol. 67 (6): 3191-3198、1993; Reicin, A. S. ら、J. Virol. 69 (2): 642-650、1995)。

【0192】

p55 Gag のコード配列の50%までは、ウイルス様粒子への構築および発現効率に影響を与えることなく欠失され得る (Borsetti, A. ら、J. Virol. 72 (11): 9313-9317、1998; Gamier, L. ら、J Virol 72 (6): 4667-4677、1998; Zhang, Y. ら、J Virol 72 (3): 1782-1789、1998; Wang, C. ら、J Virol 72 (10): 7950-7959、1998)。本発明の一実施形態において、合成Gag発現カセットを発現する高いレベルの免疫原性は、異なる構造または非構造のHIV抗原、マルチエピトープカセット、またはサイトカイン配列をGag配列の欠失領域に挿入することによって増加され得る。このような欠失は、本発明の技術および当業者に利用可能な情報に従って作製され得る。異種ポリペプチドに融合された全長配列を使用するのに対する、本アプローチの1つの可能な利点は、発現産物のより高い発現効率/分泌効率であり得る。

【0193】

配列が、Gagのアミノ末端に付加される場合、ポリヌクレオチドは、ミリスチン部分のGag含有ポリペプチドへの付加のためのシグナルをコードする、5'末端のコード配列(例えば、Met-Glyをコードする配列)を含み得る。

【0194】

Gag含有ポリペプチド構築物がVLPを形成する能力は、本明細書の教示に従って実験的に決定され得る。

【0195】

合成発現カセットはまた、コード配列に作動可能に連結された制御エレメントを含み得、これは、目的の種においてインビボで遺伝子の発現を可能にする。例えば、哺乳動物細胞発現の代表的なプロモーターとしては、特に、SV40初期プロモーター、CMVプロモーター(例えば、CMV極初期プロモーター)、マウス乳腺ガンウイルスLTRプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター(Ad MLP)、および単純疱疹ウイルスプロモーターが挙げられる。他の非ウイルスプロモーター(例えば、マウスメタロチオネイン(metallothionein)遺伝子)に由来するプロモーター)はまた、哺乳動物発現についての使用を見出す。代表的には、転写終止およびポリアデニル化配列もまた存在し、翻訳終止コドンの3'側に位置する。好ましくは、翻訳の開始の最適化のための配列(コード配列の5'側に配置する)もまた存在する。転写ターミネーター/ポリアデニル化シグナルの例としては、上記Sambrookらに記載される、SV40由来のもの、ならびにウシ成長ホルモントーミネーター配列が挙げられる。

【0196】

エンハンサーエレメントはまた、哺乳動物構築物の発現レベルを増加するために本明細書中で使用され得る。例としては、SV40初期遺伝子エンハンサー(Dijkemaら、EMBO J. (1985) 4: 761に記載される)、Rous Sarcomaウイルスの長い末端反復(LTR)から誘導されるエンハンサー/プロモーター(Gormanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79: 6777に記載される)およびヒトCMVに由来するエレメント(Boshartら、Cell (1985) 41: 521に記載される)(例えば、CMVイントロンA配列に含まれるエレメント)が挙げられる。

【0197】

さらに、キメラ抗原-コード遺伝子配列を含み、例えば、1つより多くのウイルス単離

10

20

30

40

50

体に由来する、例えば、目的の複数抗原／エピトープをコードする、プラスミドが構築され得る。

【0198】

代表的には、抗原コード配列は、合成コード配列より先にあるか、合成コード配列に続き、そしてキメラ転写ユニットは、目的の抗原および合成コード配列の両方をコードする単一のオープンリーディングフレームを有する。あるいは、複数シストロンカセット（例えば、二シストロンカセット）が構築され得、EMCV IRESなどを使用して、単一のmRNAから複数の抗原の発現を可能にする。

【0199】

一旦完了すると、構築物は、標準的な遺伝子送達プロトコルを使用して、核酸免疫化のために使用される。遺伝子送達のための方法は、当該分野において公知である。例えば、米国特許第5,399,346号、同第5,580,859号、同第5,589,466号を参照のこと。遺伝子は、直接、脊椎動物被験体に送達されるか、あるいは、被験体由来の細胞に、エキソビボに送達され、そして細胞が被験体に再移植され得るかのいずれかであり得る。

【0200】

多数のウイルスに基づく系が、哺乳動物細胞への遺伝子移入のために開発された。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための従来のプラットフォームを提供する。選択された配列は、ベクターに挿入され得、そして当該分野で公知の技術を使用してレトロウイルス粒子にパッケージングされ得る。次いで、組換えウイルスは、単離され、そしてインビボまたはエキソビボのいずれかで、被検体の細胞に送達される。多数のレトロウイルス系が記載されている（米国特許第5,219,740号；MillerおよびRosman, BioTechniques (1989) 7:980-990；Miller, A. D., Human Gene Therapy (1990) 1:5-14；Scarpあら、Virology (1991) 180:849-852；Burnsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:8033-8037；ならびにBoris-LawrieおよびTemin, Cur. Opin. Genet. Develop. (1993) 3:102-109）。

【0201】

多数のアデノウイルスベクターがまた記載されている。宿主ゲノムに組み込まれるレトロウイルスとは異なり、アデノウイルスは、挿入変異に関連する危険を染色体的に最小化し続ける（Haj-AhmadおよびGraham, J. Virol. (1986) 57:267-274；Bettrら、J. Virol. (1993) 67:5911-5921；Mitterederら、Human Gene Therapy (1994) 5:717-729；Sethら、J. Virol. (1994) 68:933-940；Barrら、Gene Therapy (1994) 1:51-58；Berkner, K. L. BioTechniques (1988) 6:616-629；ならびにRichら、Human Gene Therapy (1993) 4:461-476）。

【0202】

さらに、種々のアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター系は、遺伝子送達のために開発されている。AAVベクターは、当該分野で周知の技術を使用して容易に構築され得る。例えば、米国特許第5,173,414号および同第5,139,941号；国際公開番号WO 92/01070（1992年1月23日公開）およびWO 93/03769（1993年3月4日公開）；Lebkowskiら、Molec. Cell. Biol. (1988) 8:3988-3996；Vincentら、Vaccines 90 (1990) (Cold Spring Harbor Laboratory Press)；Carter, B. J. Current Opinion in Biotechnology (1992) 3:533-539；Muzyczka, N. Current Topics in Microbial, and Immunol. (1992) 158:97-129；Kotin, R. M. Human Gene Therapy (

10

20

30

40

50

1994) 5:793-801; ShellingおよびSmith, Gene Therapy (1994) 1:165-169; ならびにZhouら、J. Exp. Med. (1994) 179:1867-1875を参照のこと。

【0203】

本発明のポリヌクレオチドを送達するために有用な別のベクター系は、Small, Jr., P. A. ら(1997年10月14日に発行された、米国特許第5,676,950号)に記載される、腸管投与される組換えボックスウイルスワクチンである。

【0204】

目的の抗原をコードする核酸分子を送達するための用途を見出すさらなるウイルスベクターとしては、ワクシニアウイルスおよびトリボックスウイルスを含む、ボックスファミリーのウイルス由来のベクターである。例として、遺伝子を発現するワクシニア組換え体は、以下のように構築され得る。特定の合成HIVサブタイプCポリペプチドコード配列をコードするDNAは、最初に適切なベクターに挿入され、その結果、そのDNAは、ワクシニアプロモーターおよび隣接ワクシニアDNA配列(例えば、チミジンキナーゼ(TK)をコードする配列)に隣接する。次いで、このベクターを使用して、細胞をトランスフェクトし、この細胞をワクシニアで同時に感染させる。相同組換えは、ワクシニアプロモーターおよび目的のコード配列をコードする遺伝子を、ウイルスゲノムに挿入するのに役立つ。得られるTK⁻組換え体は、細胞を5-ブromoデオキシウリジンの存在下で培養し、そしてそれに対して抵抗性のウイルスプラークを摘み上げることによって選択され得る。

【0205】

あるいは、アビボックスウイルス(例えば、鶏痘ウイルスおよびカナリア痘ウイルス)はまた、遺伝子を送達するために使用され得る。組換えアビボックスウイルス(哺乳動物病原体から免疫原を発現する)は、非トリ種に投与される場合、保護免疫を与えることが知られている。アビボックスベクターの使用は、ヒトおよび他の哺乳動物種において特に望ましい。なぜなら、アビボックス属のメンバーは、感受性のトリ種においてのみ産生的に複製し得、従って、哺乳動物細胞に感染しないからである。組換えアビボックスウイルスを産生するための方法は、当該分野において公知であり、そしてワクシニアウイルスの産生に関して上記のように、遺伝子組換えを使用する。例えば、WO 91/12882; WO 89/03429; およびWO 92/03545を参照のこと。

【0206】

分子結合ベクター(例えば、Michaelら、J. Biol. Chem. (1993) 268:6866-6869およびWagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6099-6103に記載されるアデノウイルスキメラベクター)はまた、遺伝子送達のために使用され得る。

【0207】

アルファウイルス属のメンバー(例えば、限定しないが、Sindbisウイルス、Semliki Forestウイルス、およびVenezuelan Equine Encephalitisウイルスに由来するベクター)はまた、本発明のポリヌクレオチドを送達するためのウイルスベクターとしての使用を見出す(例えば、発現カセットをコードする合成Gag-ポリヌクレオチド)。本発明の方法の実行に有用なSindbisウイルス由来ベクターの記載について、Dubenskyら、J. Virol. (1996) 70:508-519; ならびに国際公開番号WO 95/07995およびWO 96/17072; ならびに、Dubensky, Jr., T. W. ら、米国特許第5,843,723号(1998年12月1日発行)、およびDubensky, Jr., T. W., 米国特許第5,789,245号(1998年8月4日発行)を参照のこと。

【0208】

ワクシニアに基づく感染/トランスフェクション系は、宿主細胞中の目的のコード配列の誘導性一過性発現を提供するために便利に使用され得る。この系において、細胞は、最初に、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス組

10

20

30

40

50

換え体を用いてインビトロで感染される。このポリメラーゼは、それがT7プロモーターを有するテンプレートのみを転写する点で、すばらしい特異性を示す。感染に続いて、細胞を、T7プロモーターによって駆動される、目的のポリヌクレオチドを用いてトランスフェクトする。ワクシニアウイルス組換え体から細胞質において発現されるポリメラーゼは、トランスフェクトされたDNAをRNAに転写し、これは、次いで、宿主翻訳機構によってタンパク質に翻訳される。この方法は、大量のRNAおよびその翻訳産物の高いレベルの一過性細胞質産生を提供する。例えば、Elroy-SteinおよびMoss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 6743-6747; Fuerstら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83: 8122-8126を参照のこと。

10

【0209】

ワクシニアウイルス組換え体またはアビボックスウイルス組換え体を用いた感染、あるいは他のウイルスベクターを使用する遺伝子の送達に対する代替のアプローチとして、宿主細胞への導入に続く高レベルの発現を導く増幅系が使用され得る。具体的には、T7 RNAポリメラーゼについてのコード領域に先行するT7 RNAポリメラーゼプロモーターが操作され得る。このテンプレートから誘導されるRNAの翻訳は、T7 RNAポリメラーゼを産生し、これは、次いで、より多くのテンプレートを転写する。同時に、発現がT7プロモーターの制御下にあるcDNAが存在する。このように、増幅テンプレートRNAの翻訳から生成するT7 RNAポリメラーゼのいくつかは、所望の遺伝子の転写を導く。いくつかのT7 RNAポリメラーゼが、増幅を開始するために必要とされるので、T7 RNAポリメラーゼは、転写反応をプライムするために、テンプレートに沿って細胞に導入され得る。ポリメラーゼは、タンパク質として導入され得るか、またはRNAポリメラーゼをコードするプラスミド上に導入され得る。T7系および細胞を形質転換するためのそれらの使用についてのさらなる考察について、例えば、国際公開番号WO 94/26911; StudierおよびMoffatt, J. Mol. Biol. (1986) 189: 113-130; DengおよびWolff, Gene (1994) 143: 245-249; Gaoら、Biochem. Biophys. Res. Commun. (1994) 200: 1201-1206; GaoおよびHuang, Nuc. Acids Res. (1993) 21: 2867-2872; Chenら、Nuc. Acids Res. (1994) 22: 2114-2120; ならびに米国特許第5, 135, 855号を参照のこと。

20

30

【0210】

目的の合成発現カセットはまた、ウイルスベクターなしで送達され得る。例えば、合成発現カセットは、被験体への送達または被験体から誘導される細胞への送達の前に、リボソーム中にパッケージングされ得る。脂質カプセル化は、一般的に核酸に安定に結合し得るか、または核酸を捕捉および維持し得るリボソームを用いて達成される。縮合DNAの脂質調製物に対する比は、さまざまであり得るが、一般的に約1:1 (mg DNA: マイクロモル脂質) であるか、またはより多くの脂質である。核酸の送達のためのキャリアとしてのリボソーム使用の概説については、HugおよびSleight, Biochim. Biophys. Acta. (1991) 1097: 1-17; Straubingerら、Methods of Enzymology (1983) 101: 512-527頁を参照のこと。

40

【0211】

本発明における使用のためのリボソーム調製物としては、カチオン性（正に荷電した）、アニオン性（負に荷電した）および中性の調製物が挙げられ、カチオン性リボソームが特に好ましい。カチオン性リボソームは、機能的な形態で、プラスミドDNA (Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84: 7413-7416); mRNA (Maloneら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86: 6077-6081); および精製した転写因子 (Debsら、J. Biol. Chem. (1990) 265: 10189-10192) の細胞内送達

50

を媒介することが示されている。

【0212】

カチオン性リポソームは容易に入手可能である。例えば、N[1-2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリエチルアンモニウム(DOTMA)リポソームは、GIBCO BRL、Grand Island、NYからの商標リポフェクチン(Lipofectin)の下で入手可能である(Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416もまた参照のこと)。他の市販されている脂質としては、(DDAB/DOPE)およびDOTAP/DOPE(Boerhinger)が挙げられる。他のカチオン性リポソームは、当該分野で周知の技法を使用して容易に利用可能な物質から調製され得る。例えば、DOTAP(1, 2-ビス(オレイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)リポソームの合成の記載について、Szokaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:4194-4198; PCT公開番号WO90/11092を参照のこと。

10

【0213】

同様に、アニオン性および中性リポソームは、例えば、Avanti Polar Lipids(Birmingham, AL)から容易に入手可能であるか、または容易に入手可能な物質を使用してたやすく調製され得る。このような物質としては、とりわけ、ホスファチジルコリン、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)が挙げられる。これらの物質はまた、適切な比率のDOTMAおよびDOTAPの出発物質と混合され得る。これらの物質を使用してリポソームを作製する方法は、当該分野で周知である。

20

【0214】

このリポソームは、多重膜のベシクル(MLV)、小さな単一膜ベシクル(SUV)、または大きな単一膜のベシクル(LUV)を含み得る。種々のリポソーム-核酸複合体は当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。例えば、Straubingerら、METHODS OF IMMUNOLOGY (1983) 101巻:512-527頁; Szokaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:4194-4198; Papahadjopoulosら、Biochim. Biophys. Acta (1975) 394:483; Wilsonら、Cell (1979) 17:77; DeamerおよびBangham、Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629; Ostroら、Biochem. Biophys. Res. Commun. (1977) 76:836; Fraleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:3348; EnochおよびStrittmatter、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:145; Fraleyら、J. Biol. Chem. (1980) 255:10431; SzokaおよびPapahadjopoulos、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:145; ならびにSchaefer-Ridderら、Science (1982) 215:166を参照のこと。

30

【0215】

DNAおよび/またはタンパク質抗原はまた、Papahadjopoulosら、Biochem. Biophys. Acta. (1975) 394:483-491によって記載される組成物に類似の蝸牛殻(cochleate)脂質組成物で送達され得る。米国特許第4, 663, 161号および同第4, 871, 488号を参照のこと。

40

【0216】

目的の合成発現カセットはまた、粒子状のキャリアでカプセル化され得るか、粒子状のキャリアに吸収され得るか、または粒子状のキャリアに会合(associate)し得る。このようなキャリアは、選択された抗原の複数コピーを、免疫系に提示し、そして局所的リンパ節における抗原の捕捉および保持を促進する。粒子は、マクロファージによって食作用を受け得、そしてサイトカイン放出を通じた抗原提示を促進し得る。特定のキャ

50

リアの例としては、ポリメチルメタクリレートポリマーから誘導されるキャリア、ならびにポリ（ラクチド）およびポリ（ラクチド- α -グリコリド）（PLGとして公知）から誘導される微粒子が挙げられ得る。例えば、Jefferyら、Pharm. Res. (1993) 10: 362-368; McGee JPら、J Microencapsul. 14 (2) 197-210, 1997; O'Hagan DTら、Vaccine 11 (2): 149-54, 1993を参照のこと。適切な微粒子はまた、荷電した界面活性剤（例えば、アニオン性界面活性剤またはカチオン性界面活性剤）の存在下で作製されて、正味負の電荷または正味正の電荷を有する表面を有する微粒子を生じ得る。例えば、アニオン性界面活性剤（例えば、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB））とともに製造された微粒子（すなわち、CTAB-PLG微粒子）は、負に帯電した高分子（例えば、DNA）を吸収する（例えば、国際出願番号PCT/US99/17308を参照のこと）。

10

【0217】

さらに、他の粒子系およびポリマーは、目的の遺伝子のインビボまたはエキソビボ送達のために使用され得る。例えば、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、スペルミン、スペルミジンのようなポリマー、ならびにこれらの分子の結合体は、目的の核酸を移すために有用である。同様に、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降または他の不溶性無機塩（例えば、リン酸ストロンチウム、ケイ酸アルミニウム（ベントナイトおよびカオリンを含む）、酸化クロム、ケイ酸マグネシウム、滑石など）は、本発明との使用を見出す。例えば、遺伝子移入に有用な送達系の総説について、Felgner, P. L., Advanced Drug Delivery Reviews (1990) 5: 163-187を参照のこと。Peptoids (Zuckerman, R. N. ら、1998年11月3日に発行された、米国特許第5,831,005号）もまた、本発明の構築物の送達のために使用され得る。

20

【0218】

さらに、金およびタングステンのような特定のキャリアを使用する微粒子銃（biolistic）送達系は、本発明の合成発現カセットを送達するために特に有用である。この粒子は、送達される合成発現カセットでコーティングされ、そして「遺伝子銃」からの銃粉末放出を使用して、一般的に減圧大気下で高速に加速される。このような技術および従って有用な装置の説明について、例えば、米国特許第4,945,050号；同第5,036,006号；同第5,100,792号；同第5,179,022号；同第5,371,015号；および同第5,478,744号を参照のこと。また、ニードルレス注入系が使用され得る（Davis, H. L. ら、Vaccine 12: 1503-1509, 1994; Bioject, Inc., Portland, OR）。

30

【0219】

本発明の合成発現カセットを運ぶ組換えベクターは、脊椎動物被験体への送達のための組成物に処方される。これらの組成物は、予防的（感染を予防するため）または治療的（感染の後に疾患を処置するため）のいずれかであり得る。組成物は、「治療的有効量」の目的の遺伝子を含み、その結果、免疫応答が、投与される個体において生成されるように、一定量の抗原が、インビボで産生され得る。必要な実際の量は、とりわけ、処置される被験体；処置される被験体の年齢および一般的状态；抗体を合成する、被験体の免疫系の能力；所望される保護の程度；処置される状態の重篤度；選択される特定の抗原およびその投与の様式に依存して、変動する。適切な有効量は、当業者によって容易に決定され得る。従って、「治療的有効量」は、慣用的な試行によって決定され得る比較的広い範囲である。

40

【0220】

組成物は、一般的に、1つ以上の「薬学的に受容可能な賦形剤またはビヒクル」（例えば、水、生理食塩水、グリセロール、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸、エタノールなど）を含む。さらに、補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝化物質など）は、このようなビヒクル中に存在し得る。核酸取り込みおよび／または発現の特定の促

50

進因子 (facilitator) はまた、組成物中に含まれ得るか、または例えば、限定しないが、プピバカイン、心臓毒およびスクロースと同時投与され得る。

【0221】

一旦処方されると、本発明の組成物は、被験体に直接投与され得る（例えば、上記のように）か、あるいは上記のような方法を使用して、被験体から誘導される細胞にエキソビポで送達され得る。例えば、エキソビポ送達および形質転換された細胞の被験体への再移植のための方法は、当該分野において公知であり、そして、これらの方法としては、例えば、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、ポリブレン媒介トランスフェクション、リポフェクトアミンおよびLT-1媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リボソーム中でのポリヌクレオチドのカプセル化（対応する抗原を含むかまたは含まない）、および核へのDNAの直接的な微量注入が挙げられ得る。

10

【0222】

合成発現カセット組成物のインビポでの直接的な送達は、一般的に、Accell（登録商標）遺伝子送達系（PowderJECT Technologies, Inc., Oxford, England）のような、従来のシリンジまたは遺伝子銃のいずれかを使用する注入によって、上記のように、ウィルスベクターを用いてまたは用いないで、達成される。構築物は、経鼻的、直腸的、および腔的、腹腔内的、静脈内的、経口的、または筋肉内的のような、皮下的、上皮的、皮内的、粘膜内的のいずれかで、注入され得る。表皮の細胞へのDNAの送達は、特に好ましい。なぜなら、この投与の様式は、皮膚関連リンパ球へのアクセスを提供し、そしてレシピエントにおけるDNAの一過性の存在を提供するからである。投与の他の様式としては、経口投与または肺投与、坐剤、ニードルレス注入、経皮的（transcutaneous）および経皮的（transdermal）適用が挙げられる。投薬処置は、単回用量スケジュールまたは複数用量スケジュールであり得る。核酸の投与はまた、ペプチドまたは他の物質の投与と組み合わせられ得る。

20

【0223】

（2.4.2 本発明の合成発現カセットのエキソビポ送達）

1つの実施形態において、T細胞、および関連する細胞型（限定しないが、抗原提示細胞（例えば、マクロファージ、単球、リンパ球、樹状細胞、B細胞、T細胞、幹細胞およびそれらの前駆細胞）が挙げられる）は、本発明の合成発現カセットのエキソビポ送達のために使用され得る。T細胞は、当業者に公知の種々の手順によって、末梢血リンパ球（PBL）から単離され得る。例えば、T細胞集団は、補助細胞およびB細胞の除去によってPBLの集団から「濃縮」され得る。特に、T細胞濃縮は、抗MHCクラスIIモノクローナル抗体を使用して、非T細胞の除去によって達成され得る。同様に、他の抗体は、非T細胞の特定の集団を枯渇させるために使用され得る。例えば、抗Ig抗体分子は、B細胞を枯渇させるために使用され得、そして抗MacI抗体分子は、マクロファージを枯渇させるために使用され得る。

30

【0224】

T細胞は、当業者に公知の技術によって、多くの異なる亜集団にさらに分別され得る。二つの大きな亜集団は、細胞表面マーカーCD4およびCD8の差示的発現に基づいて、単離され得る。例えば、上記のようなT細胞の濃縮に続いて、CD4⁺細胞は、CD4に特異的な抗体を使用して濃縮され得る（Coliganら、上記を参照のこと）。抗体は、磁気ビーズのような固体支持体に連結され得る。逆に、CD8⁺細胞は、CD4に特異的な抗体の使用（CD4⁺細胞を除くため）によって濃縮され得るか、または固体支持体に連結したCD8抗体の使用によって単離され得る。HIV-1感染患者由来のCD4リンパ球は、Wilsonら、（1995）J. Infect. Dis. 172:88によって記載されるように、形質導入の前または後に、エキソビポで増殖され得る。

40

【0225】

T細胞の精製後、当業者に公知の遺伝子改変の種々の方法が、本明細書中に記載されるようにして構築された非ウイルスベースまたはウイルスベースの遺伝子移入ベクターを用

50

いて実施され得る。例えば、1つのこのようなアプローチは、ベクター産生細胞に由来する培養物のベクター含有上清による精製T細胞集団の形質導入を含む。第2のアプローチは、照射した単層のベクター産生細胞と精製T細胞との共培養を含む。第3のアプローチは、類似する共培養アプローチであるが；精製T細胞が種々のサイトカインで前刺激され、そして照射したベクター産生細胞との共培養の前に48時間培養される共培養アプローチを含む。このような形質導入前の前刺激は、効果的な遺伝子移入を増加させる（Noltaら（1992）Exp. Hematol. 20:1065）。これらの培養物を増殖させる刺激もまた、患者への再注入のための増加した細胞集団を提供する。共培養に続いて、T細胞は、ベクター産生細胞単層から回収され、展開され、そして液体窒素中で凍結される。

10

【0226】

1つ以上の本発明の合成発現カセット（単離されたT細胞への送達のための適切な制御エレメントを伴う）を含む遺伝子移入ベクターは、公知の方法を用いて構築され得る。

【0227】

選択マーカーはまた、遺伝子移入ベクターの構築において使用され得る。例えば、遺伝子転移ベクターで形質導入された哺乳動物細胞に、細胞毒性因子に対する耐性を与えるマーカーが、用いられ得る。細胞毒性因子は、ネオマイシン、アミノグリコシド、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、スルホンアミド、アクチノマイシン、ネトロプシン、ジスタマイシンA、アントラサイクリン、またはピラジンアミドであり得るがこれらに限定されない。例えば、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼIIは、ネオマイシンアナログであるジェネティシン（G418）に対する耐性を与える。

20

【0228】

T細胞はまた、選択される前に、少なくとも1つの型の増殖因子を含む培地中で維持され得る。特定の細胞型の増殖を維持する種々の増殖因子が当該分野で公知である。このような増殖因子の例は、リンパ球の増殖および活性化を促進するサイトカインマイトジェン（例えば、rIL-2、IL-10、IL-12、およびIL-15）である。特定の型の細胞は、ホルモン（ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）およびヒト成長ホルモンを含む）のような他の増殖因子により刺激される。特定の細胞集団について適切な増殖因子を選択することは、当業者により容易に達成される。

【0229】

例えば、白血球（例えば、分化した前駆細胞および幹細胞）は、種々の増殖因子により刺激される。より詳細には、活性化T_Hおよび活性化マクロファージにより産生される、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、GM-CSF、M-CSF、およびG-CSFは、骨髄幹細胞を刺激し、骨髄幹細胞は、次いで、多能性幹細胞、顆粒球-単球前駆体、好酸球前駆体、好塩基球、巨核球、および赤血球前駆体に分化する。分化は、GM-CSF、IL-3、IL-6、IL-11、およびEPOのような増殖因子により調節される。

30

【0230】

次いで、多能性幹細胞は、リンパ系幹細胞、骨髄間質細胞、T細胞前駆体、B細胞前駆体、胸腺細胞、T_H細胞、T_C細胞、およびB細胞に分化する。この分化は、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、IL-2、およびIL-5のような増殖因子により調節される。

40

【0231】

顆粒球-単球前駆体は、単球、マクロファージ、および好中球に分化する。このような分化は、GM-CSF、M-CSF、およびIL-8のような増殖因子により調節される。好酸球前駆体は、好酸球に分化する。このプロセスは、GM-CSFおよびIL-5により調節される。

【0232】

好塩基球前駆体のマスト細胞および好塩基球への分化は、GM-CSF、IL-4、およびIL-9により調節される。巨核球は、GM-CSF、EPO、およびIL-6に応

50

答して血小板を産生する。赤血球前駆細胞は、EPOに応答して赤血球に分化する。

【0233】

従って、CD3結合因子による活性化の間、T細胞はまた、マイトジェン（例えば、IL-2のようなサイトカイン）と接触され得る。特に好ましい実施形態において、IL-2は、約50～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でT細胞の集団に添加される。CD3結合因子による活性化は、2～4日間で実施され得る。

【0234】

一旦、適切に活性化されると、T細胞は、一般的に、T細胞へのベクターのトランスフェクションを可能にする条件下で、適切な遺伝子移入ベクターと接触することにより改変される。遺伝子改変は、T細胞集団の細胞密度が、約0.1 $\times 10^6$ と5 $\times 10^6$ との間、好ましくは、約0.5 $\times 10^6$ と2 $\times 10^6$ との間の場合に実施される。多くの適切なウイルスベースおよび非ウイルスベースの遺伝子移入ベクターが、本明細書中での使用のために記載されている。

【0235】

形質導入後、形質導入細胞は、公知の技術を用いて、非形質導入細胞から選択される。例えば、形質導入に使用される遺伝子移入ベクターが、細胞毒性因子に対する耐性を与える選択マーカーを含む場合、この細胞は、適切な細胞毒性因子と接触され得、それによって、非形質導入細胞が、形質導入細胞からネガティブ選択され得る。選択マーカーが細胞表面マーカーの場合、この細胞は、特定の細胞表面マーカーに特異的な結合因子と接触され得、それによって、形質導入細胞が、その集団からポジティブ選択され得る。この選択工程はまた、蛍光活性化細胞選別（FACS）技術を伴う（例えば、FACSが特定の細胞表面マーカーを含む集団から細胞を選択するために用いられる場合）か、またはこの選択工程は、標的細胞の捕捉および／またはバックグラウンドの除去のための取り出し可能な支持体として磁氣的に応答する粒子の使用を伴う。

【0236】

より詳細には、形質導入細胞のポジティブ選択は、選択可能な細胞表面マーカーを発現する形質導入細胞を選別および回収するために、FACSセルソーター（例えば、FACS VantageTM Cell Sorter、Becton Dickinson Immunocytometry Systems、San Jose、CA）を用いて実施され得る。形質導入後、この細胞は、特定の細胞表面マーカーに対する蛍光標識された抗体分子を用いて染色される。各々の細胞における結合する抗体の量は、細胞を含む液滴を、セルソーターを通過させることにより測定され得る。染色された細胞を含む液滴に電磁的電荷を与えることにより、形質導入細胞は、他の細胞から分離され得る。次いで、ポジティブ選択細胞は、滅菌回収容器中に収集され得る。これらの細胞選別手順は、例えば、FACS VantageTM Training Manual（特に、セクション3-11～3-28および10-1～10-17を参照のこと）に詳細に記載されている。

【0237】

形質導入細胞のポジティブ選択はまた、発現または特定の細胞表面マーカーに基づく細胞の磁氣的分離を用いて実施され得る。このような分離技術において、ポジティブ選択される細胞は、最初に、特定の結合因子（例えば、その細胞表面マーカーと特異的に相互作用する抗体または試薬）と接触される。次いで、この細胞は、（ポジティブ細胞に結合している）特定の結合因子に結合する試薬と結合した取り出し可能な粒子（例えば、磁気応答性粒子）と接触される。次いで、この細胞結合因子-粒子の複合体は、例えば、磁場を用いて非標識細胞から物理的に分離され得る。磁気応答性粒子を用いる場合、標識された細胞は、磁場を用いて容器中に維持され得るが、ネガティブ細胞は除去される。これらおよび同様の分離手順は、当業者に公知である。

【0238】

選択された形質導入細胞におけるベクターの発現は、当業者に公知の多くのアッセイにより評価され得る。例えば、ウェスタンブロットまたはノーザン分析は、目的の挿入され

10

20

30

40

50

たヌクレオチド配列の性質に基づき用いられ得る。一旦、発現が確立され、そして形質転換T細胞が選択された合成発現カセットの存在について試験されると、それらは、末梢血流を介した患者への注入のために準備される。

【0239】

本発明は、初代哺乳動物細胞のエキソビボ集団の遺伝子改変のためのキットを含む。このキットは、代表的に、1つ以上の容器に含まれる少なくとも1つの選択マーカーおよび少なくとも1つの合成発現カセットをコードする遺伝子移入ベクター、補助的な試薬、またはハードウェア、およびこのキットの使用のための指示書を含む。

【0240】

(2. 4. 3 さらに送達レジーム)

本明細書中に記載される(上記の任意の方法により送達される)任意のポリヌクレオチド(例えば、発現カセット)またはポリペプチドはまた、他のDNA送達系および/またはタンパク質送達系と組み合わせて使用され得る。非限定的な例として、例えば、1つ以上の分子が「プライミング工程」において送達され、その後1つ以上の分子が「ブースト工程」において送達される、プライム-ブースト法における、これらの分子の同時投与が挙げられる。特定の実施形態において、1つ以上の核酸含有組成物が送達され、その後、1つ以上の核酸含有組成物および/または1つ以上のポリペプチド含有組成物(例えば、HIV抗原を含むポリペプチド)が送達される。他の実施形態において、複数の核酸が(同じかまたは異なる核酸分子を)「プライム」し、その後、複数のポリペプチドが(同じかまたは異なるポリペプチドを)「ブースト」する。他の実施例として、複数の核酸の投与および複数のポリペプチドの投与が挙げられる。

【0241】

同時投与を含む任意の方法において、種々の組成物は、任意の順序で送達され得る。従って、複数の異なる組成物または分子の送達を含む実施形態において、これらの核酸は、ポリペプチドよりも前に全て送達される必要があるわけではない。例えば、プライミング工程は、1つ以上のポリペプチドの送達を含み得、そしてブースト工程は、1つ以上の核酸および/または1つ以上のポリペプチドの送達を含み得る。複数のポリペプチドが投与され、その後、複数の核酸が投与され得るか、またはポリペプチドおよび核酸の投与が任意の順序で実施され得る。本明細書中に記載される任意の実施形態において、核酸分子は、ポリペプチドの全てまたは一部分をコードし得るか、あるいは全くコードし得ない。従って、本明細書中に記載される1つ以上の核酸分子(例えば、発現カセット)および/または本明細書中に記載される1つ以上のポリペプチドは、任意の順序で、かつ任意の投与経路で同時投与され得る。従って、本明細書中に記載されるポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの任意の組み合わせが、免疫反応を誘発するために使用され得る。

【実施例】

【0242】

(実験)

本発明を実施するための特定の実施形態の例を以下に示す。これらの実施例は、例示の目的のみのために提供され、いかなる手段によっても本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0243】

使用される数値(例えば、量、温度など)に関する正確性を確認するための努力が成されているが、ある程度の実験的誤差および偏差が、当然、許容されるべきである。

【0244】

(実施例1)

(合成発現カセットの作製)

(A. HIV-1 Env、Gag、Pol核酸コード配列の改変)

Polコード配列を、C型株AF110975から選択した。Gagコード配列を、C型株AF110965およびAF110967から選択した。Envコード配列を、C型株AF110968およびAF110975から選択した。これらの配列を操作し、それ

らの遺伝子産物の発現を最大化した。

【0245】

第1に、HIV-1のコドン使用パターンを、得られる核酸コード配列が高度に発現されるヒト遺伝子において見出されるコドン使用に相当するように改変した。HIVコドン使用は、高含有量のヌクレオチドAまたはTのコドントリプレットを反映する。HIV-1コドン使用の効果は、DNA配列における高いAT含有量であり、これにより、mRNAの翻訳能力が減少し、不安定になる。対照的に、高度に発現するヒトコドンは、ヌクレオチドGまたはCを好む。このコード領域を、高度に発現するヒト遺伝子において見出されるコドン使用に相当するように改変した。

【0246】

第2に、Gagのコード配列およびGagプロテアーゼコード配列中に位置する阻害性（または不安定）エレメント（INS）が存在する（Schneider Rら、J. Virol. 71（7）：4892-4903、1997）。RREは、HIVによりコードされるRevタンパク質と相互作用し、INSの発現ダウンレギュレーション効果に打ち勝つRNA二次構造である。RREおよびRevの翻訳後活性化機構に打ち勝つために、不安定エレメントは、コードされるタンパク質のリーディングフレームを変化しない複数の点変異を導入することにより、不活性化される。図5および6（配列番号3、4、20、および21）は、AF110965株およびAF110967株から獲得された合成配列におけるいくつかの残存するINSの位置を示す。これらの配列に成された変化は、図において囲み表示する。図5および6において、上列は、示される株由来のGagポリペプチドの改変された配列を示す。囲まれた領域の列の下に示されるヌクレオチドは、INSをさらに除去するために成された変化を示す。従って、囲み領域に示されるこれらの変化が成される場合、得られる配列は、それぞれ図1および2に示される配列に対応する。

【0247】

合成コード配列は、当該分野で公知の方法、例えば、Midland Certified Reagent Company（Midland、Texas）のような企業により構築される。

【0248】

本発明の1つの実施形態において、Polポリペプチドをコードする配列が、合成性の改変されたGag/Env発現カセットにより発現されるウイルス様粒子のエピトープの数を増加させるために、合成GagまたはEnv配列と共に含まれる。合成HIV-1 Polは、（構造的タンパク質およびプロテアーゼに加えて）機能性酵素である逆転写酵素（RT）およびインテグラーゼ（INT）を発現するので、RTおよびINT機能を不活性化することは、いくつかの例において助けとなり得る。RTおよびINTコード領域におけるいくつかの欠失または変異が、それらのRTおよびINT活性に関して触媒的に非機能的な酵素を達成するために作製され得る {Jay. A. Levy（編集者）（1995）The Retroviridae, Plenum Press, New York. ISBN 0-306-45033X. 215-20頁；Grimison, B. および Laurence, J.（1995）, Journal Of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 9（1）：58-68；Wakefield, J. K. ら、（1992）Journal Of Virology 66（11）：6806-6812；Esnouf, R. ら、（1995）Nature Structural Biology 2（4）：303-308；Maignan, S. ら、（1998）Journal Of Molecular Biology 282（2）：359-368；Katz, R. A. および Skalka, A. M.（1994）Annual Review Of Biochemistry 73（1994）；Jacobso-Molina, A. ら、（1993）Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States

10

20

30

40

50

Of America 90 (13) : 6320-6324; Hickman, A. B. ら, (1994) Journal Of Biological Chemistry 269 (46) : 29279-29287; Goldgur, Y. ら, (1998) Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America 95 (16) : 9150-9154; Goette, M. ら, (1998) Journal Of Biological Chemistry 273 (17) : 10139-10146; Gorton, J. L. ら, (1998) Journal of Virology 72 (6) : 5046-5055; Engelmann, A. ら, (1997) Journal Of Virology 71 (5) : 3507-3514; Dyda, F. ら, Science 266 (5193) : 1981-1986; Davies, J. F. ら, (1991) Science 252 (5002) : 88-95; Bujacz, G. ら, (1996) Febs Letters 398 (2-3) : 175-178; Beard, W. A. ら, (1996) Journal Of Biological Chemistry 271 (21) : 12213-12220; Kohlstedt, L. A. ら, (1992) Science 256 (5065) : 1783-1790; Krug, M. S. および Berger, S. L. (1991) Biochemistry 30 (44) : 10614-10623; Mazumder, A. ら, (1996) Molecular Pharmacology 49 (4) : 621-628; Palaniappan, C. ら, (1997) Journal Of Biological Chemistry 272 (17) : 11157-11164; Rodgers, D. W. ら, (1995) Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America 92 (4) : 1222-1226; Sheng, N. および Dennis, D. (1993) Biochemistry 32 (18) : 4938-4942; Spence, R. A. ら, (1995) Science 267 (5200) : 988-993}。

【0249】

さらに、選択されたB細胞エピトープおよび／またはT細胞エピトープは、RTおよびINTの機能的改変により欠失される任意のエピトープを置換および増強するために、Pol構築物に加えられる得る（例えば、短縮INTの3'末端またはRTおよびINTコード配列の欠失物内に）。あるいは、RTおよびINTからの選択されたB細胞エピトープおよびT細胞エピトープ（CTLエピトープを含む）は、上記の合成Gagカセットまたは合成Polカセットの発現により形成される最小VLPに含まれ得る（既知のHIB B細胞エピトープおよびT細胞エピトープの説明については、HIV Molecular Immunology Database CTL Search Interface; Los Alamos Sequence Compendia, 1987-1997; インターネットアドレス: <http://hiv-web.lanl.gov/immunology/index.html>を参照のこと）。

【0250】

得られる改変コード領域配列を、合成Env発現カセット; 合成Gag発現カセット; 合成Pol発現カセットとして示す。共通のGag領域 (Gag-common) は、AF110965に対してヌクレオチド844位~903位 (配列番号1) (または配列番号17のアミノ酸残基約282位~301位) に延び、そしてAF110967に対してヌクレオチド841位~900位 (配列番号2) (または配列番号22のアミノ酸残基約281位~300位) に延びる。共通のEnv領域 (Env-common) は、AF110968に対してヌクレオチド1213位~1353位 (配列番号5) および配列番号23のアミノ酸405位~451位に延び、そしてAF110975に対してヌクレオチド1210位~1353位 (配列番号11) およびアミノ酸404位~451位 (配列番号24) に延びる。

【0251】

P o l、G a g、およびE n vの合成DNAフラグメントは、以下の真核生物発現ベクター中にクローニングされる：一過性発現アッセイおよびDNA免疫研究のためのp C M V K m 2、p C M V K m 2ベクターは、p C M V 6 a (C h a p m a n ら、N u c , A c i d s . R e s . (1 9 9 1) 1 9 : 3 9 7 9 - 3 9 8 6) に由来し、そしてカナマイシン選択マーカー、C o l E 1 複製起点、C M V プロモーターエンハンサー、およびイントロンAを含み、その後ろに以下に記載される合成配列のための挿入部位を含み、その後ろにウシ成長ホルモン由来のポリアデニル化シグナルを含む— p C M V K m 2ベクターは、p C M V - l i n kベクターと、ポリリンカー部位がp C M V K m 2に挿入されてp C M V - l i n kが作製されるという点でのみ異なる；チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞における発現のためのp E S N 2 d h f rおよびp C M V P L E d h f r；およびp A c C 1 3、バキュロウイルス発現系において使用するためのシャトルベクター (p A c C 1 3は、M u n e m i t s u S . ら、M o l C e l l B i o l . 1 0 (1 1) : 5 9 7 7 - 5 9 8 2、1 9 9 0に記載されるp A c C 1 2に由来する)。

10

【0252】

簡単に述べると、p C M V P L E d h f rの構築は、以下の通りである。

【0253】

D H F Rカセットを構築するために、E M C V I R E S (内部リボソーム侵入部位) リーダーを、p C i t e - 4 a + (N o v a g e n、I n c .、M i l w a u k e e、W I) からP C R増幅し、そしてX b a - N c oフラグメントとしてp E T 2 3 d (N o v a g e n、I n c .、M i l w a u k e e、W I) に挿入し、p E T - E M C Vを獲得した。d h f r遺伝子を、p E S N 2 d h r fからP C R増幅して翻訳終止コドンの代わりにG l y - G l y - G l y - S e rスペーサーを有する産物を獲得し、そしてN c o - B a m H 1フラグメントとして挿入し、p E T - E - D H F Rを獲得した。次に、希釈したn e o遺伝子をp S V 2 N e o (C l o n t e c h、P a l o A l t o、C A) 誘導体からP C R増幅し、そしてp E T - E - D H F Rの特有のB a m H 1部位に挿入し、p E T - E - D H F R / N e o (m 2) を獲得した。最後に、p C D N A 3 (I n v i t r o g e n、I n c .、C a r l s b a d、C A) 由来のウシ成長ホルモントーミネーターを、n e o遺伝子の下流に挿入し、p E T - E - D H F R / N e o (m 2) B G H tを獲得した。E M C V - d h f r / n e o選択マーカーカセットフラグメントを、p E T - E - D H F R / N e o (m 2) B G H tの切断により調製した。

20

30

【0254】

C M Vエンハンサー／プロモーターおよびイントロンAを、p C M V 6 a (C h a p m a n ら、N u c . A c i d s . R e s . (1 9 9 1) 1 9 : 3 9 7 9 - 3 9 8 6) からH i n d I I I - S a l Iフラグメントとしてp U C 1 9 (N e w E n g l a n d B i o l a b s、I n c .、B e v e r l y、M A) に移した。N d e I部位からS a l I部位まで、p U C 1 9のベクター骨格を欠失させた。上記のD H F Rカセットを、E M C V I R E Sが、C M Vプロモーターの後ろにくるように、この構築物に加えた。このベクターはまた、a m p^r遺伝子およびS V 4 0複製起点を含んだ。

【0255】

40

(B. H I V - 1 p 5 5 G a gの主要相同性領域 (M H R) の規定)

H I V - 1 p 5 5 (G a g)の主要相同性領域 (M H R) は、G a gのp 2 4 - C A配列中に位置する。それは、およそ20アミノ酸の保存されたストレッチである。野生型A F 1 1 0 9 6 5 G a gタンパク質における位置は、282～301であり (配列番号25)、そしてG a g DNA配列については、844～903の領域にまたがる (配列番号26)。合成G a gタンパク質における位置もまた、282～301であり (配列番号25)、そして合成G a g DNA配列については、844～903の領域にまたがる (配列番号1)。野生型および合成A F 1 1 0 9 6 7 G a gタンパク質における位置は、281～300であり (配列番号27)、そして改変されたG a g DNA配列については、841～900の領域にまたがる (配列番号2)。M H Rにおける変異または欠失は、

50

粒子の産生を著しく減少させ得る (Borsettiら、J. Virol. 72 (11) : 9313-9317、1988; Mammano, F. ら、J. Virol. 68 (8) : 4927-4936、1994)。

【0256】

この配列に対するパーセント同一性は、例えば、Smith-Watermanサーチアルゴリズム (Time Logic、Incline Village、NV) を以下の例示的なパラメータと共に用いて決定され得る：ウェイトマトリックス = nuc 4 x 4 hb；ギャップオープンペナルティー = 20；ギャップエクステンションペナルティー = 5。

【0257】

10

(C. HIV-1 Envの共通配列領域の定義)

HIV-1 Envの共通配列領域 (CSR) は、EnvのC4配列中に位置する。これは、約47アミノ酸の保存されたストレッチである。野生型および合成のAF110968 Envタンパク質のこの位置は、およそアミノ酸残基405~451 (配列番号28) であり、そしてEnv DNA配列に関して1213~1353 (配列番号5) の領域にわたる。野生型およびおよそ合成のAF110975 Envタンパク質のこの位置は、およそアミノ酸残基404~451 (配列番号29) であり、そしてEnv DNA配列に関して1210~1353 (配列番号11) の領域にわたる。

【0258】

この配列に対する%同一性を、例えば、Smith-Waterman検索アルゴリズム (Time Logic、Incline Village、NV) を、以下の例示的なパラメーター：重量マトリックス = nuc 4 x 4 hb；ギャップオープニングペナルティー = 20、ギャップ伸長ペナルティー = 5と共に使用して、決定し得る。

20

【0259】

本明細書中に記載される本発明の異なる実施形態の種々の形態を、組み合わせ得る。

【0260】

(D. 南アフリカC型HIV系統由来の例示的なHIV配列)

新規C型単離体のHIVコード配列を獲得した。ポリペプチドコード配列を、その遺伝子産物の発現を最大化するために操作した。

【0261】

30

上で考察したように、得られた核酸コード配列が、高度に発現されたヒト遺伝子において見出されるコドンの用法に匹敵するように、HIV-1コドンの用法パターンを改変した。このHIVコドンの用法は、コドン三つ組のヌクレオチドAまたはTの高い含量を反映する。HIV-1コドンの用法の効果は、減少した翻訳能力およびmRNAの不安定性を生じる、DNA配列中の高いAT含量である。相対的に、高く発現されたヒトのコドンは、ヌクレオチドGまたはCを好む。これらのコード配列を、高く発現されたヒト遺伝子において見出されるコドンの用法に匹敵するように、改変した。

【0262】

以下の表Cに、新規の南アフリカC型HIV単離体 (クローン8__5__TV1__C. ZA.) 由来の例示的な野生型および合成の配列を示す。表Dは、新規の南アフリカC型HIV単離体 (クローン8__2__TV1__C. ZA.) 由来の例示的な合成Env配列を示す。表Eは、南アフリカC型HIV系統 (12-5__1__TV2__C. ZA.) 由来の野生型および合成の配列を示す。

40

【0263】

【表 1 C】

表 C

名前	配列 番号	説明
C4_Env_TV1_C_ZA_opt short	46	短い Env「共通領域」の合成配列
C4_Env_TV1_C_ZA_opt	47	Env「共通領域」の合成配列
C4_Env_TV1_C_ZA_wt	48	野生型 8_5_TV1_C.ZA Env 配列
Envgp160_TV1_C_ZAopt	49	合成 Env gp160
Envgp160_TV1_C_ZAwt	50	野生型 8_5_TV1_C.ZA Env gp160 配列
Gag_TV1_C_ZAopt	51	Gag の合成配列
Gag_TV1_C_ZAwt	52	野生型 8_5_TV1_C.ZA Gag 配列
Gag_TV1_ZA_MHRopt	53	Gag 主要相同性領域の合成配列
Gag_TV1_ZA_MHRwt	54	野生型 8_5_TV1_C.ZA Gag 主要相同性領域 配列
Nef_TV1_C_ZAopt	55	Nef の合成配列
Nef_TV1_C_ZAwt	56	野生型 8_5_TV1_C.ZA Nef 配列
NefD125G_TV1_C_ZAopt	57	Nef の合成配列, 非機能的遺伝子産物を 生じる、1 2 5 位での変異を含む
p15RNaseH_TV1_C_ZAopt	58	RNaseH の合成配列 (Pol の p15)
p15RNaseH_TV1_C_ZAwt	59	野生型 8_5_TV1_C.ZA RNaseH 配列
p31Int_TV1_C_ZAopt	60	インテグラーゼの合成配列 (Pol の p31)
p31Int_TV1_C_ZAwt	61	野生型 8_5_TV1_C.ZA インテグラーゼ配列
Pol_TV1_C_ZAopt	62	Pol の合成配列
Pol_TV1_C_ZAwt	63	野生型 8_5_TV1_C.ZA Pol 配列
Prot_TV1_C_ZAopt	64	Prot の合成配列
Prot_TV1_C_ZAwt	65	野生型 8_5_TV1_C.ZA Prot 配列
Protina_TV1_C_ZAopt	66	プロテアーゼの不活化を生じる変異を含む Prot の合成配列

10

20

30

40

(表 C 続き)

Protina_TV1_C_ZAwt	67	野生型 8_5_TV1_C.ZA Prot 配列 , プロテアーゼの不活性化を生じる 変異を含む。
ProtinaRTmut_TV1_C_ZAopt	68	Prot および逆転写酵素(RT)の合成配列 , プロテアーゼの不活性化を生じる変異および R Tの不活性化を生じる変異を含む。
ProtinaRTmut_TV1_C_ZAwt	69	野生型 8_5_TV1_C.ZA Prot および RT, プロテアーゼの不活性化を生じる変異および R Tの不活性化を生じる変異。
ProtwtRTwt_TV1_C_ZAopt	70	Prot および RT の合成配列
ProtwtRTwt_TV1_C_ZAwt	71	野生型 8_5_TV1_C.ZA Prot および RT
RevExon1_TV1_C_ZAopt	72	Rev のエキソン 1 の合成配列
RevExon1_TV1_C_ZAwt	73	Rev のエキソン 1 の野生型 8_5_TV1_C.ZA
RevExon2_TV1_C_ZAopt-2	74	Rev のエキソン 2 の合成配列
RevExon2_TV1_C_ZAwt	75	Rev のエキソン 2 の野生型 8_5_TV1_C.ZA
RT_TV1_C_ZAopt	76	RT の合成配列
RT_TV1_C_ZAwt	77	野生型 8_5_TV1_C.ZA RT
RTmut_TV1_C_ZAopt	78	RT の合成配列 , R T の不活性化を生じる 変異を含む。
RTmut_TV1_C_ZAwt	79	野生型 8_5_TV1_C.ZA RT, R T の不活性化を生じる 変異を含む。
TatC22Exon1_TV1_C_ZAopt	80	Tat のエキソン 1 の合成配列 , 非機能的 T a t 遺伝子産物を生じる変異を 含む。
TatExon1_TV1_C_ZAopt	81	Tat のエキソン 1 の合成配列
TatExon1_TV1_C_ZAwt	82	Tat のエキソン 1 の野生型 8_5_TV1_C.ZA
TatExon2_TV1_C_ZAopt	83	Tat のエキソン 2 の合成配列
TatExon2_TV1_C_ZAwt	84	Tat のエキソン 2 の野生型 8_5_TV1_C.ZA
Vif_TV1_C_ZAopt	85	Vif の合成配列
Vif_TV1_C_ZAwt	86	野生型 8_5_TV1_C.ZA Vif
Vpr_TV1_C_ZAopt	87	Vpr の合成配列

10

20

30

40

(表 C 続き)

Vpr_TV1_C_ZAwt	88	野生型 8_5_TV1_C.ZA Vpr
Vpu_TV1_C_ZAopt	89	Vpu の合成配列
Vpu_TV1_C_ZAwt	90	野生型 8_5_TV1_C.ZA Vpu
revexon1_2 TV1 C ZAopt	91	Rev のエキソン 1 および 2 の合成配列
RevExon1_2_TV1_C_ZAwt	92	野生型 8_5_TV1_C.ZA Rev (エキソン1および2)
TatC22Exon1_2_TV1_C_ZAopt	93	Tat のエキソン 1 および 2 の合成配列, 非機能的な T a t 遺伝子産物を生じる、エキソン 1 における変異を含む。
TatExon1_2_TV1_C_ZAopt	94	Tat のエキソン 1 および 2 の合成配列
TatExon1_2_TV1_C_ZAwt	95	野生型 8_5_TV1_C.ZA Tat (エキソン1および2)
NefD125G- Myr_TV1_C_ZAopt	96	Nef の合成配列, ミリスチル化部位を排除する 変異を含む。

10

【 0 2 6 4 】

【表 1 D】

表 D

名前	配列番号	説明
gp120mod.TV1.delV2	119	Env gp120 の合成配列, V2 欠失および 野生型 8_2_TV1_C.ZA 配列に由来する 改変された リーダー配列を含む。
gp140mod.TV1.delV2	120	Env gp140 の合成配列, V2 欠失および 野生型 8_2_TV1_C.ZA 配列に由来する 改変された リーダー配列を含む。
gp140mod.TV1.mut7.delV2	121	Env gp140 の合成配列, V2 欠失ならびに 切断部位における変異および 野生型 8_2_TV1_C.ZA 配列に由来する 改変された リーダー配列を含む。
gp160mod.TV1.delV1V2	122	Env gp160 の合成配列, V1/V2 欠失および 野生型 8_2_TV1_C.ZA 配列に由来する 改変された リーダー配列を含む。
gp160mod.TV1.delV2	123	Env gp160 の合成配列, V2 欠失および 野生型 8_2_TV1_C.ZA 配列に由来する 改変された リーダー配列を含む。
gp160mod.TV1.mut7.delV2	124	Env gp160 の合成配列, V2 欠失; 切断部位 における変異および 野生型 8_2_TV1_C.ZA 配列に由来する 改変された リーダー配列 を含む。
gp160mod.TV1.tpa1	125	Env gp160 の合成配列, TPA1 リーダー
gp160mod.TV1	126	Env gp160 の合成配列, 野生型 (8_2_TV1_C.ZA) 配列に由来する 改変された リーダー配列 を含む。
gp160mod.TV1.wtLnative	127	Env gp160 の合成配列, 野生型 8_2_TV1_C.ZA (未改変) リーダーを含む。
gp140mod.TV1.tpa1	131	Env gp140 の合成配列, TPA1 リーダー
gp140mod.TV1	132	Env gp140 の合成配列, 野生型 8_2_TV1_C.ZA 配列に由来する 改変された リーダー配列 を含む。
gp140mod.TV1.wtLnative	133	Env gp120 の合成配列, 野生型 8_2_TV1_C.ZA (未改変) リーダー配列を含む。

上記のように、Env コード構築物を、全長の gp160 構築物のいずれかを使用して、調製し得る。例えば、gp140 形態（配列番号 132）を、gp160（配列番号 126）を、ヌクレオチド 2064 で短縮することによって作製し；gp120 を、gp160（配列番号 126）を、ヌクレオチド 1551 で短縮することによって作製した（配列番号 126）。さらなる gp140 形態および gp120 形態を、本明細書中に記載の方法を使用して、作製し得る。1 以上の終止コドン、を、代表的に付加する（例えば、配列番号 126 のヌクレオチド 2608～2610）。さらに、野生型のリーダー配列を、改変および／または他のリーダー配列（例えば、TPA1 リーダー配列）で置換し得る。

【0265】

従って、ポリペプチド gp160 は、gp120 および gp41 のコード配列を含む。

ポリペプチド g p 4 1 は、オリゴマー化ドメイン (OD) および膜貫通ドメイン (TM) を含むいくつかのドメインからなる。ネイティブのエンベロープにおいて、このオリゴマー化ドメインは、三量体構造を形成する 3 つの g p 4 1 ポリペプチドの非共有的な会合に必要である: g p 4 1 三量体 (およびそれ自体) との非共有的な相互作用によって、g p 1 2 0 ポリペプチドもまた、三量体構造に組織される。切断部位は、ほぼ、g p 1 2 0 のポリペプチド配列と g p 4 1 に対応するポリペプチド配列との間に存在する。この切断部位を、この部位での切断を防止するために変異し得る。得られた g p 1 4 0 ポリペプチドは、g p 1 6 0 の短縮形態に対応し、ここで、g p 4 1 の膜貫通ドメインは、欠失されている。この g p 1 4 0 ポリペプチドは、g p 4 1 部分のオリゴマー化ドメインの存在によって、単量体形態およびオリゴマー (すなわち、三量体) 形態の両方で存在し得る。切断を防止するためにこの切断部位が変異されており、そして g p 4 1 の膜貫通部分が欠失されている状況において、得られたポリペプチド産物は、「変異」g p 1 4 0 (例えば、g p 1 4 0 . m u t) と称される。当業者に明らかなように、この切断部位は、種々の方法によって変異され得る。本明細書中に記載される例示的な構築物 (例えば、配列番号 1 2 1 および配列番号 1 2 4) において、g p 1 2 0 / g p 4 1 切断部位における変異は、野生型のアミノ酸配列 K R R V V Q R E K R (配列番号 1 2 9) を、I S S V V Q S E K S (配列番号 1 3 0) に変化させる。

10

【0266】

なお別の実施形態において、超可変領域が欠失され、N-グリコシル化部位が除去され、そして/または切断部位が変異された。可変領域の欠失 (V 1 および/または V 2) を有する例示的な構築物において、V 2 欠失を、(配列番号 1 2 8 に対して) 約 4 9 9 ~ 約 5 9 3 のヌクレオチドを欠失することによって構築し、そして V 1 / V 2 欠失を、(配列番号 1 2 8 に対して) 約 3 7 5 ~ 約 6 0 2 のヌクレオチドを欠失することによって構築した。V 1 領域および/または V 2 領域の相対的な位置もまた、表 A に示される領域に対するアラインメントによって、容易に決定し得る。表 E は、南アフリカ C 型 H I V 系統 (1 2 - 5 _ 1 _ T V 2 _ C . Z A .) 由来の野生型および合成の配列を示す。

20

【0267】

【表 1 E】

表 E

名前	配列番号	説明
Envgp160_TV2_C_ZAopt	97	Env gp160 の合成配列
Envgp160_TV2_C_ZAwt	98	野生型 12-5_1_TV2_C.ZA Env gp160.
Gag_TV2_C_ZAopt	99	Gag の合成配列
Gag_TV2_C_ZAwt	100	野生型 12-5_1_TV2_C.ZA Gag
Nef_TV2_C_ZAopt	101	Nef の合成配列
Nef_TV2_C_ZAwt	102	野生型 12-5_1_TV2_C.ZA Nef
Pol_TV2_C_ZAopt	103	Pol の合成配列
Pol_TV2_C_ZAwt	104	Pol の野生型 12-5_1_TV2_C.ZA
RevExon1_TV2_C_ZAopt	105	Rev のエキソン 1 の合成配列
RevExon1_TV2_C_ZAwt	106	Rev のエキソン 1 の野生型 12-5_1_TV2_C.ZA
RevExon2_TV2_C_ZAopt	107	Rev のエキソン 2 の合成配列
RevExon2_TV2_C_ZAwt	108	Rev のエキソン 2 の野生型 12-5_1_TV2_C.ZA
TatExon1_TV2_C_ZAopt	109	Tat のエキソン 1 の合成配列
TatExon1_TV2_C_ZAwt	110	Tat のエキソン 1 の野生型 12-5_1_TV2_C.ZA
TatExon2_TV2_C_ZAopt	111	Tat のエキソン 2 の合成配列
TatExon2_TV2_C_ZAwt	112	Tat のエキソン 2 の野生型 12-5_1_TV2_C.ZA
Vif_TV2_C_ZAopt	113	Vif の合成配列
Vif_TV2_C_ZAwt	114	Vif の野生型 12-5_1_TV2_C.ZA
Vpr_TV2_C_ZAopt	115	Vpr の合成配列
Vpr_TV2_C_ZAwt	116	Vpr の野生型 12-5_1_TV2_C.ZA
Vpu_TV2_C_ZAopt	117	Vpu の合成配列
Vpu_TV2_C_ZAwt	118	Vpu の野生型 12-5_1_TV2_C.ZA

任意の C 型 HIV 系統由来の配列またはクローンが、この系統における所望の改変を達成するために、本明細書中に記載のように改変され得ることは、容易に明らかである。さらに、ポリタンパク質を、ポリペプチドまたはペプチド産物をコードする 2 つ以上のポリヌクレオチド配列をインフレームで融合させることによって、構築し得る。さらに、ポリシストロン性コード配列を、互いに隣接するポリペプチド産物をコードする、代表的には、1 つのプロモーターの制御下にある、2 つ以上のポリヌクレオチド配列を配置することによって生成し得、ここで、各ポリペプチドコード配列を、内部リボソーム結合部位の配列を含むように改変し得る。

【0268】

本発明の配列（例えば、HIV ポリペプチドをコードする、改変された（合成）ポリヌクレオチド配列）を、欠失、点変異、置換、フレームシフト、および／またはさらなる遺伝的改変（例えば、ポリペプチドに関連する活性の不活化を生じる変異（例えば、プロテアーゼ活性、tat 活性、または逆転写酵素活性を不活化する変異））によって、改変し得る。このような改変は、当該分野において一般に教示され、そして本発明の教示に関して適用され得る。例えば、表 A に列挙された「HIV ゲノム領域」に対応する部位を、所

望の改変を達成するために、本明細書中で開示される新規配列の対応する領域において改変し得る。さらに、本発明の改変された（合成）ポリヌクレオチド配列を、（例えば、被験体において免疫応答を生成するための組成物における）使用のために、以下の方法を含むが、これらに限定されない種々の方法において、組み合わせ得る：各々が本発明の1つのポリヌクレオチド配列を含む複数の個々の発現カセット（例えば、gag発現カセット、env発現カセットおよびrev発現カセット、またはpol発現カセット、vif発現カセットおよびvpr発現カセットなど）；本発明の複数のポリヌクレオチドのインフレーム融合によって生成されたポリタンパク質、ならびに本発明の複数のポリヌクレオチドを使用して生成されたポリシストロン性のポリヌクレオチド。

【0269】

10

（実施例2）

（合成コード配列についての発現アッセイ）

（A．C型HIVコード配列）

野生型のCサブタイプのHIVコード配列（例えば、AF110965、AF110967、AF110968、AF110975ならびに新規の南アフリカ系統8__5__TV1__C．ZA、8__2__TV1__C．ZAおよび12-5__1__TV2__C．ZA由来）を、合成配列がクローニングされたベクターと同じ特徴を有する発現ベクターにクローニングした。

【0270】

野生型および合成の配列を保有する種々のベクターについての発現効率を、以下のように評価する。いくつかの哺乳動物細胞株（293、RD、COS-7およびCHO；全ては、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、VA 20110-2209から獲得した）由来の細胞を、トランスフェクション試薬LT1（PanVera Corporation、545 Science Dr．、Madison、WI）中の2μgのDNAを用いてトランスフェクションする。細胞を、減少血清培地（Opti-MEM、Gibco-BRL、Gaithersburg、MD）中で5時間インキュベートする。次いで、培地を、以下のような正常な培地で置き換える：293細胞、IMDM、10%ウシ胎仔血清、2%グルタミン（BioWhittaker、Walkersville、MD）；RDおよびCOS-7細胞、D-MEM、10%ウシ胎仔血清、2%グルタミン（Opti-MEM、Gibco-BRL、Gaithersburg、MD）；およびCHO細胞、Ham's F-12、10%ウシ胎仔血清、2%グルタミン（Opti-MEM、Gibco-BRL、Gaithersburg、MD）。細胞を、48時間かまたは60時間のいずれかでインキュベートする。細胞溶解物を、以下の実施例3に記載のように収集する。上清を回収し、そして0.45μmシリンジフィルターを介して濾過する。上清を、HIV抗原に対するマウスモノクローナル抗体で被覆した96ウェルのプレート（例えば、Coulter p24アッセイ（Coulter Corporation、Hialeah、FL、US）を使用して、評価する。HIV-1抗原は、被覆されたウェルに結合する。HIVに対するビオチン化抗体は、結合した抗原を認識する。結合体化されたストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼは、ビオチンと反応する。色は、TMB基質とのペルオキシダーゼの反応から発色する。この反応を、4N H₂SO₄の添加によって終了させる。色の強度は、サンプル中のHIV抗原の量と直接比例する。

【0271】

合成C型HIV発現カセットは、種々の細胞株において発現された場合に、ネイティブ（野生型のサブタイプC）の配列と比較して、そのタンパク質産物の生成における劇的な増大を提供する。

【0272】

（B．シグナルペプチドリーダー配列）

種々のリーダー配列が発現を駆動する能力を、異なるリーダー配列に作動可能に連結さ

50

れた、野生型または合成の E n v コード発現カセットを細胞にトランスフェクションし、そして E L I S A またはウェスタンブロットによって E n v ポリペプチドの発現を評価することによって、試験した。種々のシグナルペプチドリーダー配列のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を、表 4 に示す。

【 0 2 7 3 】

【表 4】

表 4

リーダー	アミノ酸配列	DNA 配列
WTnative (8_2_TV 1_C.ZA)	MRVMGTQKNCQQWWIWGI LGFWMLMIC	ATGAGAGTGATGGGGACACAGA AGAATTGTCAACAATGGTGGATA TGGGGCATCTTAGGCTTCTGGAT GCTAATGATTGT
WTmod (8_2_TV 1_C.ZA)	MRVMGTQKNCQQWWIWGI LGFWMLMIC	ATGCGCGTGATGGGCACCCAGAA GAACTGCCAGCAGTGGTGGATCT GGGGCATCCTGGGCTTCTGGATG CTGATGATCTGC
Tpa1	MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPS AS	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGGC TCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTG GAGCAGTCTTCGTTTCGCCCAGC GCCAGC
Tpa2	MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPS	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGGC TCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTG GAGCAGTCTTCGTTTCGCCCAGC

293細胞を、8_2_TV1_C.ZA (TV1c8.2) エンベロープの、gp120形態およびgp140形態をコードする、ネイティブの構築物および配列改変された構築物を用いて、標準的な方法を使用して一過的にトランスフェクトした。E n v タンパク質を、細胞溶解物および上清中で、内部 E n v 捕捉 E L I S A を使用して、測定した。結果は、以下の表 5 に示され、そして TV1c8.2 の野生型のシグナルペプチドリーダー配列が、異種 t p a リーダー配列を使用して観察されたレベルよりも良いかまたはこのレベルに匹敵するレベルで、コードされたエンベロープタンパク質を効果的に発現するために使用され得ることを示す。さらに、この TV1c8.2 リーダーは、ネイティブの形態または配列改変された形態で働き、そしてネイティブの e n v 遺伝子または配列改変された e n v 遺伝子と共に使用され得る。全ての構築物を、p C M V l i n k 発現ベクターの E c o R I および X h o I 部位への遺伝子カセットのクローニング後に、試験した。

【 0 2 7 4 】

【表 5】

表 5

TV1c8.2 構築物	上清 (ng)	溶解物 (ng)	合計 (ng)
gp140nat.wtL	532	149	681
gp140nat.tpa1	250	20	270
gp140nat.tpa2	192	34	226
gp120mod.wtLmod	6186	4576	10762
gp120mod.tpa1	6932	3808	10740
gp120mod.wtLnat	6680	4174	10854
gp140mod.wtLmod	1844	8507	10351
gp140mod.tpa1	1854	2925	4779
gp140mod.wtLnat	1532	3015	4547

配列改変された TV1c8.2 エンベロープ改変体遺伝子カセットを、安定な哺乳動物

細胞株の誘導のために、Chiron pCMV発現ベクターにサブクローニングした。TV1c8. 2エンベロープタンパク質を発現する安定なCHO細胞株を、トランスフェクション、メトトレキサート増幅およびスクリーニングの標準的な方法を使用して、誘導した。これらの細胞株は、tpaリーダー配列を使用して発現されたタンパク質について観察されたレベルと匹敵するレベルのエンベロープタンパク質を分泌することが見出された。代表的な結果を、TV1c8. 2 gp120を発現する2つの細胞株クローンについて、表6に示す；これらを、類似の様式であるが、tpaリーダーを使用して誘導されたSF162サブタイプB gp120を発現する2つの参照クローンと比較する。タンパク質濃度を、半精製されたタンパク質のゲルを走査する濃度測定の後決定した。検量線を、SF2 gp120タンパク質の、高度に精製されかつ十分特徴付けられた調製物を使用して作製し、そして試験タンパク質の濃度を決定した。

10

【0275】

【表6】

表6

CHO細胞株	クローン番号	発現 (ng/ml)
gp120 SF162	クローン 65	921
	クローン 71	972
gp120TV1.C8.2	クローン 159	1977
	クローン 210	1920

20

これらの結果をまた、本質的に実施例3に記載のように、ウェスタンブロット分析によって確認した。

【0276】

(実施例3)

(発現のウェスタンブロット分析)

(A. HIV C型コード配列)

ヒト293細胞を、実施例2に記載されるように、天然または合成のHIV C型発現カセットを含むpCMVベースのベクターでトランスフェクトする。細胞を、トランスフェクト後の60時間、培養する。上清を記載のように調製する。細胞溶解物を、以下のように調製する。この細胞を、リン酸緩衝生理食塩水で1回洗浄し、界面活性剤(0.1M Tris-HCl, pH7.5中に1% NP40 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を含む)で溶解し、そしてこの溶解物を、新しいチューブに移す。SDS-ポリアクリルアミドゲル(あらかじめ成型した8-16%; Novex, San Diego, CA)に、20μlの上清または12.5μlの細胞溶解物を充填する。タンパク質スタンダード(5μl, 広範なサイズ範囲のスタンダード; BioRad Laboratories, Hercules, CA)もまた、充填する。電気泳動を実施し、タンパク質を、BioRad Transfer Chamber (BioRad Laboratories, Hercules, CA)を用いて、製造者の推薦の転写緩衝液(Millipore)を使用して、Immobilon P膜(Millipore Corp., Bedford, MA)に転写する。ここで転写は、100ボルトで90分間実施する。この膜を、HIV-1陽性ヒト患者の血清に曝露し、そしてオーフェニレンジアミン二塩化水素化物(OPD; Sigma)を用いて免疫染色する。

30

40

【0277】

免疫ブロッティング分析は、合成発現カセットを含む細胞が、ネイティブな発現カセットを含む細胞よりも細胞あたりより高い濃度で、予期したタンパク質を産生することを示す。このタンパク質は細胞溶解物および上清の両方に見られる。産生のレベルは、本発明の合成発現カセットでトランスフェクトした細胞の細胞上清において有意に高い。

50

【0278】

さらに、トランスフェクトした293細胞由来の上清を、ショ糖勾配で分画する。この上清のアリコート、20% (wt/wt) ショ糖溶液が下層に入ったPolyclearTM超遠心チューブ(Beckman Instruments, Columbia, MD)に移し、そしてBeckman SW28ローターで、28,000rpmで2時間の遠心分離に供する。生じるペレットをPBSに懸濁し、20~60% (wt/wt) ショ糖勾配上に重層し、そしてBeckman SW41tiローターで、40,000rpmで2時間の遠心分離に供する。

【0279】

次いで、勾配をおよそ10×1mlのアリコートに分画した(勾配の最高点で開始し、20%で終了)。サンプルを1~9分画から回収し、そして8~16% SDSポリアクリルアミドゲル上で電気泳動に供する。293/合成細胞由来の上清は、293/ネイティブな細胞由来の上清よりも非常に強いバンドを生じる。

10

【0280】

(実施例4)

(合成HIV C型発現カセットのインビボでの免疫原性)

(A. 免疫)

合成HIV C型発現カセットのおそらく改善される免疫原性を評価するために、マウス研究を実施する。プラスミドDNA(合成Gag発現カセットを有するpCMV KM2)を、100μlの総注射容積に、以下の最終濃度で希釈する: 20μg、2μg、0.2μg、0.02μgおよび0.002μg。希釈したDNAの考えられる陰性の希釈効果に克服するために、各サンプルにおける総DNA濃度を、ベクター(pCMV KM2)のみを用いて20μgにする。コントロールとして、ネイティブのGag発現カセットのプラスミドDNAを、同様の様式で取り扱う。12の群(4~10匹)のBalb/cマウス(Charles River, Boston, MA)を、表1におけるスケジュールに従って、筋内で免疫した(1下肢あたり50μl、前脛骨筋中に筋内注射)。

20

【0281】

【表 1】

表 1

群	Gag または Env の 発現カセット	Gag または Env プラスミド DNA の濃度 (μg)	免疫した時間 (週):
1	合成	20	0 ¹ , 4
2	合成	2	0, 4
3	合成	0.2	0, 4
4	合成	0.02	0, 4
5	合成	0.002	0, 4
6	合成	20	0
7	合成	2	0
8	合成	0.2	0
9	合成	0.02	0
10	合成	0.002	0
11	ネイティブ	20	0, 4
12	ネイティブ	2	0, 4
13	ネイティブ	0.2	0, 4
14	ネイティブ	0.02	0, 4
15	ネイティブ	0.002	0, 4
16	ネイティブ	20	0
17	ネイティブ	2	0
18	ネイティブ	0.2	0
19	ネイティブ	0.02	0
20	ネイティブ	0.002	0

10

20

30

40

50

1 = 「0 週間」で最初の免疫

1～5 群および 11～15 群を、0 週間（免疫前）、4 週間、6 週間、8 週間、および 12 週間で出血させる。6～20 群および 16～20 群を、0 週間（免疫前）および 4 週間で出血させる。

【0282】

（B. 体液性免疫応答）

体液性免疫応答を、免疫の 0 週間後および 4 週間後（5～12 群）、さらに免疫の 6 週間後および 8 週間後（それぞれ 2 回目の免疫の 2 週間後および 4 週間後）（1～4 群）に、マウス血清の抗 HIV 抗体 ELISA 法（固相酵素免疫検定法）を用いて確認する。

【0283】

血清の抗体力価を、適切な抗 HIV ポリペプチド（例えば、抗-Pol、抗-Gag、抗-Env、抗-Vif、抗-Vpu など）抗体 ELISA を用いて決定する。簡単に言えば、免疫したマウス由来の血清を、HIV タンパク質（例えば、p55 Gag タンパク質、Env タンパク質（例えば、gp160 もしくは gp120）または Pol タンパク質（例えば、p6、p67 もしくは RT）など）に対して指向された抗体によりスクリーニングする。ELISA マイクロタイタープレートを、1 ウェルあたり 0.2 μg の HIV タンパク質でオーバーナイトでコートし、そして 4 回洗浄する；次に、ブロッキングを、PBS-0.2% Tween (Sigma) を用いて 2 時間行う。ブロッキング溶液の除去後、100 μl の希釈したマウス血清を添加する。その後、血清を 1/25 希釈で試験し、そして連続する 3 倍希釈で試験する。マイクロタイタープレートを、4 回洗浄

し、そして第二のペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG抗体(Pierce, Rockford, IL)とともにインキュベートする。ELISAプレートを洗浄し、1ウェルあたり100 μ lの3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB; Pierce)を添加する。各々のウェルの光学密度を15分後に測定する。この報告される力価は、半分の最大光学密度(O. D.)を得る血清の希釈の逆数である。

【0284】

合成発現カセットは、ネイティブの発現カセットに対して免疫原性の明らかな改善をもたらす。

【0285】

(C. 細胞性免疫反応)

10

特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の頻度を、ペプチドパルスしたマウス(Balb/c, C57BL/6および/またはC3H)CD4細胞の標準的なクロマチン放出アッセイにより評価した。HIVポリペプチド(例えば、Pol, GagまたはEnv)発現ワクシニアウイルスに感染したCD8細胞を、陽性コントロールとして使用した。要するに、上記のように免疫したマウスから得た脾臓細胞(エフェクター細胞、E)を培養し、再刺激し、そしてGagペプチドパルスした標的細胞に対するCTL活性についてアッセイした(Doe, B., およびWalker, C. M., ADIS 10(7): 793~794, 1996に記載のように)。細胞傷害性活性を、標準的⁵¹Cr放出アッセイで測定する。標的(T)細胞を、種々のE:T比率でエフェクター(E)細胞と共に4時間培養し、そして二つ組のウェルからの平均cpmを用いて、⁵¹Cr放出比の割合を計算する。

20

【0286】

細胞傷害性T細胞(CTL)活性を、HIV GagまたはEnv DNAで免疫したマウスから回収する脾臓細胞において測定する。GagまたはEnv DNAで免疫した動物由来のエフェクター細胞は、HIVポリペプチドパルスしたSV-BALB(MHC適合する)標的細胞(CTL反応を示す)の溶解比を示す。ペプチドパルスされ、そしてMHC非適合マウス系(MC57)由来である標的細胞は、溶解しない。

【0287】

従って、合成発現カセットは、DNA免疫化による細胞傷害性Tリンパ球(CTL)反応の誘導能力の増強を示す。

30

【0288】

(実施例5)

(合成HIV C型発現カセットを用いる非ヒト霊長類のDNA免疫化)

非ヒト霊長類を、皮内に、粘膜にまたは両側の四頭筋に、筋内に種々の用量(例えば、1~5mg)および合成HIV C型プラスミドの種々の組み合わせを用いて、複数回(例えば、週に0、4、8および24回)免疫する。この動物を、各々の免疫の2週間後に出血させ、そしてELISAを単離した血漿を用いて実施する。このELISAを、二次抗体の結合が抗ヒトIgG(g鎖特異的)ペルオキシダーゼ結合であり(Sigma Chemical Co., St. Louis, MD 63178)、これを1:500の希釈で用いたことを除いて、本質的に実施例4に記載のように実施する。50 μ g/mlの酵母抽出物を、血漿サンプルの希釈物に添加し、そして抗体を結合させて、非ヒト霊長類において予め存在する酵母抗体に起因して非特異的バックグラウンドを減少させる。

40

【0289】

さらに、抗原に対するリンパ増殖性反応をまた、Tヘルパー細胞機能の誘導を示す免疫後に評価し得る。

【0290】

合成プラスミドDNAは、非ヒト霊長類において免疫原性になることが予測される。

【0291】

(実施例6)

(合成HIV C型発現カセットを含む組換えシンドビスのRNAおよびDNAのイン

50

ビトロでの発現)

αウイルスベクターにおける合成Pol、EnvおよびGag発現カセットの発現効率を評価するために、この選択した合成発現カセットを、プラスミドDNAベースのシンドビスウイルスベクターおよび組換えベクター粒子ベースのシンドビスウイルスベクターの両方にサブクロニングする。具体的には、シンドビスウイルスRNAベクターレプリコンのインビトロでの転写のためのcDNAベクター構築物(pRSIN-luc; Dubenskyら、J. Virol. 70:508~519, 1996)を、プラスミドの直線化のためのPmeI部位および異種遺伝子の挿入のためのポリリンカーを含むように改変する。ポリリンカーは、XhoI部位、PmlI部位、ApaI部位、NarI部位、XbaI部位およびNotI部位(XPANXNFおよびXPNXNR)を含む2つのオリゴヌクレオチドを用いて形成する。

10

【0292】

プラスミドpRSIN-luc(Dubenskyら、前出)を、XhoIおよびNotIを用いて消化し、ルシフェラーゼ遺伝子挿入物を取り除き、KlenowおよびdNTPを用いて平滑末端化し、そしてGeneCleanII(Bio01, Vista, CA)を用いてアガロースゲルから精製する。このオリゴヌクレオチドを、互いにアニールさせ、そしてプラスミドと結合させる。生じる構築物を、NotIおよびSacIで消化し、最小のシンドビス3'末端配列およびA₄₀トラクトを取り除き、そしてPKSSIN1-BV(WO97/38087)由来の約0.4kbpのフラグメントと連結させる。この0.4kbpのフラグメントを、NotIおよびSacIを用いるpKSSIN1-BVの消化、そしてアガロースゲルからのサイズ分画後の精製によって得る。このフラグメントは、完全なシンドビスウイルスの3'末端およびA₄₀トラクトならびに直線化のためのPmeI部位を含む。この新しいベクター構築物をSINBVEと命名する。

20

【0293】

この合成HIVコード配列を、EcoRIで消化し、KlenowおよびdNTPを用いて平滑末端化し、GeneCleanIIで精製し、SalIで消化し、アガロースゲル上でサイズ分画し、そしてGeneCleanIIを用いてアガロースゲルから精製することによって親プラスミドから得る。この合成HIVポリペプチドコードフラグメントを、XhoIおよびPmtIで消化したSINBVEベクターに連結させる。生じるベクターを、GeneCleanIIを用いて精製し、そしてSINBVGagで消化する。ベクターRNAレプリコンを、インビトロでSINBVGagから転写させ(Dubenskyら、前出)、そして細胞のトランスフェクションに直接使用し得る。あるいは、このレプリコンを、不完全なヘルパーRNAとともに同時トランスフェクションするか、またはαウイルスパッケージング細胞株を用いることによって、組換えベクター粒子中にパッケージし得る。

30

【0294】

このDNAベースのシンドビスウイルスベクターpDCMV SIN-β-gal(Dubenskyら、J. Virol. 70:508~519, 1996)を、SalIおよびXbaIで消化し、β-ガラクトシダーゼ遺伝子挿入物を取り除き、アガロースゲルのサイズ分画後、GeneCleanIIを用いて精製する。SalIおよびXhoIでSINBVGagを消化すること、アガロースゲルのサイズ分画後のGag含有フラグメントのGeneCleanIIを用いた精製および連結によって、HIV GagまたはEnv遺伝子を、pDCMV SIN-β-galに挿入させる。生じる構築物を、pDSIN-Gagと呼び、これは本明細書中に記載の任意の方法を使用して、インビボでの投与または処方のため直接的に使用し得る。

40

【0295】

BHK細胞および293細胞を、それぞれ組換えシンドビスRNAおよびDNAでトランスフェクトする。この上清および細胞溶解物を、Coulter capture ELISAを用いて試験する(実施例2)。

【0296】

50

BHK細胞を、組換えシンドビスRNAを用いてエレクトロポレーションによってトランスフェクトする。

【0297】

293細胞を、組換えシンドビスDNAを用いてLT-1を使用してトランスフェクトする（実施例2）。合成Gag含有プラスミドおよび／またはEnv含有プラスミドを、陽性コントロールとして使用する。上清および溶解物をトランスフェクションの48時間後に収集する。

【0298】

C型 HIVタンパク質を、合成発現カセットを用いて、DNAおよびRNAベースのシンドビスベクターシステムの両方から効率よく発現させ得る。

【0299】

（実施例7）

（合成Pol、Gagおよび／またはEnv発現カセットを含む組換えシンドビスレプリコンベクターのインビボでの免疫原性）

（A. 免疫）

シンドビスレプリコンにおける組換え合成HIV C型発現カセットの免疫原性を評価するために、マウスの研究を実施する。この合成発現カセットを有するシンドビスウイルスDNAベクター（実施例6）を、総注射容積（100 μ l）に以下の最終濃度で希釈する：20 μ g、2 μ g、0.2 μ g、0.02 μ gおよび0.002 μ g。希釈したDNAの考えられる陰性の希釈効果を克服するために、各々のサンプルの総DNA濃度を、シンドビスレプリコンベクターDNAのみを用いて20 μ gにする。12群（4～10匹）のBalb/cマウス（Charles River, Boston, MA）を、表2のスケジュールに従って、筋内で免疫した（1下肢あたり50 μ l、前脛骨筋中に筋内注射）。あるいは、シンドビスウイルス粒子を、表3に示すように、100 μ l中に以下の用量で調整する： 10^3 pfu、 10^5 pfuおよび 10^7 pfu。シンドビスHIVポリペプチド粒子調整物を、マウスに筋内経路および皮下経路を用いて投与する（1部位あたり50 μ l）。

【0300】

【表2】

表 2

群	Gag または Env の 発現カセット	Gag または Env DNA の濃度 (μ g)	免疫した時間 (週):
1	合成	20	0 ¹ , 4
2	合成	2	0, 4
3	合成	0.2	0, 4
4	合成	0.02	0, 4
5	合成	0.002	0, 4
6	合成	20	0
7	合成	2	0
8	合成	0.2	0
9	合成	0.02	0
10	合成	0.002	0

1 = 「0 週間」で最初の免疫

【0301】

【表 3】

表 3

群	Gag または Env 配列	ウイルス粒子の濃度 (pfu)	免疫した時間 (週):
1	合成	10^3	0 ¹ , 4
2	合成	10^5	0, 4
3	合成	10^7	0, 4
8	合成	10^3	0
9	合成	10^5	0
10	合成	10^7	0

1 = 「0 週間」で最初の免疫

群を出血させ、そして体液性および細胞性（例えば、特異的 C T L の頻度）の両方の評価を、本質的に実施例 4 に記載のように実施する。

【0302】

（実施例 8）

（新規の H I V C 型改変体の同定および配列決定）

H I V C 型をコードする 8 _ 5 _ T V 1 _ C . Z A と呼ばれる全長クローンを、単離しそして配列決定した。手短に言えば、H I V - 1 C 亜型に感染した南アフリカ人の患者由来のゲノム DNA を、アルカリ性溶解および陰イオン交換カラム (Q u i a g e n) により P B M C (末梢血単核細胞) から単離した。全長クローンのゲノムを得るために、二等分を増幅した。後にこれらを、両方のフラグメントにおける特有な S a l 1 部位を用いて P o l 領域内で、インフレームで一緒に結合させる。増幅のために、業者のプロトコルの後に、200 ~ 800 ng のゲノム DNA を、緩衝液および E x p a n d L o n g T e m p l a t e P C R S y s t e m (B o e h r i n g e r M a n n h a e i m) の酵素混合物に添加した。このプライマーを既知の全長配列の整列の後に設計した。5' 半分のために、20 位置にチミジン (S 1 F C S a c T A 5' - G T T T C T T G A G C T C T G G A A G G G T T A A T T T A C T C C A A G A A - 3'、配列番号 38) またはシトシン (S 1 F T S a c T A 5' - G T T T C T T G A G C T C T G G A A G G G T T A A T T T A C T C T A A G A A、配列番号 39) いずれか、および S a l 1 部位を含む 2 つの正方向プライマーのプライマー混合物を用いた。逆方向プライマーもまた、13 位置にチミジンまたはシトシンのいずれかを含む 2 つのプライマー (S 1 4 5 R T S a l T A 5' - G T T T C T T G T C G A C T T G T C C A T G T A T G G C T T C C C C T - 3'、配列番号 40 および S 1 4 5 R T S a l T A 5' - G T T T C T T G T C G A C T T G T C C A T G C A T G G C T T C C C T - 3' 配列番号 41) の混合物であり、そして S a l 1 部位を含む。3' 半分についての正方向プライマーはまた、S a l 1 部位および 12 位置にアデニンまたはグアニンを有する 2 つのプライマー (S 2 4 F A S a l T A 5' - G T T T C T T G T C G A C T G T A G T C C A G G a A T A T G G C A A T T A G - 3' 配列番号 42 および S 2 4 F G S a l T A 5' - G T T T C T T G T C G A C T G T A G T C C A G G g A T A T G G C A A T T A G - 3' 配列番号 43) の混合物である。逆方向プライマーは N o t 1 部位を有する (S 2 _ F u l l N o t T A 5' - G T T T C T T G C G G C C G C T G C T A G A G A T T T T C C A C A C T A C C A - 3' 配列番号 44)。増幅後の P C R 産物を 1% アガロースゲルを用いて精製し、T A クローニング (I b v i t r o g e n) によって p C R - X L - T O P O ベクターにクローニングした。コロニーを制限分析によって確認し、配列を実証した。全長配列のために、5' 半分および 3' 半分の配列を結合させた。この配列を配列番号 33 に示す。さらに、重要なドメインを表 A に示す。

【0303】

12-5__1__TV2__C. Z Aと呼ばれる別のクローンもまた、配列決定され、配列番号45に示す。このドメインは本明細書の技術から見て容易に決定され得る。例えば、表Aに示されるこれらの配列を整列されることによって、クローン12-5__1__TV2__C. Z Aの対応領域を発見する。

【0304】

上記のように（実施例1、表C）、合成発現カセットを、8__5__TV1__C. Z Aまたは12-5__1__TV2__C. Z Aから得た1つ以上のポリヌクレオチド配列を用いて生成した。

【0305】

本明細書中に記載のポリヌクレオチドは、全てChiron Corporation Emeryville, CAに寄託している。

【0306】

本発明の好ましい実施形態はいくらか詳細に記載されているが、明らかな改変が添付の請求項により規定される本発明の精神および範囲から逸脱することなしになされ得ることが理解される。

10

【図1】

1/14

Gag_AFI10965_BW_mod

ATGGGCGCGCGCGCGCATCTCGCGCGCGCGCAAGCTGGACGCGCTGGGAGCGCATCCGCG
TGGCGCGCGCGCGCGCAAGAGTGTCTATGATGAAGCACCTGGTGTGGCGCGCGCGAGCT
GGAGAGTTGCGCTGAACCGCGCGCTGTGGAGACCGAGGGCTGCAAGCAGATCATC
CGCCAGCTGCACCGCGCGCTGCAGACCGCGAGAGGAGCTGAAGAGCTGTTCAACACCG
TGGCCACCTGTACTGCTGCGAGAGAGATCGAGGTGCGGACACCAAGGAGCGCTGGA
CAAGTCGAGGAGGAGCAAGACAGTGCAGCAGAGATCCAGCAGGCGGAGGCGCGCGAC
AAGGGCAAGGTGAGCCAGAACTACCCATCGTGCAGAACCTGCAGGGCCAGATGGTGACCC
AGGCCATCAGCCCGCGACCTGAAAGCGCTGGGTGAAGGTGATCGAGGAGAAAGGCTTCAG
CCCCAGGTGATCCCATGTTCAACGCGCTGAGCGAGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
ACGATGTTGAACACCGTGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
ACGAGGAGCG
CCGATGCGCGAGCG
ATCGCTGGATGACCGAGCAACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
TCCTGGCGCTGAACAGATCGTGGGATGTACAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
GGGCG
CAGAGCACCG
CGACTGCAAGACATCTCGCGCGCTCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
CGCGTGCAGGCGCTGGGCG
CAGGCGCAACACCG
ACCTTCG
GCG
GAAGCAGGAGGAGCG
CCCCGAGCG

Figure 1

【図2】

2/14

Gag_AFI10967_BW_mod

ATGGGCGCGCGCGCGCATCTCGCGCGCGCGCAAGCTGGACAGTGGGAGAGATCCGCG
TGGCGCGCGCGCGCGCAAGAGCACTACATGCTGAAGCACCTGGTGTGGCGCGCGAGCT
GGAGGGCTTCGCGCTGAACCGCGCGCTGTGGAGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
AAGCAGCTGCAGCGCGCGCTGCAGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
TGGCCACCTGTACTGCTGCGAGCGCGCGCATCGAGGTTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
CAAGATCGAGGAGGAGCAAGAACAGTCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
GGCAAGGTGAGCG
CCATCAGCG
CGAGGTGATCCCATGTTCAACGCGCTGAGCGAGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
ATGTTGAACACCGTGGGCG
AGGAGGCGCGCGAGTGGGAGCGCGCTGCACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
GATCG
GCCTGGATGACCG
TGGCGCTGAACAGATCGTGGCGATGTACAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
CCCCAGGAGCGCGCTTCGCGAGTACGTGGACCGCTTCTCAAGACCGTGGCGCGCGCGCGCG
GCCACCGAGCGCGTGAAGAACTGGATGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
ACTGCAAGACCATCTCGCGCGCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
CTGCCAGGCGCGTGGGCG
GCCAACCGGTGAACATCATGTGCAAGAGGCAACTTCAAGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
AGTGTCTCAACTGCG
GGGCTGTGGAAGTGGCG
AACTTCG
GCG
GAAGCAGGAGGAGCG
CCCCGAGCG

Figure 2

Fig. 3

5/114

Seqs_AF110965_BW_cp1

ATGGGAGCGCCGCGCGCAGCATCTCTCGCGCGGGCAGCTGGAGCGCTGGGAGGCGCATCCGCTGCGCGCCGG

CGGCAAGACATCTGCTACATGATCTGAAGCACCCTGGTGTGGGCGACGCGCGAGCTGGAGAAAGTTCCGCTGAACC

CCGGCCTGCTGTCAGACACGAGGGGCTGCAAGCAGATCATCCGCGACGTGACCCCGCCTGCAGAACCGCG

AAGCGAGGAGCTGAAGAGCCTGTTCAACCCCTGGCCACCCCTGACTGCTGCTGCACGAGAGATCGAGTGG

CGACACCAAGGAGGCCCTGCGACAGATCGAGGAGGACGAGAACAAAGTGCACGACGAAGATCCAGCAGCGCG

AGCGCGCCGACAAAGGGCGAAGCTGAGGCCAGAACTACCCCATCGTCCAGAACCTGCAAGGGCCAGATGGTGAC

CAGGCGCATCAGCGCCCGCAGCCTGAAACCCCTGGTGAAGGCTGATCGAGGAGAAAGCCCTTCAGCCCGAGGT

GATCCCATCTGTTACCGCCCTGAGCGAGGGGCGCACCCCGCCAGGACCTGAACACAGTGCAGACCCGTGG

GGGGCCACGAGCGCGCCGATCGAGATGCTGAAGAG,CAACCTCAACGAGGAGGCGCGAGTGGGAGCGCGGTG

CACCCGCTGTCACGCGCGCCCATCGCCCGCGCACATCTGCGGAGCCCGGCGAGCGACATCGCGGGCAC

CHACGACAGCTCTGACGAGAGCATATCGCCCTGGATGACCGACAAACCCGCCATCCCGCTGGGCGACATCTACA

AGCGAGGATCATCTCGGCTGAACAGATCTGGCGCATGTACAGATGACACGCGCGGTGAGCATCTTGACATCAAG

CAGGGCGCCACAGGAGCCCTTCGCGACCTAGCTGAGCCGCTCTTCAAGACCTCGCGCGCGAGCAGAGCAC

CCAGGAGGTGAAGAACTCGATGACCGCAACCTGCTGGTGGAGAGCGCAACCCCGGATCTGACAGACCATC

TGGCGCGCTGCGCGCGCGCGCGACGCTGGAGGAGATGATGACCGCTGCCAGGGCGTGGGCGGCCCGACG

CAAGAGCGCCCGCTGCTGCGCGAGGCGCATGAGCGAGCGCAACACAGCGTGATGATGACAGAGAGCACTT

CAGGGCGCCCGCTCGCATCGTAAGTCTCTAAGTGGGCGAGGAGGGGCCACATGCTGCCCGCATCTCGCGG

CCCCCGCAGAGAGGGCTGCTGGAAGTGGCGAAGGAGGGGCCACCAAGATTAAGCATGCGACCGAGCGCGAG

GCCATCTCCCTGGCCAGAGTCTGGCCCGACACAGGGCGCGCGCGCGCGCATGAGCTGCGAGAGCGCCCGGA

GGCCATCGCGCGCGCGCGAGGACCTCCGCTCGAGAGAGACACCCCGCGCCAGAGCAGGAGAGCAGAG

ACCGGAGAGCCCTGACACGCTGAGAGGCTGTTCCGCAACGACCCCTGAGCCAGTAA

Figure 5

Fig. 4

6/114

GAG_AFI0967_BW_opt
 ATGGGACCGCCGCGGCCGACGCTCTGGCGGCGGACGAAGCTGGACAAGTGGGAGAGATCCGCTCGCCGCCGCGG
 CAGGAGAGACCACTCATCTGTGAGACACCTGGCTGGGCGCAGCGCGAGCTGGAGGCGCTTCGCGCTGAAAC
 CCGGCCCTGCTGGAGACCGCGGAGAGGCTGCAGACGAGCTGACGACAGCGAGCTGACGCGGCTGCTGCGACGCGC
 ACCGAGGAGCTGGCGACGCTGTACAAACCGTGGCCACCTGTACTGGGTGCACGCCGCGCATCAGGGCTGG
 CGACACCAAGAGGCGCTTGGACAGATCGAGGAGGACGACGACCAAGCGCCAGCAGAGAACCACGACGCGCA
 AGGAGGGCCGACCGCAAGTGTGACGCCAAGACTACCCACTGCTGCAGAACCTCGACGGCCAGATGTGTGCACAG
 GCCATCAGCCCCCGCACCTGAAAGCGCTGGGTGAAGTGTATCGAGGAGAAAGGCTTCACGCCCGAGGTGTAT
 CCCCATTCTTCAACGCGCTGAGCAGGGCGGCCACCCCGCAGGACCTTGAACTGAGTGAACACCGTGGGGCT
 GGCACCAAGGCGCCGATGCAATGTCTGAAGGACACCATCAACAGGAGAGCGCCGACGATGGGACCGCTGCAC
 CCGGTGGCGCCGCGCCCTGTGGCCCCGCGCAGATGGCGGACCCCGCGGACGAGCATCGCGCGCGCCAC
 CAGCAACGCTGAGGACGAGTGTGGCTGTGATGACCAAGACATCCCGCCGCTGGTGGCGGACCTATCAAGAC
 CTGTGATCATCTCTGGGCTGACACAGCTGGCTGGCTGACGACCGCCCTGGAGCATCTGACATCTCGGACG
 GGCOCACAAAGGAGCTTCCCGACTATCTGGAGCGGCTTCTCAAGACCGCTGGCGCGCGAGCGAGGCGACCA
 GGACGTGAGAACTGTGATGACGAGACCTGCTGTGCAAGCGCAACCCCGACTGCAAGACATCTCTGC
 GCGGCGCGCGCCCGCGCCACCTGGAGGAGATGATGACCGGCTGCCAGGCGCTGGCGGCGCCGCGGAC
 AAGGCGCGCGCTGTCTGGCGAGGCTGATGGAGCGAGGCCAACAGCGGTGAACATCATGATGCAAGAGGCAACTT
 CAAAGGCGCGCTGCAACCTGAGTGGTTCACCTGGCGGCAAGGAGGCCACATCGACAGAACTATCGCGG
 CCCCCCGCAAGAGGGGTGCTGGAATGTGGCGAAGGAGGGCGACCGAGATGAAGAGCTGACACCGAGCGCCAG
 GCGAACTTCTGTGGGACAGATCTGGCGCAGCACAAGGGCGCCCGCCGCGACCTTCTTGCAGAAACGACGAGA
 GCGCCGCGCGCCCGACCTGGCGCCACCGCCGCCCGCCCGCGGACGACTTCGCTGTGAGGAGACCAACCCCGGCC
 CCAGACAGGAGCGCCAGGAGCGCGGAGCCCTACGCGGAGCGOCTGACCGCCCTTGCACGAGCTGTTTGGCAGC
 GCGCCCGCTGAGCACTAA

Figure 6

【図 1 1 - 1】

11/14

8_5_ZA (SEQ ID NO:33)

1 TGGAGGGGTT AATTACTCC AAGAAAGGC AAGAAATCTT TGATTGTGG GTCTATCACA
61 CACAAGGCTT CTTCCTGGAT TGGCAAAATC ACACACCGGG GCCAGGGGTC AGATATCCAC
121 TGACCTTTGG ATGGCTGCTAC AAGCTAGTCC CAGTGTACCC AGGGGAGGTT GAGAGGCCCA
181 AGGAGGAGA AGACAACGTT TTGCTACACC CTATAGACCA ACATGAGACA GAGGATGAAG
241 ATGAGGAAGT ATTAAGATGG AAGTTTGACA GCCTCTAGC ACACAGACAC ATGGCCCGGG
301 AGCTACTCC GGAGTATTAC AAGACTGTCT GACACAGAG AGACTTTCCG CTGGGACTT
361 TCCACTGGGG CGTTCCGGGA GGTGTGGTCT GGGCGGAGCT TGGGAGTGGT CAACCCCTAG
421 ATGCTGCATA TAAGCAGCTG TTTTTCGCCCT GTACTGGGTC TCTCTCGGTA GACCAGATCT
481 GAGCCTGGGA GCCCTCTGGC TATCTAGGGA ACCCACTGCT TAAGCCTCAA TAAAGCTTSC
541 CTGTGATGCT TTAAGTAGTG TGTGCCCATC TGTGTGTGTA CTCTGGTAAC TAGAGATCCC
601 TCAGACCCCT TGTGTAGTGG TGGAAATATCT CTAGCAGTGG CGCCCGAACA GGGACCGA
661 AGTGAAAGTG AGACAGAGG AGATCTCTCG AGCGAGGACT CGCTCTGGCT AGAGTGCAC
721 GCGAAGAGGC GAGAGGGGGC GCTGTGTGAG AGCGACTCAA TATTAAAGGTT
781 GAAGGAGAGA GATGGGTGCG AGAGCTGCTG GTTAAAGCAT CTAGTATGGG
841 AAAGAATTAG GTTAAAGGCC GGGGAAAGA ACCTATATAT GTTAAAGCAT CTAGTATGGG
901 CAGCAGGGA GCTGGAAAGA TTTGACATTA ACCCTGGGCT GTTAAAGCAT CTAGTATGGG
961 GTAAACAAAT AATAAAGAG CTACACAGG CTCTTCAGRC AGGAACAGAG GAACTTAGAT
1021 CATTATTCAA CATAGTAGCA ACTCTCTATT GTGTACATTA AGGGATAGAG GTACGAGACA
1081 CAGGAAAGC CTTAGACAGA ATAGAGAGG ACACAAACAA ATGTACGACA AATGCCAAC
1141 AGGCAAAAGC AGCTGACAGA AGGTTCAGTC AAAATTATCC TATAGTACAG AATGCCAAC
1201 GCGAAATGGT ACACCAAGCT ATATCACTTA AAGATTGAA TGCATGATA AAGATATAG
1261 AGGAAAGGC TTTCAATCCA GAGGAATAC CCATGTTTAC AGCATTATCA GAGAGGCCA
1321 CCCCACAGA TTTAAACAGA TGGTAAAGTG CAGATGGGCT GAGAATGGGA TAGGACACAT CCAGTACATG
1381 TGTAAAGA TAACATCAAT GAGAGAGCTG CAGATGGGCT ACATCAAGCA GCAATGACAA
1441 CAGGCGCTGT TATCAATCCA GAGAGAGCTG CAGATGGGCT ACATCAAGCA GCAATGACAA
1501 CTAGTACCTT TCAGAAACAA ATAGACTGGA TGACAAGTAA TCCACCTATT CCAGTAGAAG
1561 ACATCTATTA AGATGTGATA ATCTCTGGGT TAAATAAAT AGTAAGAATG TATAGCCCTG
1621 TTAGCATTTT GGAATATAAA CAGGAGCCAA AAGAACCCCT TAGAGACTAT TATAGCCGCT
1681 TCTTTAAAGT CTTAAGAGCT GAACAGACTA CACAGATGTT AAGAATGAG ATGACAGACA
1741 CTTGTGTGGT CAAATATGCG AACCAGATT GTAGAACCAT TTTAAGAGCA TTAGACCAAG
1801 GGGCTCATTT AGAGAAGATG ATGACAGCT GTACGGAGT GGGAGGACT AGGCAATAAG
1861 CAGAGTGTTT GGCCTGAGCA ATGAGCAGG CAAACAGTAA CATACTAGTG CAGAGAGCA
1921 ATTTTAAAGG CTTACAGAGA ATTAATTAAT GTTCAACTG TGGCAAGTA GGGCACTAG
1981 CCGAAGATTG CAGGCGCCCT AGGAAAGAG GCTGTGGAAA ATGTGGACAG GAGGAGCAC
2041 AATTAAGAGA CTGTACTAGT AGGCAGGCTA ATTTTGGAAA GAAATTTTGG CCTGTCCAC
2101 AGGGGAGGCC AGGGAATTTT CTTCCAGACA GACAGAGGCC AACACGCCCA CACGAGAAC
2161 CACAGGCCCC ACCAGCAGAG AGCTTCAGGT TCGAGAGAGC AACCCGCCGT CCGTAGAAC
2221 AGAAGAGAG GGAACCTTTA ACTTCCCTCA ATCACTCTCT TGGCAGAGC AGATATAGCT
2281 AATAAAGTA GAGGCGCAGA TAAAGAGGC TCTCTTAGAC ACACAGCAGA ATGTAGTAGG
2341 ATTAGAAGA ATAGATTTTC CAGGGAATG GAAACCCAAA ATGTAGTAGG ATGTAGTAGG
2401 TTTATCAAAA GTAGAGACT ATGATCAAT CACATAGAA ATTTGTGAAA GAAAGGCTAT
2461 AGGTACAGTA TTGATAGGCT TCACACAGT CACATAGAA ATTTGTGAAA GAAAGGCTAT
2521 GCTGTAGTGC ACACATAAT TTCCATTTAG TCCATTTGAA ACTGTACAGC TAAATATAAA
2581 ACCAGGAATG GATGGGCCAA AGGTCAACAA ATGTAGTAGG ATGTAGTAGG ATGTAGTAGG
2641 ATTAACAGCA ATTTGTAGAG AATGTAGGAA GAAAGGAAA ATTAACAAA TTTGGGCTGA
2701 TATCCATATG TTAGAGAGAC TCAATAAAG AACTCAGAC TTTTGGGAG TTAATTAGG
2761 ATTAGTAGAT AACTCCAGC TAAATAAAG AACTCAGAC TTTTGGGAG TTAATTAGG
2821 AATACACAC CCACAGAGT TCAATAAAG AACTCAGAC TTTTGGGAG TTAATTAGG
2881 TGTATATT TCACTTCTT TAGATGAAG CTTACAGAAA TATACTGAT TCAACATACC

FIGURE 11

【図 1 1 - 2】

12/14

2941 TAGTATAAAC AATGAAACAC CAGGAGTAG ATATCAATAT AATGTGCTGC CACAGGGATG
3001 GAAAGGATCA CCAGCAATAT TCCAGAGTAG CATGACAAA ATCTTAGAGC CCTTCAGAGC
3061 AAAAAATCCA GACATAGTTA TCTATCAATA TATGGATGAC TTGTATGTAG GATCTGACTT
3121 AGAAATAGGG CACATAGAG CAAATATAGA AGAGTTTAGG GAACTTTTAT TGAATGGGG
3181 ATTTACRACA CCAGACAAGA AACATCAAAA AGAACCCCCA TTTCTTTGGA TGGAGTTGTA
3241 ACTCCATCTT GACAAATGGA CAGTACACCC TATACTGCTG CCAGAAAGAG ATAGTGTGAC
3301 TGTCAATGAT ATACAGAAGT TAGTGGGAAA ATTAACACTGG CCAAGTCAGA TTTTCCAGG
3361 GATTAAAGTA AGGCAACTCT GTAACTCTCT CAGGGGGGCC AAAGCACTAA CAGACATAGT
3421 ACCACTACTT GAGGAAGCAG AATTAGAAAT AGAACCAATT AGAAATCTGA AACACAGGG
3481 AGTACATGGA GTATATTATG ATCCATCAAA AGACTTGTAT GCTGAAATTT TAAGAGAAC
3541 GCAATGACAA TGGACATATC AAATTTATCA AGAACCAATT AGAAATCTGA AACACAGGG
3601 GTATGCAAAA ATGAGGAGTA CCAACATATA TGAATTTTGA TGAATTTTGA AACACAGGG
3661 AAAAAATAGC ATGGAAGACA TGTAAATTTG GGAAGAGACT CTTAAATTTA GACTACCAAT
3721 CCAAAAGAGA ACATGGGAGA CATGGTGAGC AGACTTTTGG CAGGCCACTT GSATCCCTGA
3781 GGGGAGTTT GTTAAATACC CTCCCTTAGT AAAATTTATG TACCACTAG AAAAGATCTC
3841 CATACAGAGA GTGAAATCT TCTATGTAGA TGGGCAACT AATAGGGAG CTAATATAGG
3901 AAAAGCAGG TATGTACTG ACAGAGGAAG CAGAAATAT GTTACTCTAA CTAACACAC
3961 AATTCAGAG ACTGATGAT AAGCAATCCA GCTAGCTCTG CAGGATTCAG GATCAGAAGT
4021 AAACATAGTA ACAGACTCAC AGTATGCAIT AGGAATCAIT CAAACACAC CAGATTAAGAG
4081 TGACTCAGAG ATATTATACC AAATAATAGA ACATGTAATA AACATCACT GATCTACCT
4141 GTCATGGGTA CCAGCACATA AAGAAATGG GGAATATGAA CAGATAGATA AATTAGTAG
4201 TAAAGGAATT AGGAAAGTGT TGTTCCTAGA TGATATAGT AAGCTCAAG AAGAGCATGA
4261 AAGGTACCAC AGCAATTTGA GAGCAATGGC TAAATAGATT AATCTGCCAC CCATAGTAGC
4321 AAAAGAAATA GTAGCTAGCT GTGATAAATG TCAGCTAATA GGGGAGGCCA TACATGACCA
4381 AGTCACTGT AGTCCAGGGA TATGGCAATT AGATTTGATC CATTTAGAGG GAAATATCAT
4441 CCTGTTAGCA GTCCATGTAG CTATGGCTAG CATGAGAGCA GAGGTATATCC CACGACAGCA
4501 AGGACAGAGA ACAGCATATT TTAATTTAAA ATTAGCAGGA AGATGGCCAG TCAAAATCAT
4561 ACATACAGAC AATGGCATTA ATTTTACGAG TACTGCAATT AGGAGACCTT TGTGTGGGCT
4621 AGGTATCCAA CAGGAATTTG GAATTCCTTA CAATCCCCCA AGTCCAGGAG TGTGTAGATT
4681 CATGAATAAA GAATTAAGAA AATAATAGG ACAAGTAAGA AAGAAATGAG GATCAGCTTA
4741 GACAGCATGA CAAATGGCAG TATTCATTCA CAATTTTAAA AGAAGAGGGG GAATTTGGG
4801 GTACAGTACA GGGGAAAGAA ATATAGACT ACATGACATA AAGAAATGAG GATCAGCTTA
4861 ACAGAAACAA ATTTAAGAAA TCAAAATTT TCGGTTTAT TCGGTTTAT TCGGTTTAT
4921 TMTTTGAAA GAGCCAGGAG AACTACTCTG GAGGAGGAG AAGAAATGAG GATCAGCTTA
4981 TAAAGTGATC ATAAAGGATG TACCAAGGAG GAGGAGGAG AAGAAATGAG GATCAGCTTA
5041 ACAGAGTACA GGTGTGATG GTGTGAGG GAGGAGGAG AAGAAATGAG GATCAGCTTA
5101 GTTATGAAA GCAACATATG TATATATCAA GAGAGGATG TGAATTTGAG TCAAGATCAT
5161 ATTTTGAAG CAGACATCCA AAGTAAGTT CAGAGATACA TATCCCATTA GGGATTTGTA
5221 GATTAGTAAT AAAAACATAT TGGGTTTGC AGACAGGAG AAGAAATGAG GATCAGCTTA
5281 ATGAGCTCTC CATAGATATG AGACTAGAG AATACAGCAC CAAAGTAGAC CTTGACTGAG
5341 GACAGCAGT AATTCACATG CATTTTGTG ATTTTGTG ATTTTGTG ATTTTGTG
5401 CATATTAGG ACACATAGTT TTTCTAGTGT GTGACTATCA AGGAGGATC AAGAGAGTAG
5461 GATCTCTGCA ATACTTGGCA CTGACAGCAT TGAATAAACA AGAACAGAG AACCACTAG
5521 TGCTTAGTGT TAGAAAATTA GTAGAGGATA GTAGGAGGA CCCCCAGAG ACCAGGGGCT
5581 GAGGAGGAAA CCAATACATG AATGAGCACT AGAGATTTCT GAGAGACAA CAGAGGAGC
5641 GTACAGACAC TTTCTAGAC CATGGCTCCA TAGCTTAGGA CAATATATCT ATGAAACCTA
5701 TGGGATACT TGGAGCGGAG TTGAGACTAT ATGAGGATAT CTGACACAG TACTTCTAT
5761 TCAATTTAGA ATTTGATGCC AACATAGAG AATAGGCACT TTGAGACAG CAGAGGAGC
5821 AATAGGAGC AGTATAGCTT AAATCAAGC CCGTAGGACA TCCAGAGAG CAACTTAAA
5881 CAGCTTGTAA TAATGTCTT TGCAACACT GTAGCATACA TGTCTAGTT TGTCTTACGA

FIGURE 11

【図 1 1 - 3】

13/14

5941 CAAAGGTTT AGGCATTTC TATGCGAGA AGAAGCGGAG ACAGCGACGA AGCGCTCCTC
6001 CAGTGGTGA AGATCATCAA AATCCTCTAT CAAAGCAGTA AGTACACATA GTAGATGTAA
6061 TGTTAAGTTT AGATTTATT AAGAGATGAT ATATATAGAT AGGAGTAGGA CATGATGATG
6121 TAGCACTAAT CATAGCAATA ATAGTGTGGA CCAATAGCATA TATAGAAATAT AGGAATTTGG
6181 TAGACAAAAA GAAATATAGC TGGTAAATTA AAGAATTTAG AAGAAGAGA GAGAGCAGTG
6241 GCAATGAGG TGTATGGGAG CAGAGAGATG TGTCAACAT ATGTTGATAT GGGCATCTTA
6301 GCGTCTGGA TGGAGAGAGC TTTGACACAG GAGGAGCTGT GGTGTACAGT CTAATGTGG
6361 GTACTGTGT GGGAGAGAGC TTTGACACAG CAGGAGCTGT GGTGTACAGT CTAATGTGG
6421 GAGCAGAGAG TGTATGAGT CTGGGCTCTA CTATTTCTGT CATCAGATGC TAAAGCATAT
6481 CACAGAGAG TTTTGGGAAA TGTACAGAA ATTTTATATA TGTGAGAAA TAACTGTGCA
6541 GATCAGATGC ATGAGGATAT ATCAGTTTGA TGGAGTCAA GCTCAAGCC ATGTTTGAAG
6601 GTGACCCCA CTGTTGTCTC ATTAAGCTTA AGAGTACAA ATGTTACAG TAAATGTAG
6661 GTTACAGGTA ATACAAATGA TACCAATATT GCAATGTGCTA CATATAGTGA TGAAGTAAG
6721 AAAAAATGCT CTTTCAATGC AACCAAGAA TTAAGAGATA AGAACAATA AGAGATGCA
6781 CTCTTTTATA AACTTGATAT AGTACCACCT AATGAAATA GTAACAACT TACTATAGG
6841 TTAATAAATT GCAATACACT AACCAATCA CAGGCTGTCT CAAAGGTCTC TTCTATGCA
6901 ATTCCTATAC ATTAATCTGT CCAAGCTGAT TATGCGATT CAAAGGTCTC TAAATAGCA
6961 TTTCAATGGG CAGGACCATG TTTATATGTC AGCAGATAC AATGTACACA TGAATTTAG
7021 CAGTGTGAT CAACTCACT ACTGTTAAAT GGTAGTCTAG CAGAAGAGG GATATTAAT
7081 AGATCTGAAA ATTTGACAGA GAATACCAAA ACATATATAG TACATCTTAA TGAATCTGTA
7141 GAGATTAATT GTACAAAGCC CAACTAAT ATAGAGGAAA GTGTAGGAT AGGACAGGA
7201 CAGCATCT ATGCAACAAA TGACGTATA GGAACAATA GCAAGCACA TTTTACAT
7261 AGTACAGATA GATGGAATAA AACTTTTCAA CAGGTATAGA AAAAATTAG AGAGCATTT
7321 CCTAATAAAA CAATAAATTT TGAACCAT GCGAGGAGG ACTTAGAAT TACAATGCTAT
7381 AGCTTTAATT GTAGAGGAGA ATTTTCTTAT TGCAATACAT CAAACCTGTT TAAATGATCA
7441 TACTACCTTA AGAATGTGAT ATCAAAATAC AATGTATAT CAACTTACC CATCACACT
7501 CAATGCAAAA TAAACAAAT TGTAGCATG TGGCAAGGG TAGGACAGC AATGTATGCC
7561 CTCTCCATG CAGGAACATC AACTATAGA TCAAAATCA CAGGAATATC ATTAGACAGT
7621 GATGGGAGT TTAACACAC AAACACAGC ACAGAGGAGA CATTGACAG AATTAGGACA
7681 GATNTGAGG ATACTGAGG AAGTGAATTA TATAAATATA AAGTGGTAGA AATTAGGACA
7741 TGGGAAATG CACCCATGA CAGGAGGAGT TGTGAGTGA TATGAGTGA TATGAGTGA
7801 GAAATAGAG CTGTTTCTCT TGGGTTCTG GAGAGGAGG GAGGAGGAG GAGGAGGAG
7861 TCAATACGCG TGAAGGTAAG GCGACACAA CTGTTTCTG GTATAGTGA ACAGCAAGG
7921 AATTGTGGA AGGCTATAGA GCGACACAG CATATGTGCT AACTCAGT CTGAGGACT
7981 AAGCAGCTCC AGGCGAGGCT CTGCTGCTA TAAAGATACC TAAAGATACA ACAGCTCTA
8041 GGGATTTGGG GCTGCTCTGG AAGCTCTATC TGCACACTG CTGTGCTGT GAACTCTAT
8101 TGGAGTAATA AATCTGAAC AGATATTTGG GATACATAGA CTGTGAGTGA GTGGAGTAGA
8161 GAAATTAATA ATTAACAGCA AACTATATTC AGGTGTGCTG AAGCTCTGCA AAACACAGC
8221 GAAAGAGATG AAAAAAGATT ATTAGAATTG GACAAGTGA ATATCTGTG GAACTGTGTT
8281 GACATATCAA ACTGGCTGTG GTATATAAAA ATATTTATTA TGAATAGTAG AGGCTGTGTA
8341 GGTTTAAGAA TAATTTTGGG TGTGCTCTCT ATAGTGAATA GAGTATAGCA GGGATCTCA
8401 CCTTTGTCT TTAGACCCCT TACCCAGAG CCGAGGGGAC TCGACAGGCT CCGAGGATCT
8461 GAAAGAGAG GTGGAGAGA AGACAGAGC AGATCATAC GATTGTGAG GAGGATTTCT
8521 TGCTTTGCT GGGAGCATCT CCGAGGCTCT TGCTCTTCA GCTACACCG CTGAGAGAC
8581 TTTATATTAA TTGAGGTGAG GGCAGTGAAA CTCTGGGAG ACAGCAGTCT CAGGGAGTA
8641 CAGAGGGGGT GGGAGATCTT TAAGTATGCT GGAAGTCTG TGCAGATTG GGTCTAGAG
8701 CTAAAAAGA GTGCTATTAG TCGCTTGTAT ACCATAGCAA TAGCAGTAG TGAAGGAA
8761 GATAGGATTA TAGAATTTGT ACAAAGATT TGTAGAGCTA TCTCAACT ACCTAGAGGA
8821 ATAGAGCAG GCTTTGAGC AGCTTTGCTA TAAAAAGGA GGCAGTGTG CAACACGAG
8881 CATAGTTGGA TGGCTCTGAG TAAGAGAGAG AATGAGAGGA ACTGAGCCAG CAGCAGAGG
8941 AGTAGAGCA GGTCTCAG ACTTAGTAG ACATGGGCA CTTACAGCA GCAACACAC

FIGURE 11

【図 1 1 - 4】

14/14

9001 TGCTACTAAT GAAGCTTGTG CTGGCTGCA AGCACAAGAG GAGGACGGAG ATGTGAGCTT
9061 TCCAGTCAGA CCTCAGTAC CTTAAGACC AATGACTTAT AAGAGTGTGA TAGTCTGCTT
9121 CTCTCTTTTA AAGAGAAAGG GGGAGCTGGA AGGGTTAATT TACTCTAGGA AAGAGGAGA
9181 AATCCTTGAT TTGTGGGCT ATACACACA AGGCTTCTTC CTGATTTGCT AACTACAC
9241 ATCGGGGCCA GGGGTCCAT TCCCATGAC CTTTGGATGG TGGTCTGCT TACACCTAT
9301 TGACCCAAAG GAGGTGAAG AGGCCAATGA AGGAGAGAGA AAGTGTGCT AAGTGTGCT
9361 GAGCCACAT AGGACAGAGG ATGAGATAG AGAAGTATTA AAGTGTGCT AAGTGTGCT
9421 TTAGCAGAC AGACACATG CCGCGAGCT ACATCCGAG TATTACAAAG ACTGTGACA
9481 CAGAGGGGAC TTTCCGCTG GAACTTTCCA CATCTGAGT GATCTGAGT AGGGAACCA
9541 GGGACTTGGG AGTGGTACC CTGACATGCT GATCTGAGT TGGCTATCT AGGGAACCA
9601 GGGTCTCTCT CGGTAGAGCA ATCTGAGCT GTGCTCTAG TGTGTGTGCT CCATCTGTTG
9661 CTGCTTAGG CTCAATAGAG CTTCCTTGA GTGCTCTAG TGTGTGTGCT CCATCTGTTG
9721 TGTGACTCTG GTACTAGAG ATCCCTCAGA CCCTTTGTG TGTGTGTGCT AATCTTAGC
9781 A

FIGURE 11

【図 1 2】

15/14

SEQ ID NO:34

CTTGAGGCAATGAGCCAAGCAACCAGCGCAAAACATCATGATGACAGAGAAGCAATTT
CAAAGGCGCCTAAAAGAAATTAATAATGTTTCAACTGTGGCAAGGAAGGGCACATAG
CTAGAAATTTGATAGGCGCCCTAGGAAAAAGGCTGTGTGAAATGTGGAAGGAAGGA
CACCAAATGAAAGACTGTACTGAGAGCGAGGCTTAA

FIGURE 12

【 図 1 3 】

Gen Int までの 975Pol wt: (SEQ ID NO:35)
TTTTTTAAGGAAATTTTGGCCTTCCCAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCCCTTCAGAA
CAGAACAGAGCCAAACAGCCCAACAGCAGAGAGCTTCAAGTTGAGGAGACAAACCC
CCGCTCCGAAGCAGGAGCCGAAAGACAGGGAACCTTAATTTCCCTCAAATCACTCT
TTGGCAGCGACCCCTTGTCTCAATAAAAGTAGGGGGTCAAATAAAGGAGGGCTCTTT
AGACACAGGAGCTGATGATACAGTATTAGAAGAAATGAGTTTGGCAGGAAATGGA
AACCAAAATGATAGGAGGAATTTGGAGGTTTATCAAGATTAAGACAGTATGATCAA
ATACCTTATAGAAATTTTGGAAAAAAGGCTATAGGTACAGTATTAATAGGAOCTACA
CCTGTCAACATAATTTGGAAGGAATATGTTGACTCAGCTTGGATGCACACTAAATTTT
CCAATTAGTCCCATTTGAAACTGTGCCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCCA
AAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGGAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCCA
TGAAAGAAATGGAGAAAGAGGAAATTAACAAAAATTTGGGCTGAAATATCCATATA
ACACTCCAGTATTTGCCATAAAAAAGAGGACAGTACTAAGTGGAGAAAGTTAGTA
GATTTACAGGGAACCTTAATAAAAGAACTCAAGACTTTTGGGAAGTTCAATTAGGAATA
CCACACCCAGCAGGGTTAAAAAAGAAAAATCAGTGACAGTACTGGATGTGGGGGA
TGCAATATTTTCAGTTCTTTAGATGAGGACTTCAGGAAATATACTGCATTCACCATA
CTAGTATAAACAATGAAACACCAAGGATTAGATATCAATATAATGTGCTTCCACAG
GGATGGAAGGATCAOCCATCAATATTCAGAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCC
CTTTAGAGCAAGAAATCCAGAAATAGTCATCTATCAATATATGGATGACTGTGATGT
AGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAACATAGAGCAAAAAATAGAGGAGTTAAGAAAAAC
ATCTGTTAAGGTGGGATTTACCAACCCGGACAAGAAACATCAGAAAGAACCCCA
TTTCTTTGGATGGGATGTAAGCTCCATCTGACAATGGACAGTACAGCTATAGAG
TTGCCAGAAAAGGAAAGCTGTGACTGTCAATGATATACAGAAAGTTAGGGAAAAAT
AAATTTGGCCAGTCAAGTATTACCCAGGAATTAAGTAGAAGGCACTTTGTAACTCTCT
TAGGGGGCCAAAGCACTAACAGATATAGTACCCTAACTGAAGAGCAGAAATAG
AATTGGCAGAGAACAGGGAATTTCTAAGAGAACAGTACATGGAGTATATTAGC
CCATCAAAAGACTTTGGTAGCTGAATACAGAAACAGGGGCATGACCAATGGACATA
TCAAATTTACCAAGAACCATTCAAAAACCTGAAACACAGGGAAGTATGCAAAAAATGA
GGACTGCCCACTAATGATGTAAACAGTTAACAGAGGCAGTGCAAAAAATAGCT
ATGGAAGCATAGTAATATGGGGAAGAGCTCCTAAATTTAGACTACCCATCCAAAA
AGAAACATGGGAGACATGGTGACAGACTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGT
GGGAGTTTGTATAATACCCCTCCTTAGTAAAAATATGTGTACAGCTAGAGAAAGAAC
CCATAATAGGAGCAGAAACCTTCTATGTAGATGGAAGCAGCTAATGGGAACTAAA
ATAGGAAAAGGAGGATGTTACTGTGACAGAGGAAGGCAAAATTTGTTCTCTAAC
AGAAACAACAATCAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
AGGATCAGAAATACATAGTAACAGAGCTCAGATGTGCAATTAGGAATCATTCAAG
CACAACAGATAAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAACCAATAATAGAAACATTAATA
AAAAAGGAAAAGGCTACCTGTCTAGGTTACAGCAGCATAAAGGAATTTGGAGGAAA
TGAACAATAGATAAATTAGTAAGTAAGGGAATCAGGAAAGTGCTGTTTCTAGATG
GAATAGAT

FIGURE 13

【 図 1 4 】

17/114

SEQ ID NO:36

GGCGGCATCGTGATCTACCAAGTACATGGACGACCTGTACGTGGGCAGCGCGG
GC

FIGURE 14

【 図 1 6 - 1 】

19/114

12_5/1ZA (SEQ ID NO:45)

TGGAAGGGTTAATTTACTCCAGGAAAAGGCAAGAGATCCTTGATTATGGGTCTATC
ACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAAACTACACCCGGGACCAAGGGTCAGA
TATCCACTGACCTTTGGATGGTGTCTCAAGCTAGTGCCAGTTGACCCAAGGGAAGTA
GAAGAGGGCCAAACGGAGGAGAGCAAACTGTTTGCTACACCTATGAGCCAGTATGG
AATGGATGATGAACACAAAAGAAAGTTTACAGTGGAAAGTTTGACAGCAGCCTAGCAC
GCAGACACCTGGCCCCGAGCTACATCCGATTATTACAAAGACTGTGACACAGA
AGGAGCTTTCCGCTGGGACTTTCCACTGGGGCGTTCCAGGGGGAGTGGTCTGGGCG
GGACTGGGAGTGGCCAGCCCTCAGATGCTGCTATATAAGCAGCGGCTTTTCGCTGTA
CTGGCTCTCTAGTGTAGACAGGATCCGAGGCTGCTGCTCTATCTGCTGCTGCTGCTG
ACCCACTGCTTAGGCCCTCAATTAAGCTTGGCTTGAGTGTCTAAGTAGTGTGTGCC
ATCTGTTGTGTGACTCTGGTAAGCTTGTTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTGTGGT
AGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTTGAAGCGGAAAGTGAG
ACCAAGAGAAGATCTCTCAGCGCAGGACTCCGCTTGCTGTAAGTGCATCTCGGCAAGG
CGCAGGGGGCGGACTGGTGTGAGTACGGCAAAAATTTTTTGACTAGCGGAGGCTAGA
AGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGCTCAATATTAAGAGGGGGAAAAATAGACAAAT
GGGAAAAAATAGGTTACGGCCAGGGGGGAGAAAAACATATATGCTAAAAACACTTA
GTATTGGGCAAGCAGAGAGCTTGAAGAGATTGTCAGTTAACCTTGGCCTTTTAGAGAC
ATCAGACGGGATGTAGAC AAATAATAAAACAGCTACAACCAAGCTCTTCAGA
CAGGAACAGAGGAAATAGATCATTATTAAACAGAGTACCAACTCTCTATTGTGTAC
ATAAAGGGATAGATGTACAGAGACCAACCAAGGCTTAGACAAGATAGAGGAGGA
ACAAAACAATATGTACGCAAAAAACACAGCAGCGGCAAGCGGCTGACAAAAAGGTC
AGTCAAAATATCTCTATAGTGAGAGAACTCCAAAGGGCAATAGAGGAGAAAGGCTTTA
ATCACCTAGAACCTTGAATGCAATGGGTAAAAATAGAGGAGAAAGGCTTTTAGCC
CAGAGGTAAATACCCATGTTTACAGCAATTACAGAAAGGCCACCCCAACAAGATTTA
AACACCATTTGTTAAATACAGTGGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAATGTTAAAG
ATACCATTTCACTGAGGAGGCTGCAAGAAATGGGATAGGTTACATCCAGTACATGCAAGG
CCTGTTGCACCCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACTA
CTAGTACCCCTTCAAGAACAAATAGCATGGATGACAAGTAACCCACCTATCCAGTA
GGGACCTGTGACATTTTAGACATAAAACAAGGACCAAGGAACCCCTTTAGAGACT
ATGTAGACCGGTTCTTCAAACTTTAAGAGCTGAACAACTCTACACAAGAGGTAA
AATTGGATGACAGACACCTTTAGTCCAAAAATGCGAAACCCAGATTTGAAGACCAT
TTAAGGAGCATTAGGACCAAGGGGCTTCATTAGAAGAAATGATGACAGCATGTACAGG
AGTGGAGGACCTAGCCCAAAAGCAAGAGTTTGGCTGAGGCAATGAGCCAAGCA
ACAAATCAAGGTGAATGATACAGAAAAAGCAATTTAAAGGCCCTAGAAGAGCTGTT
AAATGTTCACTTGGCAGGAGGAGGACATAGCCAGGAATTCAGGAGGCCCTAG
GAAAAGGGGCTGTTGGAAATGTGGAAGGAAGGACCAAAATGAAAGACTGTACT
GAGAGCGAGGCTAAATTTTATAGGAAAAATTTGGCCCTTCCCAAGGGGACCGG
GAAATTTCTCTCAGAGCAGCAGGACCAAGCCACGCCCCACCATAGAAACCAAGCC
CACCAGCAGAGGCTTCAAGTTCAAGGAGCTCCGAAGCAGGAGCGCAAGAGCAG
GGAACCTTTAACTTCCCTCAATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTGTCTCAATAAAA

FIGURE 16

【 図 1 5 】

18/114

SEQ ID NO: 37

GGIVITYQYMDLLYVGS

FIGURE 15

【 図 1 6 - 2 】

20/114

GTAGCGGGCCAAACAAAGGAGGCTCTTTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTACT
AGAAGAAATAAACTTGGCCAGGAAAATGGAAACCAAAAATGATAGGAGGAATTGGA
GGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAAATCACTTATAGAAATTTTGGAAAAAGG
GCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTTGGAAGAAATCTG
TTGACTCAGCTTGGATGCACACTAAATTTTCCAATTAGCCCATTTGAACTGTACCA
GTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGGCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGA
AGAAAAATAAAGCAATTAACAGAAATTTGTGAGGAAATGGAGAAGGAAGGAAAA
ATTACAAAAAATTTGGGCTGAAAAATCCATATAACACTCCAGTATTTGCCATAAAGAA
AAGGACAGTACAAAGTGGGAAAAATTAGTAGATTTACAGGGAACCTCAATAAAGAAC
TCAAGACTTTTGGGAAGTCCAATTAGGAATACCACACCCAGCAGGCTTAAAAAAGA
AAAAATCAGTGACAGTACTGGATGTGGGAGATGCATATTTTTCAGTCCCTTAGATG
AGAGCTTCAAGAAAATATACTGCATTCCACCACTAGTATAAACAATGAAACACCA
GGGATTAGATATCAATATAATGTTCTTCCACAGGGAATGGAAAGGATACCCAGCA
TATTCAGAGTAGCATGACAAGAATCTTAGAGCCCTTTAGAACACAAAAACCCAGAA
GTAGTTATCTATCAATATATGGATGACTTATATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGG
CAACATAGAGCAAAAAATAGAGGAGTTAAGAGGACACCTATTTCTTGGATGGGTATGA
CACCACAGACAAGAAACATCAGAAAGAACCCCATTTCTTGGATGGGGATGAACTTAC
TCCATCCTGACAAATGGACAGTACAGCCTATACAGCTGCCAGAAAGGAGAGCTGG
ACTGTCAATGATATACAGAAAGTTAGTGGGAAAGTTAAACTGGGCAAGTCAGATTTA
CCCGGGGATTAAAGTAAGGCAACTGTGTAACCTCCTTAGGGGAGCCAAAGCACTAA
CAGACATTTAGGCACTGACTGAAGAGGCAAGTAATGAAATGGCTGAGAACAGGGA
AATTTCAAAAGAACCAAGTACATGGAATATATTAGCCCATCAAAAGATTTAATAG
CTGAAATACAGAAACAGGGGAATGACCAATGGACATATCAAAATTTACCAAGAAC
ATTTAAAAATCTGAGAACAGGAAAGTATGCAAAAAATAGGAGCTGCCCACTAATG
ATGTGAAACAGTTAGCAGAGGCGAGTGCAAAAAGATAACCCAGGAAGCATAGTAATA
TTGGGAAAAAATCCTAAATTTAGACTACCCATCCCAAAAGAACATGGGAGACATG
GTGGTCAGACTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCC
TCCCCTAGTAAAAATTTGGTACCAGCTGGAAAAAGAACCCATAGTAGGGGCGAGAA
CTTTCTATGTAGATGGAGCAGCCAAATAGGGAACCTAAATAGGAAAGCAGGGGTAT
GTCACTGACAAAAGGAAGGCGAGAAAGTTGTTTCTTCACTGAAACAACAAATCAGAA
GACTGAATTAACAAGCAATTCAGTACTGTTGCAAGGATTCAGGGGCCAGAAAGTAACA
TAGTAACAGACTCAGAGTATGCAATTAGGAATCATTCAAGCACAACCAAGATAAGAGT
GAATCAGAAATAGTCAGTCAAAATAAGAACAGTTGATAAAAAAGGAAAAAGTCTA
CCTATCATGGGTACCAGCAGATAAAGGAATTTGGAGGAAATGAAACAGTACAGCAAT
TAGTAAGTAGTGGAAATCAGAAAAAGTACTGTTCTAGATGGAATAGATAAGGCTCAA
GAAGAGCATGAAAAATATCAGACCAATTTGGAGAGCAATGGCTAGTGAGTTTAACTC
GCCACCCATAGTAGCAAGGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAAGCTAAAAAG
GGGAAGCCATGCAATGGACAAGTGCAGTGTATGCCAGGAATATGCAATTAGAGCTGT
ACACATTTAGAAGGAAAAATCCTCCTAGTAGGAATACATATAGGAGTATGGCAGTAATTC
GGAAGCAGAGGTTATCCCAAGCAAGAACAGGACAGAAACAGCAGTACTTTATACTAA
AATTAGCAGGAAGATGGCCAGTCAAGTAATACATATAGGAGTATGGCAGTAATTTCC
ACCACTACCCAGTAAAGGAGGCTGTTGGTGGGAGATATCCACAGGGAATTTGG
AATTCCTACAAATCCCAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCCATGAATAAAGAAATTA

FIGURE 16

【図 16 - 3】

21/114

AGAAAAATCATAGGGCAAGTAAGAGATCAAGCTGAGCACCTTAAGACAGCAGTACAA
ATGGCAGTATTCATTACAATTTTAAAAAGAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGC
AGGGGAGAGAAATAATAGACATAATAGCATCAGACATACAACTAAAGAATTACAAA
AACAAATTATAAAATTTCAAATTTTCGGGTTTATTACAGAGACAGCAGAGACCTTA
TTTGGAAAGGACCAGCCAACTACTCTGGAAAGGTGAAGGGCAGTAGTAATACAA
GATAATAGTGATATAAAGGTAGTACCAAGAAGGAAAGCAAAATCATTAAAGGACTA
TGGAAACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAGGTAGACAGGATGAAGATTAGA
ACATGGCAGAGTTTGTAAAGCACCATATGTATGTTTCGAGGAGAGCTGATGGATGG
TTCTACAGACATCATTATGAAAGCAGACACCCAAAAGTAAAGTTACAGAACTACAT
CCCATTAGGAGATGGCAGGTAGTAATAAAACATATTGGGGTCTGCAGACAGGAG
AAAGAGCTTGGCATTGGGTACGGAGTCTCCATAGAAATGGAGATTGAGAAAGATAT
AGCACACAAGTAGACCTGACCTGACAGACCAACTAATTCATATGCATTATTTTGTAT
TGTTTTGCAAGATCTGCCATAAGGAAAGCCATACTAGGACAGATAGTTAGCCCTAA
GTGTGACTATCAAGCAGGACATAAAGGAGTAGGATCTCTACAATACTTGGCACTGA
CAGCATTGATAAAACCAAAAGATAAAGCCACCTCTGCTAGTTAGGAAATTA
GTAGAGGATAGATGGAACAAGCCCAAGAACAGCAGGGGCCGAGAGGGAACCAT
CAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAAGAACTCAAGCAGGAAGCTGTGACAGACT
TTCTAGACCATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATGAAACCTATGGAGATA
CTTGGACAGGAGTTGAAGCAATAAAGAAATCCTGCAACAATTACTGTTTATTCATT
TCAGGATTGGGTGCCATCATAGCAGAATAGGCATTTTGGCAGACAGAAAGAGCAAGA
AATGGAGCCAAATAGATCTCAACCTAGAACCTGGAAACCATCCAGGAAGTCAGCCTA
AACTGCTTGAATGGGTGTTACTGTAAACGTTGCAAGCTATCATTGTCTAGTTTGCT
TCAGAAAAAAGGCTTAGGCATTTACTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAA
GCGCTCTCCAAGCAATAAGATCATCAAGATCTCTACCAAAAGCAGTAAGTACCG
AATAGTATATGTAATGTTAGATTAAAGTGAAGAAATAGATTCTAGATTAGGAATTAG
AGCATTGATAGTAGCACTAATCATAGCAATAATAGTGTGGACCATAGTATATATAG
AATATAGGAAATTGGTAAGGCAAGGAAATAGAGCGAGGGGATACCTGAAGAAATATCGA
GAAAGAGCAGAAAGACAGTGGCAATTGAGAGCGAGGGGATACCTGAAGAAATATCGA
CACTGGTGGATATGGGGCATCTTAGGCTTTTGGATGCTAATGATGTGTAATGTGAA
GGGCTTTGGGTACAGTCTACTACGGGGTACCTGTGGGGAGAGAAAGCAAAACCT
ACTCTATTTGTGTCATGATGCTAAAGCATATAGAAAGAAAGTGCATAATGTCTG
GGCTACACATGCCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAAGAAAGTGTATTTGGGC
AATGTAAACAGAAAAATTTAATCATGTGGAAAAATGACATGGTGGATCAGATGCAAG
AAGATATAATCAGTTTAGGATCAAGGCTTAAAGCCATGTGTAATAATTGACCCCA
CTCTGTGTCACCTTTAACTGTGTAATAAGCACTGTTAACTACAATAATACCTCTAAA
GACATGAAAAAATTGCTCTTTTATAGACTTGATATAGTACCACTTAATAATAGGAAGATGG
GAATATTAAACACTATAGATTAAATAATTGTAATACCTCAGCCATAACACAAGCCTG
TCCAAAAGTCTCGTTTGGACCAATTCCTATACATTATTGTGCTCCAGCTGGTTATGCG
CCTCTAAAATGTAATAATAAGAAATTCATGGAATAGGACCATGCGATAATGTGAG
CACAGTACAATGTACACATGGAATTAAGCCAGTGGTATCAACTCAATTACTGTTAAA
TGGTAGCCTAGCAGAAAGAGATAATAATTAGATCTGAAAAATCTGACAAACAATG
TCAAAACAATAATAGTACATCTTAATGAATCTATAGAGATTAAATGTACAAAGACC

FIGURE 16

【図 16 - 5】

23/114

CTCTCTGGCTATCTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTG
CCTTGAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAGTACAGAGATCCCTCAGA
CCACTTGTGGTAGTGTGGAAAAATCTCTAGCA

FIGURE 16

【図 17】

24/114

>C4_Env_TV1_C_ZA_opt_short (SEQ ID NO:46)

CATCACCTGCACTGCAAGATCAAGCAGATCTGTGCGCATGTGGCAGGGCGTGGCCAGGCCATGTACGCCCCCCCATCG
CCGGCACATCACTGTC

FIGURE 17

【図 16 - 4】

22/114

TGGCAATAATACAAGAAAGAGTGTGAGAATAGGACCAGGACAAGCATTCTATGCA
ACAGGAGACATAATAGGAGATATAAGACAAGCACAATTGTAACATTAGTAAAAATGA
ATGGAATACAACCTTTACAAAGGGTAAGTCAAAAAATTACAAGAACTCTTCCCTAATA
GTACAGGGATAAAAATTGACACACTCAGGAGGGGACCTAGAAATTTACTACACAT
AGCTTTAATTGTGGAGGAGAATTTTCTATTGCAATACAAACAGACCTGTTAATAGT
ACATACAGTAAATGGTACATGCACTAATGGTACATGCACTGTCTAATAATACAGAGCG
CATCACACTCCAATGCAGAAATAAAACAAATTATAAACATGTGGCAGGAGGTAGGAC
GAGCAATGTATGCCCTTCCCTTTGAGGAAACATAACATGTAGATCAAAATATTACA
GGACTACTATTAACACGTGTAGGAGGAGATAATAATCTGAAACAGAGACATTACAG
ACCTGGAGGAGGAGACATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAATACAAAG
GTGGTAGAAATTAACCATTAGGAGTAGCACCCACTGCTGCAAAAAGGAGAGTGGT
GGAGAGAGAAAAAAGAGCAGTAGGAATAGGAGCTGTGTTCTTGGGTTCTTGGGAG
CAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCATCAATAACCGTACCGGTACAGGCCAGACAA
TTATTGTCTGGTATAGTGCAACAGCAAGTAATTGCTGAGGGCTATAGAGGCGCAA
CAGCATATGTTGCAACTCAGCGTCTGGGGCATTAAAGCAGCTCCAGGCAAGAGTCTCTG
GCTATAGAGAGATACCTACAGGATCAACAGCTCTAGGACTAGTGGGGCTGCTGG
AAAACTCATCTGCAACCACTAATGTGCTTTGGAACCTCTAGTTGGAGTAATAAACTCA
AAGTGATATTTGGGATAACATGACCTGGATGGAGTGGGAATTTAGTAATT
ACACAAACACAATATACAGGTTGCTTGAAGACTCGCAAGCCAGGAGAAAGAAA
TGAAAAAGATTACTAGCATTGGACAGGTGGAAACAATCTGTGGAATTGTTTAGCAT
AACAATTTGGCTGTGGTATATAAAAAATTTCAATATGATAGTAGGAGGCTTGATAG
GTTTAAAGAATAATTTTGTCTGTCTCTCTAGTAAATAGAGTTAGGAGGGATACT
CACCTTGTGCAATTGCAAGCCTTATCCCAAAACCGAGGGGACCCGACAGGCTCGGA
GGAAATCGAAGAAAGAGTGGAGAGCAAGACAGCAGCAGATCCATTGATTAGTGA
CGGGATTCTTGACACTTGGCTGGGACGACTACGAAGCCTGTGCTCTCTCTGCTACC
ACCGATTGAGAGACTTCATATTAATTGTAGTGGAGAGCAGTGGAACTTCTGGGACAC
GACTGTCTCAGGGGACTGCAAGGGGGTGGGGAACCCCTAAGTATTTGGGGCTGCT
TGTGCAATATTGGGGTCTAGAGTTAAAAAAGAGTGCTATTAATCTGCTTGATACTAT
AGCAATAGCAGTAGCTGAAGGAACAGATAGGATTTAGAAATTCATACAAAACCTTT
GTAGAGGTATCCGCAACGTAACCTAGAAAGATAAAGACAGGCTTCGAAGCAGCTTTG
CAATAAAAAATGGGGGCAAGTGGTCAAAAAGCAGTATTAATTGGATGGCCTGAAAGTAA
GAGAAAAAATCAGACGAACTAGGTCAGCAGCAGAGGGAGTAGGATCAGCGTCTCA
AGACTTAGAGAAACATGGGGCACTTACAACCAGCAACACAGCCCAACAATAATGCTG
CTTGCGCTGGCTGGAAGCGCAAGAGGAGGAAGGAGAAGTAGGCTTTCCAGTCAGA
CCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTATAAAGCAGCAATAGATCTCAGCTCTTT
TTAAAGAAAAAGGGGGGACTGGAAGGGTTAATTTACTCCAAGAAAAAGGCAAGAGAT
CCTTGATTGTGGGTATTATAACACACAAGGCTTCTTCCCTGATTGGCAAAATACAC
ACCGGGACCAAGGGTTCAGATTCCACTGACCTTTGGATGGTACTTCAAGCTAGAGCC
AGTTCGATCCAAGGGAAGTAGAAGAGGGCCAATGAAGGAGAAAAACAAGTGTACTAC
ACCCTATGAGCCAGCATGGAATGGAGGATGAAGACAGAGAAGTATTAAGATGGAAG
TTTGACAGTACGCTAGCACGACGACACATGGCCCGGAGCTACATCCGGAGTATTAC
AAAGACTGCTGACACAGAAGGGACTTCCGCTGGGACTTCCACTGGGGCGTCCAG
GAGGTGTGGTCTGGGCGGACAGGGGAGTGGTCAACCTGAGATGCTGCATATAAG
CAGCTGCTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTAGGTAGACCATGCTGAGCCCGGGAG

FIGURE 16

【図 18】

25/114

>C4_Env_TV1_C_ZA_opt (SEQ ID NO:47)

CTGCCATCACCTGCACTGCAAGATCAAGCAGATCGTGGCAGTGTGGCAGGGCGTGGCCAGGCCATGTACGCCCCCC
CATGCGCGCACATCACTGCGCGCAGCACTACCGGCACTCTGCTGACCGCGACGCGCGC

FIGURE 18

FIGURE 19

FIGURE 20

FIGURE 21

FIGURE 22

【图 2 5】

32/114

>Gag_TV1_ZA_MHRwt (SEQ ID NO:54)

GACATAAAACAAGGGCCAAAAGAACCCTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTCTTTAAAACC

【图 2 6】

>Nef_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:55)

FIGURE 26

【图 27】

34/114

>Nef_TV1_C_ZAwT (SEQ ID NO:56)

ATGGGAGGCAAGTGGTCAAAACGCAGCATA

FIGURE 27

【図 3 1】

38/114

>p31Int TV1 C Zaopt (SEQ ID NO:60)

[illegible]

FIGURE 31

【図 3 2】

39/114

>p31Int TV1 C ZAwT (SEQ ID NO:61)

[illegible]

FIGURE 32

THE CASE

FIGURE 33

FIGURE 34

FIGURE 35

FIGURE 38

FIGURE 36

FIGURE 39

FIGURE 37

[illegible]

【図 4 0】

47/114

>ProtinaRTmut_TV1_C_ZAwt (SEQ ID NO:69)

CCTCAAACTCACTCTTTGGCAGCGACCCCTTGTCCTCAATAAAAGTAGAGGGCCAGATAAAGGAGGCTCTCTTAGCCACAGG
AGCAGATGATACAGATATTAGAGAGAAATAGATTTGCCAGGGAAATGGAAACCAAAATGATAGGGGGAATTGGAGGTTTAA
TCAAGGTAGACAGATATGATCAAACTACTTAGAGAAATTTGGTGGAAAAAAGGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGGCCCTACA
CCAGTCAACATATATGGAGAAATCTGTAACTCAGCTTGGATGGAGTCAAACTATGACAGAGAGAAAAATTAAGAGCATTA
ACCAAGTAAATTTAAACCGAGAAATGGATGGCCCAAGGTCAAACAAATGGCCATTGACAGAGAGAAAAATTAAGAGCATTA
CAGCAATTTTGGAGGAAJTGGAAGAGGAGGAAAAATTAACAAAAATTTGGGCGCTGATAATCCATATAACCTCCAGTATTT
GCCATAAAAAAGAGGACAGTCTAAGTGGAGAAAAATTTAGTAGATTTTCAGGGAACCTAATAAAGAACTCAAGAGCTTTTG
GGAGTTCAATTAGGAATACCAACCCAGAGGATTAATAAGAAAAATTCAGTGACAGTGTAGATGTGGGGAGTGCA
ATTTTTTCAGTTCCTTTAGATGAAAGCTTCAGGAAATATATCTGCATTCCACATACCTAGTATAAAACATGAACACCGAGG
ATTAGATATCAATATAATGTGCTGCCACAGGAGTGGAAAGGATCACAGCAATATTCAGAGTAGCATGAACAAATCTT
AGAGCCCTTCAGAGCAAAAAATCCAGACATAGTTATCTATCAAGCCCGTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGC
AACATAGAGCAAAAAATAGAGAGTTAAGGGAACTTTATTGAAATGGGGATTTCACACCCAGACAGAAACATCAAAAA
GAACCCCATTTCTCCCATGAACTCCATCTTGACAAATGGACAGTACAACTATACCTGTGCCAGAAAAAGGATAGTTG
GACTGTCAATGATATACAGAGTTGTGGGAAAAATTAACCTGGGCAAGTCAGATTTACCCAGGATTAAGGTAAAGGCAAC
TCTGTAACTCTCCAGGGGGCGCAAAACACTAACAGACATAGTACCACTAACTGAAGAGAGCAATTAAGATTTGGCAGAG
AACAGGGAATTTTAAAGAGAACAGTACATGGAGTATATTATGATCCATCAAAAGACTTGAAGCTGAAGATACAGAACT
GGGGCATGAACATAGACATATAAATTTATCAAGAACCAATTTAAATAATCTGAAGAACAGGGAAGTATCAAAAAATGAAGA
CTACTAAATTTAGACATACCACTCCAAAGAGAAACATGGGAGACATGGTGGACAGACTATTGGCAAGCCACTGGATCCC
TAGTGGGAGTTTGTTAATACCTCCCTGATAAATTAATGGTACCAACTAGAAAAAGATCCCATAGCAGGAGTAGAAA
CTTTCTATGTAGATGGAGCAACTAATAGGGAGCTAAATAAGAAAAAGCAGGATATGTTACTGACAGAGGAAGGCAGAAA
ATTGTTACTCTAACTAACACAAATACAGAGACTGAGTTTCAAGCAATTCAGTACTGTGCAAGGATTCAGGATCAGA
AGTAAACATAGTACAGACTCAGAGTATGCAATTAGGAATCAITTCAGGACAAACAGATAGAGGTGACTCAGAGATATTTA
ACCAAAATATAGACAGTTATATAACAGAGAAAGAACTTACCTGTCTATGGGTACACGACATAAAGAAATTTGGGGGAAAT
GAACAGTAGATAAATTAGTAAGTAAGGGAATTAGGAAATGTGTTG

FIGURE 40

【図 4 1】

48/114

>ProtwtRTwt_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:70)

CCCCAGATCACCCCTGTGGCAGCGCCCCCTGGTGAGCATCAAGGTGGAGGGCCAGATCAAGGAGGCCCTGCTGGACACCGG
CGCCGACGACACCCGTGCTGGAGGAGATCGAGCTGCCCGGCAAGTGGAAAGCCAAAGATGATCGCGGCATCGGCGGCTTCA
TCAAGTGGCGCAGTACGACACAGATCTCTGATCGAGATCTGCGGCAAGAGGCCATCGGCACCGTGTCTGGTGGGCCCCACC
CCCGTGAACATCATCGGCCGCAACCTGCTGACCCAGCTGGGCTGCACCCCTGAACCTCCCATCAGCCCCATCGAGACCGT
GCCCTGGAAGCTGAAAGCCCGCATGACGCGCCCCAAGGTGAAGCAGTGGCCCCCTGAACCGAGGAGAGATCAAGGCCCTTGA
CCSCATCTCCGAGAGATGGAGAGAGGGCGAAGTCAACAGATGGCCCCGACACCCCTACACACCCCCGTGTTC
GCCATCAAGAAAGAGGACAGCACCAAGTGGCGCAAGCTGGTGGACTTCGCGAGCTGAACAGCGCACCCAGGACTTCTG
GGAGTGCAGCTGGGCATCCCCCACCCCGCGCTGAAGAGAGAGAGAGCGTGAACCTGTGACCTGTGACGCTGGCGAGCGCT
ATCTTCAGGTGGCCCTGGAACGAGAGCTTCGCGAAGTACACCGCTTACCACATCCCCAGCATCAACACGAGACCCCGGC
ATCCGCTACAGTACAAAGTGTGCTGCCCGAGGCTGGAAGGCGAGCCCCGCCATCTTCAGAGAGCATGAACCAAGATCCT
GGAGCCCTTCCGCGCAAGAACCCCGACATCTGTATCTACCAATACATGGACAGCTGTACGTGGGAGCGACCTGGAGA
TCGGCCAGACACCGCGCAAGATCGAGGAGCTGCGGAGACACTGTGTAAGTGGGCTTCACCAACCCCGACAGAGAGAC
CAGAGAGAGCCCCCTTCTCTGTGGATGGGTACGAGCTGCACCCCGACAGTGGACCGTGCAGCCCATCTCTGTGCCGA
GAGGACAGCTGGACCGTGAACGACATCAGAGCTGTGGGCAAGCTGAACCTGGGCCAGCAGATATACCCCGGCATCA
AGGTGGCGCAGCTGTGCAAGCTGTGCGCGGCCCAAGGCCCTGACGACATGTGCCCCCTGACCTGAGAGGCGGAGCTG
GAGCTGGCGCGAACCAGAGATCTTGGCGAGCCCTGACAGGCTGTATACAGCCCCGAGAGACTGATGCCGA
GATCCAGAACGAGGCGACGAGCATGTGACCTACAGATTTACAGGAGCCCTTCAAGAACCTGAAGACCGGCAAGTACG
CCAGATGGCGCACACCCACACCAACGAGCTGAAGCAGCTGACCGAGCCCTGCGCAAGATTCGCCATGAGAGCATCTGT
ATCTGGGGCAAGCCCCCAAGTTCCGCTGCCATCCAGAGGAGAGCTGGGAGACTGTGTGACGACATCTGTGCGCATG
CACTGGATCCCCGAGTGGGAGTTGTGGAACCCCCCTGTTGAAGTGTGTGTACAGCTGGAGAGGACCCCATGG
CGCGCTGGAGACCTTCTACGTGGACGCGCCACCAACCGCAGGCGCAAGATCGGCAGGCGGCTCATGTGACCGACCGC
GGCGCCAGAGAGTCTGTGACCTGACCAACACCAACAGAGAGACCGAGCTGCGAGGCTGACCTGCGGCTGACGAG
CAGCGGAGAGAGTGAACATCTGTGACCGACAGCAGTACGCCCTGGGGCATCTCCAGGCGCAGCCGACAGAGAGGAC
GCGAGATCTTCAACAGCATCATCGAGCAGCTGATCAACAGAGAGCGCATCTACCTAGCTGGGTGCCGCCCAACAGGGC
ATCGGGCGCAACGAGCAGCTGGACAGCTGGTGAACAGGCGATCCGCAAGGTGTCTG

FIGURE 41

【図 4 2】

49/114

>ProtwtRTwt_TV1_C_ZAwt (SEQ ID NO:71)

CCTCAAACTCACTCTTTGGCAGCGACCCCTTGTCCTCAATAAAAGTAGAGGGCCAGATAAAGGAGGCTCTCTTAGACACAGG
AGCAGATGATACAGATATTAGAGAGAAATAGATTTGCCAGGGAAATGGAAACCAAAATGATAGGGGGAATTGGAGGTTTAA
TCAAGGTAGACAGATATGATCAAACTACTTAGAGAAATTTGGTGGAAAAAAGGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGGCCCTACA
CCAGTCAACATATATGGAGAAATCTGTAACTCAGCTTGGATGACACTAAATTTCCAAATTAGTCTATTGAAACTGT
ACCAAGTAAATTTAAACCGAGAAATGGATGGCCCAAGGTCAAACAAATGGCCATTGACAGAGAAAAAATAAAGCATTA
ACCAATTTTGGAGGAAATGGAGAGGAAGGAAAAATTAACAAAAATTTGGGCGCTGATAATCCATATAACCTCCAGTATTT
GCCATAAAAAAGAGGACAGTACTAAGTGGAGAAAAATTAGTAGATTTTCAGGGAACCTCAATAAAAAGACTCAAGACTTTTG
GGAGTTCAATTAGGAATACCAACCCAGAGGATTAATAAGAAAAATTCAGTGACAGTGTAGATGTGGGGAGTGCA
ATTTTTTCAGTTCCTTTAGATGAAAGCTTCAGGAAATATATCTGCATTCCACATACCTAGTATAAAACATGAACACCGAGG
ATTAGATATCAATATAATGTGCTGCCACAGGAGTGGAAAGGATCACAGCAATATTCAGAGTATGATGAACAAATCTT
AGAGCCCTTCAGAGCAAAAAATCCAGACATAGTTATCTCAATATATGGTAGTCTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAA
TAGGGCAACATAGACAAAAATAGAGAGTTAAGGGAACATTTATTGAAATGGGGATTTCACACCCAGACAGAGAACAT
CAAAAAAGAACCCCATTTCTTTGGATGGGGTATGAATCCTCTGACAAATGGACAGTACCACTATACCTGCTGCCAGA
AAAGAGTAGTTGAGCTGTCAATGATATACAGAAAGTTAGTGGGAAATTAACCTGGGCAAGTCAGATTTACCCAGGGATTA
AAGTAAGGCAACTCTGTAACTCTCAGGGGGGCAAGCACTAACAGACATAGTACCACTAAGTGAAGAGCAGAAATTA
GAATTTGGCAGAGAACAGGGAATTTTAAAGAGAACAGTACATGGAGTATATTATGATCCATCAAAAGACTTGTAGTCTGA
AATACAGAAACAGGGCGATGAACATGGACATATCAAAATTTATCAAGAACCATTTAAAAATCTGAAAAACAGGGAAGTATG
CAAAATGGAGCTACCCACATTAATGATTTAAACACAGTTAACAGAGGCGAGTGCAAAAATAGCATGGAAGACATAGTAT
ATATGGGGAAGAGCTCTAAATTTAGACTACCCATCCAAAAAGAAACATGGAGGACATGGTGGACAGACTATTGGCAAGC
CACTCGATCCCTCGATGGGAGTTTGTAAATACCCCTCCCTAGTAAATTTAGTACCAACTAGAAAAAGATCCCATAG
CAGGAGTAGAAACTTTCTATGTAGATGGAGCACTAATAGGAGAGCTAAAATAGGAAAAAGCAGGGATATGTTACTGACAGA
GGAAGCGAGAAATTTGTTACTGTAACTAACACAACTACAGAGACTGAAGTTACAGCAATTCAGCTAGCTCTGCGAGA
TTCAAGGATCAGAAATAAACATAGTAACAGACTCAGAGTATGCAATTAGGAATCATTCAGCACAACAGATAGAGTGACT
CAGAGATATTTAAACCAATATATAGAACAGTTAATTAACAGGAAGAATCTACCTGTCTATGGTACCAGCACATAAAGGA
ATTGGGGGAATGAACAGTAGATAAATTAGTAAGTAAGGGAATTAGGAAATGTGTTG

FIGURE 42

【図 4 3】

50/114

>RevExon1_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:72)

ATGGCCGGCCGCGAGCGGCGACAGCAGAGGCCCTGCTGCAGGTGGTGAAGATCATCAAGATCTGTGACAGAGC

FIGURE 43

【図 4 4】

51/114

>RevExon1_TV1_C_ZAwt (SEQ ID NO:73)

ATGGCAGGAAGAGAGCGAGACAGCGACAGAGCGCTCCTCCAAGTGGTGAAGATCATCAAAATCTCTATCAAGCA

FIGURE 44

【図 4 5】

52/114

>RevExon2_TV1_C_ZAopt-2 (SEQ ID NO:74)

CCCTACCCCAAGCCGAGGGGACCCGCGAGCCCGCGCACACCGCGCGCGCTGGCGCGCCCGCAGCGCCAGATCCA
CACATCGGCGAGCGCATCTGTGGCTGCTGCTGGGCGCGAGCGCGGAGGCCGTGTCCCTCAGCTGTGCCCTTGGAGC
GCTTGCATCAACTCGAGCGAGGGCAGCGGCACAGCGGACCCAGCAGAGCGAGGGCACCACGAGGGCGTGGCGAG
CCCTAA

FIGURE 45

【図 4 6】

53/114

>RevExon2_TV1_C_ZAwt (SEQ ID NO:75)

ACCTTTACCCCAAGCCGAGGGGACTGACAGGCTCGGAGGAATCGAAGAGAGGTGGAGAGCAAGACAGAGACAGATC
CATACGATTTGTGAGCGGATTTCTGTGCTGCTGCTGGGCGCGAGCGCATCTGCGGAGCCCTGTGCTCTTCACTACCA
GAGACTTCATATTAATTGACAGTGAAGGCGAGTGAACCTTCTGGGACACAGCAGTCTCAAGGAGACTACAGAGGGGTGGAG
ATCCTTAA

FIGURE 46

【図 4 7】

54/114

RT_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:76)

CCCATCAGCCCCATCGAGACCGGTGCCCGTGAAGCTGAAGCCCGCATGGACGGCCCCA
AGGTGAAGCAGTGGCCCCCTGACCGGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGACCGCCATCTGGC
AGGAGATGGAGAAAGGAGGGCAAGATCACCAAGATCGGCCCGGACAAACCCCTACAACA
CCCCCGTGTTCGCCATCAAGAAAGAGGACAGCACCAAGTGGCGCAAGCTGGTGGACTT
CCGCGAGCTGAACAAAGCCGACCCAGGACTTCTGGGAGGTGCAGCTGGGCAATCCCCAC
CCCGCCGCGCTGAAGAAAGAAAGAGCGTGAACCGTGTGGACGTGGCGCAGCGCTAC
TTCAGCGTGGCCCTGGACGAGAGCTTCCGCAAGTACACCGCCTTACCATCCCCAGCA
TCAACAACGAGACCCCCGGCATCCGCTACCAAGTACAACGTGCTGCCACAGGCTGGAA
GGGACGCCCGCCATCTTCCAGAGCAGCATGACCAAGATCCTGGAGCCCTTCCGCGCC
AAGAACCCCGACATCGTGATCTACCAAGTACATGGACGACCTGTACGTGGGCGAGCGACC
TGGAGATCGGCCAGCACCGGCCAAGATCGAGGAGCTGCGCGAGCACCTGTCTGAAGT
GGGCGTTCACCAACCCCGACAAGAACGACAGAGGAGGCCCGCTTCTCTGTGGATGGG
CTACGAGCTGCACCCGACAAGTGGACCGGTGACGCCCATCTGCTGCCCGAGAAGGAC
AGCTGAGCCGTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGGCAAGCTGAACCTGGGCGAGCCAG
ATCTACCCCGCATCAAGGTGCGCCAGCTGTGCAAGCTGCTGCGCGCGGCCAAGGCCCG
TGACCGACATCGTGGCCCTGACCGAGGAGGCCGAGCTGGAGCTGCGCCGAGAACCGCG
AGATCTGCGCGAGCCCGTGCACGGCGTGTACTACGACCCCAAGCAAGGACCTGATCGC
CGAGATCCAGAAGCAGGGCCACGAGCAGTGGACCTACCAAGATCTACCAAGGAGCCCTT
CAAGAACCTGAAGACCGGCCAAGTACGCAAGATGCGCACCCACCCACCAACGACGT
GAAGCAGCTGAACCGAGCCGTGCAGAAGATCGCCATGGAGAGCATCGTGATCTGGGG
CAAGACCCCAAGTTCGCCCTGCCATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACCTGGTGAGCC
GACTACTGGCAGGCCACCTGGATCCCGCAGTGGGAGTTCTGTAACACCCCGCCCTGG
TGAAGCTGTGTACCAAGTGGAGAGGACCCCATCGCCGCGCTGGAGACCTTCTACGT
GGACGGCGCCACCAACCGCAGGGCCAAGATCGGCAAGGCCGGCTACGTGACCGAGCCG
CGGCCGCCAGAAGATCGTGACCTGACCAACACCCACCAAGCAAGACCGAGCTGCA
GGCCATCCAGCTGGCCCTGACGAGCAGCGGCGAGCGAGGTGAACATCGTGACCGCAGC
CCAGTACGCCCTGGGCATCATCCAGGCCAGCCCGACAAGAGCGACGCGAGATCTTTC
AACAGATCATCGAGCAGCTGATCAACAAGGAGCGCATCTACCTGAGCTGGGTGCCCG
CCCAACAGGCATCGCGCGCAACGAGCAGGTGGACAAAGCTGGTGAGCAAGGGCATCG
GCAAGTGCTG

FIGURE 47

【図 4 8】

55/114

>RT_TV1_C_ZAwT (SEQ ID NO:77)

CCAAATTAGTCCTATTGAAACTGTACCAGTAAATTAJAAACAGGAATGGATGGCCCCAAGGTCAACAAATGGCCATTGAC
AGRAAGAAAAATAAAGCATTAACAGCAATTTGTGAGGAATGGAGAAGGAAGAAAAATTAACAAAAATTTGGCGCTGATA
ATCCATATAACACTCCAGTATTTGCCATAAAAAAGAGGACAGTACTAAGTGGAGAAAAATTAGTAGATTTTCAGGGAATC
AATAAAGAACTCAAGACTTTTGGGAAGTTCATTTAGGAATACCAACCCAGCAGGATTAJAAAAAGAAAAATTCAGTGAC
AGTGCTAGATGTGGGGATGCATATTTTCAGTTCCTTTAGATGAAAGCTTCAGGAAATATATCTGCATTCCACATACCTA
GTATATAACATGAACACCCAGGGATTAGATATCAATATATATGTGCTCCACAGGGATGGAAAGATCAACGCAATATTC
CAGAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCCTTCAGAGCAAAAAATTCAGGACATAGTTATCTATCAATATATGATGACTT
GTATTTAGAGATCTGACTTAGAAATAGGGCAACATAGAGCAAAAAATAGAAAGATTAAAGGAACATTTATTGAAATGGGGAT
TTACAAACAGCAGACAGAAACATCAAAAAAGAACCCCATTTCTTTGGATGGGGTATGAACTCCATCCTGCAAAATGGAC
GTACAACTTATCTCGTCCAGAAAAGGATAGTGGACTGTCAATGATATACAGAAATTAGTGGGAAAAATTAACATGGGC
AAGTCAGATTTAACCAGGGATTTAAGTAAGGCACTCTGTAACTCCTCAGGGGGCCCAAGACATAACAGACATAGTATC
CACTAACTAGAAAGCAGAAATTAGAATTTGGCAGAGAACAGGGAATTTTAGAGAACCAAGTACATGGATATATATGATG
CCATCAAAAGACTGTAGTACTGAAATACAGAAACAGGGGCAAGAAACATGACATATCAATTTATCAAGAACCATTTAA
AAATCTGAAAAACAGGGAATATGCAAAATGAGGACTACCCACATAATGATGTAAACAGTTAAACAGAGCGAGTGCAAAA
AAATAGCCATGGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAGAGCTACCCATCCAAAAAGAAACATGGAGACA
TGGTGGACAGACTATTGGCAGGCCCTGGATCCCTGAGTGGGAGTTTGTATTAACCCCTCCCTAGTAAATATAGGTA
CCACTAGAAAAAGATCCCATAGCAGAGTAGAACTTTCTATGTAGATGGGACCACTAATAGGGAGCTTAATAGGAA
AAGCAGAGTATGTACTGACAGAGGAGCAGAAATTTGTACTCTACTACACACAAATCAGAAAGTGAAGTGAATCAAA
GCAATTCAGCTGACTCTCAGGATTCAGGATCAGAGTAAACATAGTAACAGACTACAGATATGATAGGAATCATTCAG
AGCACACCAAGATAGAGTGACTCAGAGATATTTAACCAATATAGTAACAGTTAATAACAGGAAGAAATCTACCTGT
CATGGGTACACGACATAAAGGAATTTGGGGAAATGAACAAGTAGATAAATTAGTAAGTAAGGAATTAGGAAGGTGTG

FIGURE 48

【図 4 9】

56/114

>RTmut_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:78)

CCCATCAGCCCCATCGAGACCGGTGCCCGTGAAGCTGAAGCCCGCATGGACGGCCCCAAGGTGAAGCAGTGGCCCCGTGAC
CGAGGAGAGATCAAGGCCCTGACCGCCATCTGCGAGGAGATGGAGAGGAGGCAAGATCACCAAGATCGGCCCGGACA
ACCCCTACAACACCCCGTGTTCGCCATCAAGAAGAGGACAGCACCAAGTGGCGCAAGCTGGTGGACTTCCGCGAGCTG
AACAAAGCGCACCCAGGACTTCTGGGAGGTGCAGCTGGGCATCCCCACCCCGCGCGCTGAAGAAGAAAGAGAGCGTGAC
CGTCTGGACGTGGCGACGCCCTACTTCAAGCTGCCCTGGACGAGAGCTTCCGCAAGTACACCGCCTTCAACCATCCCCA
GCATCAACAACGAGACCCCGGATCCGCTACCAAGTACAACGCTGCTGCCCGGAGGCTGGAAGGCGAGCCCGCCATCTTC
CAGAGCAGCATGACCAAGATCTTGGAGCCCTTCCGCGCAGAGAACCCGACGATCGTATCTTACAGGCCCGCTTACGCT
GGCGAGCGACTCGAGATGGCGACACCCCGCCAGATCGAGAGCTGCGGAGGACCTCTGTAAGTGGGGCTTCACCA
CCCCGACAGAGCAGCAGAGAGGCCCGCTTCTGCCCCATGAGCTGCACCCCGACAGTGCAGCCGCTCCAGCCCATC
CTGCTGCCGAGAGGACAGCTGGACGCTGAACGACATCCAGAGCTGTGGGCGAGCTGAACCTGGGCGACGACAGTCTA
CCCCGACATCAAGGTGGCGCAGCTGTGCAAGCTGCTGCGCGCGCCAAAGGCCCTGACCGACATCGTGCCCTGACCGAGG
AGGCCGAGCTGGAGCTGGCGAGAACCGCGAGATCTGCGCGAGCCCGTGCAGCGCGTGTACTACGACCCGACGAAAGAC
CTGATCGCCGAGATCCAGAAGCAGGGCCACGAGCTGGACCTACCAAGATCTACAGGAGCCCTTCAAGAACCTGAAGAC
CGGCAAGTACGCAAGATGCGCACCCACCAACCAAGCATGAGACAGCTGACCGAGCGCTGACAGAGATCGCCATGG
AGAGCATCTGTGATCTGGGCAAGACCCCGAAGTTCCGCTGCCATCCAGAAGGAGACCTGGGAGAGCTGTGTGGAACGAC
TACTGCGAGGCCACCTGGATCCCCGAGTGGGAGTTCGTGAACACCCCGCCCGCTGGTGAAGCTGTGTGACGAGCTGAGAA
GGACCCCATCGCCGCGCTGGAGACCTTCTACGCTGGACGGCGCCACCAACCGCGAGGCCAGAGTCCGCAAGCGCGCTAG
TGACCCGCGCGCGCGCGAGAGCTGTACCTGACCAACCAACCAAGAGACCGAGCTGACGAGCCATCCAGCTG
GCTCTGACGAGCAGCGCGAGGTGAACCTGTGACCGAGACCGAGTACCGCTGCGCATCATTCACGCGCCAGCCCGA
CAGAGCGACAGCGAGATCTTCAACAGATCATCGAGCAGCTGATCAACAAGGAGCGCATCTACTGAGCTGGGTGCCCG
CCCAACAGGCATCGCGCGCAACGAGCAGGTGGACAAAGCTGTGAGCAAGGGCATCCGCAAGGTGCTG

FIGURE 49

【図 5 0】

57/114

>RTmut_TV1_C_ZAwT (SEQ ID NO:79)

CCAAATTAGTCCTATTGAAACTGTACCAGTAAATTAJAAACAGGAATGGATGGCCCCAAGGTCAACAAATGGCCATTGAC
AGAAGAAAAATAAAGCATTAACAGCAATTTGTGAGGAATGGAGAAGGAAGAAAAATTAACAAAAATTTGGCGCTGATA
ATCCATATAACACTCCAGTATTTGCCATAAAAAAGAGGACAGTACTAAGTGGAGAAAAATTAGTAGATTTTCAGGGAATC
AATAAAGAACTCAAGACTTTTGGGAAGTTCATTTAGGAATACCAACCCAGCAGGATTAJAAAAAGAAAAATTCAGTGAC
AGTGCTAGATGTGGGGATGCATATTTTCAGTTCCTTTAGATGAAAGCTTCAGGAAATATATCTGCATTCCACATACCTA
GTATATAACATGAACACCCAGGGATTAGATATCAATATATATGTGCTCCACAGGGATGGAAAGGATCAACGACATATTC
CAGAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCCTTCAGAGCAAAAAATTCAGAGATGTATCTATCAAGCCCGTGTATGT
AGATCTGATCTAGAAATAGGCAACATAGAGCAAAAAATAGAGAGTTAGGGAACATTTATTGAAATGGGATTACAA
CACCAGACAGAAACATCAAAAGAACCCCATTTCTTCCCTCAGACTCCTCCTGACAAATGGGACGATCAACCTATTA
CTGCTGCCAGAAAGATAGTTGGACGTGCAATGATATACAGAAAGTTAGTGGGAAAAATTAACCTGGGCAAGTCAGATTTA
CCCAGGATTAAGATTAAGGCAACTCTGTAACTCCTCAGGGGGGCCAAAGCACTACAGACATAGTACCACTAACTGAAG
AAGCAGAAATTAGAAATGGCAGAGAACAGGGAATTTTAGAGAACCAAGTACATGGAGTATATATGATCCATCAAAAGAC
TTGATAGCTGAATACAGAAACAGGGGCGATGAACAAATGGACATATCAAAATTTATCAGAACCATTTAAAAATCTGAJAAAC
AGGGAAGTATGCAAAATGAGGACTACCCACACTAATGATGTAAACAGTTAAACAGAGGCGAGTGCAAAAATAGCCATGG
AAAGCATAGTAAATAGGGAAAGACTCCTAAATTTAGACTACCCATCCAAAAAGAAACATGGGAGACATGGTGGACAGAC
TATTGGCAGGCCACCTGGATCCCTGAGTGGGAGTTTGTATTAATACCCCTCCCTAGTAAAAATTTATGTACCAACTAGAAAA
AGATCCATAGCAGGATAGAACTTTCTATGTAGATGGAGCACTAATAGGAGCTAAATAGGAAAGCAGGGTATG
TTACTGACAGAGAGGAGCAAAATTTGTACTTAACTACACCAAAATCAGAGACTAGTTTACAGAAATTCAGCTA
GCTCTGACAGATTCAGAGTCAAGGTAAACATAGTAAACAGCTCAGATTTGCAATAGGATCATTTCAAGCAACACAGA
TAAGAGTGACTCAGAGATATTTAACCAATATAGAACAGTTAATAACAGGAAGAAATCTACCTGTCTAGTGGTACACG
CACATAAGAGAAATTTGGGGAAATGAACAAGTAGATAAATTAGTAAGTAAGGAATTAGGAAGGTGTG

FIGURE 50

【図 5 1】

58/114

>TatC22Exon1_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:80)

ATGAGCCCGCTGGACCCCAAGCTGAAGCCCTGGAAACCAACCCCGCAGCGAGCCCAAGACCCCGGCAACAACTGCTCTG
CAGCACTCAGCTACCACTGCTGCTGGTGTGCTCCAGACCAAGGGCTGGGCTCAGCTACGCGCGCAGGAGCGCGCG
AGCGCGCAGCGCCCGCCCGCAGCGCGGAGGACCAACAGAACCCCTGAGCAAGCAG

FIGURE 51

【図 5 2】

59/114

>TatExon1_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:81)

ATGGAGCCCGTGGACCCCAAGCTGAAGCCCTGGAACCAACCCGGCAGCCAGCCCAAGACCGCTGCAACAACTGCTTCTG
CAAGCACTGCAGCTACCACTGCTTGTGTGCTTCCAGACCAAGGGCTGGGCATCAGCTACGGCCGCAAGAAGCGCGCC
AGCGCCGCAGCGCCCCCCCCAGCGCGAGGACCACCAAGAACCCCTGAGCAAGCAG

FIGURE 52

【図 5 3】

60/114

>TatExon1_TV1_C_ZAwT (SEQ ID NO:82)

ATGGAGCCAGTAGATCTTAAGCTAAAGCCCTGGAACCACTCCAGGAAGCCAACTTAAGCAGCTTGTAAATTAATTCCTTTG
CAAAACACTGTAGCTATCACTTGTCTAGTTTGTCTTCCAGACAAAGGTTTGAAGCACTTCTATGGCAGGAAGCGGAGC
AGCGACGAAGCGCTCTCTCAAGTGGTGAAGATCATCAAAATCCTCTATCAAAAGCAG

FIGURE 53

【図 5 4】

61/114

>TatExon2_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:83)

CCCTTCCCCAGGCCCGCGCGCAGCAGCACCGGCAGCGAGGAGAGCAAGAAGAAGTTGGAGAGCAAGACCGAGACCGACCC
CTACGACTGGTGA

FIGURE 54

【図 5 5】

62/114

>TatExon2_TV1_C_ZAwT (SEQ ID NO:84)

CCCTTACCCCAAGCCCGAGGGGACTCGACAGGCTCGGAGGAATCGAAGAAGAAGTTGGAGAGCAAGACAGAGACAGATCC
ATACGATTGGTGA

FIGURE 55

【図 5 9】

66/114

>Vpr_TV1_C_ZAwT (SEQ ID NO:88)

ATGGAAAGACCCCCAGAAGACCAAGGGCGCGAGAGGGAAACCATACAATGAATGGACACTAGAGATTCTAGAAGAAGCTCAA
GCAGGAAGCTGTCAAGACACTTTCTTAGACCATTGGCTCCATAGCTTTAGGACAATATATCTATGAAACCTATGGGGATACCT
GGACGGGAGTTGAAGCTATAATAAGAGTACTGCAACAACACTGTTTCATTTCATTTCAGAATTGGATGCCAACATAGCAGA
ATAGGATCATCTTGCGACAGAGAAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCC

FIGURE 59

【図 6 0】

67/114

>Vpu_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:89)

ATGGTGAAGCCTGAGCCTGTTTCAAGGGCTGGACTACCGCCTGGGCGTGGGCGCCCTGATCGTGGCCCTGATCATCGCCCAT
CATCTGTGTGGAACATCGCCTCATCATCGAGTACCGCAAGCTGTGTGCGCCAGAAGAAGATCGACTGGCTGATCAAGCGCATCC
GCGAGCGCGCCGAGGACAGCGGCCAACGAGAGCGCGACACCGAGGAGCTGAGCACCATGTTGGATCGCATGGGCCACCTG
CGCTGCTGGACGCCAACGACCATGTAA

FIGURE 60

【図 6 1】

68/114

>Vpu_TV1_C_ZAwT (SEQ ID NO:90)

ATGCTAAGTTTAAGTTTAATTTAAAGGAGTAGAATTAGATTAGGAGTAGGAGCATTTGATAGTAGCACTAATCATAGCAAT
AATAGTGTGGACCATAGCATATATAGAATATAGGAATTTGGTAAGACAAAGAAATAGACTGTGTTAATTTAAAGAATT
GGGAAGAGCAGAGACAGTGGCAATGAGAGTATGGGGACACAGAAGAAATGTCAACAAATGTTGAGATATGGGCGATCTT
AGGCTTCTGGATGCTAATGATTGTTAA

FIGURE 61

【図 5 6】

63/114

>Vif_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:85)

ATGGAGAACCGCTGGCAGGTGCTGATCTGTGTGGCAGGTGGACCGCATGAAGATCCGCGCCTGGAAACAGCCTGGTGAAGCA
CCACATGTACATCAGCCGCGCGCCAGCGGCTGGGTGTACCGCCACCACTTCGAGAGCCGCGCACCCCAAGGTGAGCAGCG
AGGTGCACATCCCCCTGGGGGACGCGCGCCTGTGTGATCAAGACCTACTTGGGGCCTGCGAGACCGGGCAGCGGACTGGCAC
CTGGGGCACGGCTGAGCATCGAGTGGCGCTTGGCGAGTAGACGACCCAGGTGGACCCCGACCTGGCCGACAGCTGAT
CCACATGCTACTTCTGACCTGTCTTCCCGAGAGCGCATCCGCCAGGCCATCTTGGGCCACATCGTGTTCGCCCGCTGCG
ACTACAGGCCCGGCCACAGAAGGTGGGACGCTGCAATCTTGGCCCTGACCGCCCTGATCAAGCCCAAGAAGCGCAAG
CCCCCCTTCCCGCAGCTGGCAGCTGGTGGAGGACCGCTGGAACGACCCCGAGAACCCCGCGCGCGCGCGCAACCA
CACCATGAAGCGCCACTAG

FIGURE 56

【図 5 7】

64/114

>Vif_TV1_C_ZAwT (SEQ ID NO:86)

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAGGTGGACAGGATGAAGATTAGAGCATGGAAATAGTTTAGTAAAGCA
CCATATGTATATATCAGGAGAGCTAGTGGATGGGTCTACAGACATCATTTTGAAGCAGACATCCAAAGTAAGTTTCAG
AAGTACATATCCCATTAAGGGATGCTAGATTAGTAATAAAAACATATTGGGGTTTTCAGACAGGAGAAGAGATTGGCAAT
TTGGGTCTATGGAGTCTCCATAGAATTGGAGATTGAGAGAAATACAGCACACAGTTAGACCTTGACTTGGCAGACAGCTAAT
TCACTATGCAATTATTTTGTATTGTTTTACAGAACTCGCCATAAGACAAAGCAATATTAGGACACATAGTTTTCCTAGGTGTG
ACTATCAAGCAGGACATAGAAGGTAGGATCTCTGCAATACTTGGCACTGACAGCATTGATAAAACCAAAAAGAGAAG
CCACCTCTGCCTAGTGTTAGAAATTAGTAGAGGATAGATGGAACGCCCCCGAGAAGACCGGGGCGCAGAGGGAACCA
TACATGAATGGACACTAG

FIGURE 57

【図 5 8】

65/114

>Vpr_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:87)

ATGGAGCGCCCCCGGAGAACCAAGGCCCCCGAGCGCGAGCCCTACAAAGAGTGGACCCCTGGAGATCTCGTGGAGAGCTGAA
GCAGGAGCGCCTGGCGCACTTCCCGCGCCCTGGCTGCAAGCCTTGGGCGAGTACATCTACGAGACCTACGGGACACCT
GGACCGGCGTGGAGGCCATCATCCGCGTGTGCGAGCGCTGCTGTTTCATCCATTCGCGATCGGCTGCCAGCACAGCGCG
ATCGGATCTCTGCGCAGCGCGCGCGCGCGCAACGCGCCACGCGCAGC

FIGURE 58

【図 6 2】

69/114

dna revexon1_2TV1_C_ZAop (SEQ ID NO:91)

ATGGCCGGCCGCGAGCGGGCGACAGCGACGAGGCCCTGCTGCAAGTGGTGAAGATCATC
AAGATCCTGTACCAGAGCCCTACCCCCAAGCCCGAGGGCACCCGCCAGGCCCGCGCGCA
ACCGCGCGCGCGCTGGCGCGCGCGCCAGCGCCAGATCCACACCATCGGCGAGCGCAT
CCTGTGTGGCCTGCCTTGGGCGGACGCGCGAGCCCGTGCCCTTGCAGCTGCCCCCCTG
GAGCGCCTGCACATCAACTGCAGCGAGGGCAGCGGCACCCAGCGGACCCAGCAGAGC
CAGGGCACCAACCGAGGGCGTGGGCGACCCCTAA

FIGURE 62

【図 6 3】

70/114

dna Revexon1_2_TV1_C_ZAwT (SEQ ID NO:92)

ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGCGCTCTCCAAAGTGGTGAAGATCATC
AAAAATCCTCTATCAAAGCAACCCCTTACCCCAAGCCCGAGGGGACTCGACAGGCTCGGA
GGAATCGAAGAAGAAGGTGGAGAGCAAGACAGAGACAGATCCATACGATTGGGTGAGC
GGATTCTTGTGCTTGCCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCAACCG
CTTGAGAGACTTCATATTAATTGCAGTGAGGGCAGTGGAACTTCTGGGACACAGCAGT
CTCAGGGGACTACAGAGGGGGTGGGAGATCCCTAA

FIGURE 63

【図 6 4】

71/114

dna TatC22Exon1_2_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:93)

ATGGAGCCCGTGGACCCCAAGCTGAAGCCCTGGAACCAACCCCGGACGCCAGCCCAAG
ACCGCCGGCAACAACTGCTTCTGCAAGCACTGCAGCTACCACTGCGTGGTGTGCTTCC
AGACCAAGGGCTGGGCATCAGCTACGGGCCCAAGAAGCGGCCGACGCGCGCAGCG
CCCCCCCCAGCGCGAGGACCAACAGAACCCCTGAGCAAGCAGCCCCCTGCCCGAGG
CCGCGGCGACAGCACCGGACGCGAGGAGAGCAAGAAGAAGGTGGAGAGCAAGACCG
AGACCGACCCCTACGACTGGTGA

FIGURE 64

【図 6 5】

72/114

dna TatExon1_2_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:94)

ATGGAGCCCGTGGACCCCAAGCTGAAGCCCTGGAACCAACCCCGGCAGCCAGCCCAAG
ACCGCTGCAACAACTGCTTTGCAAGCACTGCAGCTACCACTGCCTGGTGTGCTTCCA
GACCAAGGGCTTGGGCATCAGCTACGGCCGCAAGAAGCGCCGACGCGCCGACGCGCC
CCCCACGCGGAGGACCACCAAGAACCCCTGAGCAAGCAGCCCTGCCCCAGGCC
GCGGCGACAGCACCGGCAGCGAGGAGAGCAAGAAGAAGGTGGAGAGCAAGACCGAG
ACCGACCCCTACGACTGGTGA

FIGURE 65

【図 6 6】

73/114

dna TatExon1_2_TV1_C_ZAwt (SEQ ID NO:95)

ATGGAGCCAGTAGATCCTAACTAAAGCCCTGGAACCATCCAGGAAGCCAACCTAA
ACAGCTTGAATAATTGCTTTTGAACCACTGTAGCTATCATTGTCTAGTTTGTCTTCA
GACAAAAGGTTTAGGCATTTCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGCGC
TCTCCAAGTGGTGAAGATCATCAAAATCTCTATCAAAAGCAGCCCTTACCCCAAGCC
CGAGGGGACTCGACAGGTCGGAGGAATCGAAGAAGAAGGTGGAGAGCAAGACAGA
GACAGATCCATACGATTGGTGA

FIGURE 66

【図 6 8】

75/114

ATGCGCGCCCGCGGCATCCTGAAGAACTACCGCCACTGGTGGATCTGGGGCATCCT
GGGCTTCTGGATGCTGATGATGTGCAACGTGAAGGGCTGTGGGTGACCGTGTACTA
CGGCGTGCCCGTGGGCGCGGAGGCCAAGACCACCTGTTCTGCGCCAGCGACGCTCA
AGGCTACGAGAAAGGAGGTGCACAACGTGTGGCCAACCCACGCTGCGTGCACCAC
GACCCCAACCCCAAGGAGGTGATCCTGGGCAACGTGACCGGAGAACTTCAACATGTG
GAAGAACGACATGGTGGACAGATGTCAGGAGGACATCATCAGCCTGTGGGACAGAG
GCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACCCCCCTGTGCGTGACCCCTGAACTGCACCAACG
CCACCGTGAACATAACAACACCCAGCAAGGACATGAAGAAGTGCAGCTTCTACGTG
ACCACCGAGCTGCGCGACAAGAAGAAGAGAGAAACGCGCTGTTCTACCGCTTGA
CATGTCGCCCTGAACAACCGCAAGAAGCGGCAACATCAACAACACTACCGCTGATCA
ACTGCAACACCAAGCGCATCACCCAGGCTGCCCAAGGTGAGCTTCGACCCCATCC
CCATCCACTACTGCGCCCCGCGGCTACGCCCCCTGAAGTGCAACAACAAGAAG
TTCAACGGCATCGGCCCCGCGGACAACGTGAGCACCGCTGCACTGCACCCACGGCAT
CAAGCCCGTGGTGAGCACCCAGCTGCTGCTGAACGGCAGCCTGCGCGAGGAGAGA
TCATCATCCGAGCGAGAACCTGACCAACAACGTGAAGACCATCATCTGTCACCTG
AACGAGAGCATCGAGATCAAGTGCACCCCGCCGCAACAACACCCGCAAGAGCGT
GCGCATCGGCCCCGCGGACGCTTCTACGCCACCGCGACATCATCGGCGACATCC
GCCAGGCCACTGCAACATCAGCAAGACGAGTGGAAACACCACTCGCAGCGCTG
AGCCAGAAGCTGCAGGAGCTGTCCCCAACAGCACCGGCATCAAGTTCGCCCCCA
CAGCGGCGGCGACCTGGAGATCACCAACCCACAGCTTCAACTGCGGCGGCGAGTCT
TCTACTGCAACACCAACCGACCTGTTCAACAGCACTCAGCAACCGCACCTGCAACA
ACGGCACTGTCATGAGCAACAACACCGAGCGCATCACCTGCACTGCGGCATCAAG
CAGATCATCAACATGTGGCAGGAGGTGGGCGCGCCATGTACGCCCCCCCATCGC
CGGCAACATCATGTGCGCAGCAACATCACCGGCTGCTGCTGACCGCGGACGCGG
GCGACAACAACACCGAGACCGAGACCTTCCGCCCCGCGCGCGGCGACATGCGCGAC
AACTGGCGCAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGGAGATCAAGGCCCTGGGCGT
GGCCCCACCGCCGCAAGCGCGCGTGGTGGAGCGGAGAAAGCGCGCTGGGGCA
TCGGCGCGGTGTTCTGGGCTTCTGGGCGCGCGCGGACACCATGGGCGCGGCCA
GCATCACCTGACCGTGCAGGCCCGCCAGCTGCTGAGCGGCATCGTGACGACGAG
AGCAACCTGCTGCGCGCATCGAGGCCAGCAGCACATGCTGCGAGCTGACCGTGTG
GGGCATCAAGCAGCTGCAAGGCCGCGTGTGCGCATCGAGCGCTACCTGCAAGGACC
AGCAGCTGCTGGGCTGTGGGCTGTCAGCGGCAAGCTGATCTGCACCAACCAAGT
CTGTGGAACAGCAGCTGGAGCAACAAGACCCAGAGCGACATCTGGGACAACATGAC
CTGGATGCACTGGGACCGCGAGATCAGCAACTACACCAACACCATCTACCGCTGC
TGGAGGACAGCCAGGCCAGCAGGAGCGCAACGAGAAGGACCTGCTGGCCCTGGA
CCGCTGGAAACAACCTGTGGAACTGGTTACGATCACCAACTGGCTGTGGTACATCAA
GATCTTCATCATGATCGTGGCGGCTGATGGCCTGCGCATCATCTTCCGCGTGTCT
GAGCGGTGTGAACCGGTGCGCCAGGCTACAGCCCCCTGAGCCTGCAGACCATGAC
TCCCCAACCCCGCGGCCCCGACCGCTGGGCGGCATCGAGGAGGAGGGCGGCGGAG
CAGGACAGCAGCGCGAGCATCCGCTGGTGAAGCGGCTTCTGACCTGGGCTGGGA
GCACCTGCGCAGCCTGTGCTGTCTGCTACCAACCGCTGCGCGACTTCATCTGAT
CGTGGTGGCGCGCTGGAAGCTGTGGGCGCACAGCGCTGCGCGGCTGCGAGCGG
GCTGGGCGACCTGAACTACCTGGGCGACCTGGTGTGCACTGCTGGGCTGGAGCTG
AAGAAGACAGCGCTCAACCTGCTGGACACCATCGCCATGCGCGTGGCGGAGGGCAC
CGACCGCATCTCGGAGTTCATCCAGAACCTGTGCGCGGCATCCGCAACGTGCCCCG
CCGCATCGCCAGGGCTTCGAGGCGCGCTCGAGTAA

FIGURE 68

【図 6 7】

74/114

NefD125G-Myr_TV1_C_ZAopt (SEQ ID NO:96)

ATGGCCGGCAAGTGGAGCAAGCGCAGCATCGTGGGCTGGCCCGCGTGGCG
GAGCGCATGCGCCGACCGAGCCCGCGCGGAGGGCTGGGCGCCCGCAGC
CAGGACCTGGACCGCCACGCGCCCTGACCAAGCAGCAACACCCCGCCACCA
ACGAGGCTGCGCCTGGCTGCAGGCCAGGAGGAGGACGCGCAGCTGGGCT
TCCCGTGGCCCCAGGTGCCCTGCGCCCATGACCTACAAGAGCGCGCT
GGACCTGAGCTTCTTCTGAAGGAGAAGGGCGGCTGGAGGGCTGATCTAC
AGCCGCAAGCGCCAGGAGATCTGGACCTGTGGGTGTACAACACCCAGGGCT
TCTTCCCGGCTGGCAGAATCACACGCGGCCCGCGCTGCGCTTCCCGCT
ACCTTCGGCTGGTCTTCAAGCTGGTGGCCCTGGACCCCGCGAGGTGAAGG
AGGCCAACGAGGGCGAGGACAACCTGCCTGTGCACCCCATGAGCCAGCAG
CGCCGAGGACGAGGACCGCGAGGTGCTGAAGTGGAAAGTTCGACAGCCTGC
TGCCCAACCGCCACATGGCCCGGAGCTGCACCCGAGTACTACAAGGACTG
CTGA

FIGURE 67

【図 6 9】

76/114

ATGAGAGCGAGGGGGTACTGAAGAATTATCGACACTGGTGGATATGGGCACTTT
AGGCTTTTGGATGCTAATGATGTGTAATGTGAAGGGCTTGTGGGTACAGTCTACTA
CGGGGTACCTGTGGGGAGAGAAGCAAAACTACTCTATTTTGTGCATCAGATGCTA
AAGCATATGAGAAAAGAGTGCATAATGTCTGGGTACACATGCCTGTGTACCCACA
GACCCCAACCCACAAGAAAGTATTTGGGCAATGTAAACAGAAAATTTAACATGTG
GAAAAATGACATGGTGGATCAGATGCAGGAAGATATAATCAGTTTATGGGATCAAA
GCCTTAAGCCATGTGTAAAATTGACCCCACTGTGTGTCACCTTAAACTGTACAATG
CAACTGTAACTACAATAATACCTCTAAGACATGAAAAATTTGCTCTTTATGTAA
CCACAGAATTAAGAGATAAGAAAAAGAAAGAAATGCACCTTTTATAGACTGTAT
ATAGTACCACTTAATAATAGGAAGAAATGGGAATATTAACAACATAGATTAAATAA
TTGTAATACCTCAGCCATAACACAAGCCTGTCCAAAAGTCTCGTTTGACCCAAATCC
TATACATTATTGTCTCCAGCTGGTTATGCGCCTCTAAAATGTAAATAAAGAAAT
CAATGGAATAGGACCATGCGATAATGTGACGACAGTACAATGTACACATGGAATTA
AGCCAGTGGTATCAACTCAATTACTGTAAATGGTAGCCTAGCAGAGAAGAGATA
ATAATTAGATCTGAAAAATGTGCAACAACATGTCAAAAACAAATAGTACATCTTAAT
GAATCTATAGAGATTAATGTACAAGACCTGGCAATAATACAAGAAAGAGTGTGAG
AATAGGACCAGGACAAGCACTTATGCAACAGGAGACATAATAGGAGATATAAGAC
AAGCATTGTAACTAGTAAAAATGAATGGAATCAACTTTACAAAGGGTAAGT
CAAAAATTTACAAGAACTCTCCCTAATAGTACAGGGATAAAATTTGCACCACACTCA
GGAGGGGACCTAGAAATTAACACATAGCTTAAATTTGGAGGAGAAATTTTCTAT
TGCAATACAACAGACCTGTTTAAATGATACATACAGTAAATGGTACATCAATGGT
ACATGCATGTCTAATATAACAGAGCGCATCACACTCCAATGCGAATAAAAACAAAT
TATAAACATGTGGCAGGAGGTAGGACGAGCAATGTATGCCCTCCCATTTGCAGGAA
ACATAACATGTAGATCAAAATATTACAGGACTACTATTAACACGTGTGAGGAGAT
AATAACTACTGAAACAGAGACATTCAGACCTGGAGGAGGAGACATGAGGGACAATTG
GAGAAGTGAATATATAAATACAAGTGGTAGAAATTAACCAATTAGGAGTAGGCAC
CCACTGTCTGCAAAAAGGAGAGTGGTGGAGAGAGAAAAAGAGCAGTAGGAATAGG
AGCTGTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCATCAAT
AACGCTGACCGTACAGGCCAGACAATATTGTCTGGTATAGTGAACAGCAAAAGTA
ATTTGCTGAGGGCTATAGAGGCGCAACGACATATTTGCAACTACGGTCTGGGGC
ATTAAGCAGCTCCAGGCAAGAGTCTGGCTATAGAGAGATACCTACAGGATCAACA
GCTCTAGGACTGTGGGGCTGCTCTGGAACCACTCATCTGCAACCAATATTGTGCTTTG
GAATCTAGTTGGAGTAAATAAACTCAAAGTGAATTTGGGATAAACATGACCTGGAT
CAGTGGGATAGGGAAATAGTAATTACACAACAACAAATATACAGGTGTGTTGAAG
ACTCGCAAAAGCCAGGAGAAAGAAATGAAAGAAATTTACTAGCATTGGACAGGTGG
AACAATAGTGTGAATTTGGTTAGCATAACAAATTTGGCTGTGGTATATAAAATATT
ATAATGATAGTAGGAGGCTGTAGTGGTTTAAAGATAATTTTGTCTGTCTCTCTA
GTAAATAGAGTTAGGAGGACTACACCTGTGCTATTCAGACCCCTTATCCAAAC
CGAGGGGACCCGACAGGCTCGGAGGAATCGAAGAAGAGGTGGAGAGCAAGACA
GCAGCAGATCCATTGATTAAGTGTGAGCGGATCTTGACACTTGTCCGGGAGCAGCTAC
GAGCGGTGTGCTCTGCTACCCAGGATGAGAGACTCATATTAATTTGTAGTGA
GAGCAGTGAAGCTCTGGGACACAGTAGTCTCAGGGGACTCGAGAGGGGGTGGGGA
ACCTTTAAGTATTTGGGGAGTCTTGTGCAATATTGGGTGTAGAGTTAAAAAGAGT
GCTATTAATCTGCTGTGATATAAGCAATAGCAGTAGCTGAAGGAACAGATAGGATT
CTAGAATTATACAAAACCTTTGTAGAGGTATCCGCAACGTACCTAGAAGAATAAG
ACAGGGCTCGAAGCAGCTTTGCAATAA

FIGURE 69

【図 7 0】

77/114

Gag_TV2_C_ZAopt (SEQ ID NO:99)

ATGGGCGCCCGCCAGCATCTCGCGGCGGCAAGCTGGACAAGTGGGAG
AAGATCCGCTCGCGCCCGCGGCCGCAAGCACTACATGCTGAAGCACCTGG
TGTGGGCGAGCCGCGAGCTGGAGCGCTTCGCGGTGAACCCCGGCTGCTGGA
GACCAAGCGAGCGGTGCGCGCAGATCATCAAGCAGCTGCAGCCCGCCTGCAG
ACCGGCACCGAGGAGATCCGCGAGCTGTTCAACACCGTGGCCACCCCTGACT
GCGTGCACAAGGGCATCGACGTGCGGACACCAAGGAGGCCCTGGACAAGA
TCGAGGAGGAGCAGAACAAAGTGCCAGCAGAAGACCCAGCAGGCCGAGGCC
CCGACAAGAAGGTGAGCCAGAACTACCCCATCGTGCAGAACCTGCAGGGCC
AGATGGTGCACCAAGGCCATCAGCCCCCGCACCCCTGAACGCTGGGTGAAGGT
GATCGAGGAGAAGGCCCTTCAGCCCCGAGGTGATCCCATGTTTACCCGCCCTG
AGCGAGGGCGCCACCCCGCAGGACCTGAACACCATGCTGAACACCGTGGGC
GGCCACCAAGGCCCATGCGAGTGTGAAGGACACCATCAACGAGGAGGCC
GCCGAGTGGGACCGCTGCACCCCGTGACGCGCGGCCCGTGGCCCGCGGCC
AGATGCGCGAGCCCGCGGCCAGCGACATCGCCCGGCCACCAAGCACCCCTGCA
GAGCATGATCGCTGGATGACCAAGCAACCCCGCATCCCGTGGCGGACATC
TACAAGCGCTGGATCATCTCTGGGCGTGAACAAGATCGTGCATGTACAGCC
CCGTGAGCATCTGGACATCAAGCAGGGCCCCAAGGAGCCCTTCGCGACTA
CGTGGACCGCTTCTTCAAGACCTCTGCGCGCCGAGCAGAGCACCCAGGAGGTG
AAGAAGCTGGATGACCGACACCTCTGCTGTGCAAGCGCCAAACCCGAGCTGCA
AGACCATCTCGCGGCCCTGGCGCCCGGCCGAGCTGGAGGAGATGATGAC
CGCTCGCCAGGGCGTGGCGGCCCGCCAGCCACAAGGCCCGCTGTGCGCGAG
GCCATGAGCCAGGCCAACCAACACAGCGGTGATGATCCAGAAGAGCAATTC
AAGGGCCCCCGCGCGCGCTGAAGTGCTTCACTGCGGCCGCGAGGGCCACA
TCGCCCGCAACTGCGCGCCCGCCCGCAAGCGCGGCTGTGGAAGTGGCGCAA
GGAGGGCCACAGATGAAGGACTGCACCGAGCGCCAGGCCACCTTCTGGG
CAAGATCTGGGCCAGCCACAAGGGCGCCCGGCCAACTTCTCGAGAGCCCG
CCCGAGGCCACCGCCCCCGCTGGAGGCCACCGCCCCCGCGCGAGAGCT
TCAAGTTCAAGGAGACCCCAAGCAGGAGGCCAAGGACCGCGAGCCCTGA
CCAGCTGAAGAGCGTGTGGCGAGCGACCCCTGAGCCAGTAA

FIGURE 70

【図 7 1】

78/114

Gag_TV2_C_ZAwT (SEQ ID NO:100)

ATGGGTGCGAGAGCGTCAATATTAAGAGGGGGAAAAATTAGACAAATGGGAA
AAAAATTAGGTTACGGCCAGGGGGGAGAAAAACACTATATGCTAAAAACCTA
GTATGGGCAAGCAGAGAGCTGGAAAGATTGCAAGTTAACCCCTGGCCCTTTAG
AGACATCAGACGGATGTAGACAAATAATAAAAACAGCTACAACCAAGCTTTC
GACAGGAACAGAGGAAATTAGATCAATTATTAACACAGTAGCAACTCTCTAT
TGTGTACATAAAGGGATAGATGTACGAGACACCAAGGAAGCCTTAGACAAG
ATAGAGGAGGAACAAAACAAATGTACAGCAAAAAACACAGCAGGGCGGAAGGC
GTGACAAAAAGGTGACGTCAAAATATCTCTATAGTGCAGAACCTCCAAGGC
AAATGGTACACCAAGGCCATATCACTAGAACCTTGAATGCATGGGTAAAAAGT
AATAGAGGAGAAGGCTTTTAGCCAGAGGTAAATACCCATGTTTACAGCAITTA
TCAGAAGGAGGCCACCCCAAGATTAAACACCATGTTAAATACAGTGGGGG
GACATCAAGCAGCCATGCAATGTTAAAGATACCATCAATGAGGAGGCTGC
AGAAATGGGATAGGTTACATCCAGTACATGACAGGGCCTGTTGCACAGGCCAG
ATGAGAGAACAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACCTACTAGTACCCCTTCAA
GAACAAATAGCATGGATGACAAAGTAACCCACCTATCCCACTAGGGGACATCT
ATAAAAGGTGGATAATTCTGGGGTTAAATAAATAGTAAAGATGTACAGCCC
TGTCAGCATTTTAGACATAAAACAAGGACCAAGGAACCTTTAGAGACTAT
GTAGACCGGTTCTTCAAAACTTTAAGAGCTGAACAACTTACAACAAGAGGTAA
AAAAATTGGATGACAGACACCTTGTAGTCCAAATGCGAACCCAGATTGTAA
GACCATTTTAAAGAGCAITAGGACCAAGGGCTTCAATTAGAGAAATGATGACA
GCATGTGAGGAGTGGGAGGACCTAGCCACAAGCAAGAGTTTGTGCTGAG
GCAATGAGCCAAGCAACAATAACAAGTGTAAATGATACAGAAAAAGCAATTTA
AAGGCCCTAGAAGAGCTGTAAATGTTTCAACTGTGGCAGGGAAGGGCACAT
AGCCAGGAATTGCAAGGGCCCTAGGAAAGGGGCTGTTGGAAATGTGGAA
GGAAGGACACCAATGAAGACTGTACTGAGAGGCAAGCTAATTTTATAGG
AAAATTTGGCCTTCCACAAGGGGAGGCCAGGAAATTTCTTCAGAGAGCC
CAGAGCCAACAGCCCCACCACTAGAACCACAGCCCCACAGCAGAGAGCT
TCAAGTTCAAGGAGACTCCGAAGCAGGAGCCGAAGACAGGGAACCTTTAA
CTCCCTCAAACTACTCTTGGCAGCGACCCCTGTCTCAATAA

FIGURE 71

【図 7 2】

79/114

Nef_TV2_C_ZAopt (SEQ ID NO:101)

ATGGGCGGCAAGTGGAGCAAGAGCAGCATCATCGGCTGGCCCGAGGTGCGC
GAGCGCATCCCGCACCCCGACGCGCGCCGAGGGGCTGGGCAAGCCAGC
CAGGACCTGGAGAAGCAGCGCGCCCTGACCCAGCAACACCGCCACAAC
AACCGCGCTGCGCTGGCTGGAGGCCCCAGGAGGAGGAGGCGAGGTGGGC
TTCCCGTGGCGCCCGAGGTGGCCCTTGCGGCCCATGACCTACAAGGCCCAT
CGACTGAGCTTCTTCTGAAGGAGAAGGGCGGCCCTGGAGGGCTGTATCTAC
AGCAAGAAGCGCCAGGAGATCTGGACCTGTGGGTGTACAACACCCAGGGC⁺
TTCTTCCCGACTGGCAGAACTACACCCCGCGCCCGCGCTGCGCTTCCCT
GACCTTCGGCTGCTACTTCAAGCTGGAGCCCGTGGACCCCGCGAGGTGGAG
GAGGCCAACGAGGGCGAGAACAACCTGCCTGCTGACCCCATGAGCCAGCAC
GGCATGGAGGAGGAGACCGGAGGTGCTGCGCTGGAAGTTGACAGGACCC
CTGGGCCGCCACATGGCCCGGAGCTGCACCCCGAGTACTACAAGGACT
GCTGA

FIGURE 72

【図 7 3】

80/114

Nef_TV2_C_ZAwT (SEQ ID NO:102)

ATGGGGGCAAGTGGTCAAAAAGCAGTATAATTGGATGGCCTGAAGTAAAGA
GAAAAGATCAGACGAACTAGGTACAGCAGCAGAGGGAGTAGGATCAGCGTCT
CAAGACTTAGAGAAACATGGGGCACTTACAACCCAGCAACACAGCCCAAC
AATGCTGCTTGCCTGGCTGGAAGCGCAAGAGGAGGAAGGAGAAGTAGGC
TTTCCAGTCAGACCTCAGGTACTTAAAGACCAATGACTTATAAAGCAGCAAT
AGATCTCAGCTTCTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGTTAATTTAC
TCCAAGAAAAGGCAAGAGATCTTGAATTGTGGGTTTAAACACACAAGGCT
TCTTCCCTGATTGGCAAAATACACACCGGACCAAGGGGTGAGATTTCCACT⁻
GACCTTTGGATGGTACTTCAAGCTAGAGCCAGTGCATCCAAGGGAAGTAGAA
GAGGCCAATGAAGGAGAAAACAACTGTTTACTACCCCTATGAGCCAGCATG
GAATGGAGGATGAAGACAGAGAAATTAAGATGGAAGTTTGACAGTAGCG
TAGCACCGACACATGGCCCGGAGCTACATCCGGAGTATTACAAAGACTG
CTGA

FIGURE 73

【図 7 4】

81/114

Pol_TV2_C_ZAopt (SEQ ID NO:103)

TTCTTCGGGAGAACTTGGCTTCCCGCAGGGCGAGGCCGCGAGTTCCCGAGCGAGCAGCC
CGCGGCAACAGCGCCACCAACCGCCACAGCGCGAGCTGCAGTCCAGTGG
GCAGACGGAGCGCGCGCGAGCGCCAGGGCACTTCAACTTCCCGAGATCACTCTGTGCG
AGCGCCCTTGGTGAAGTCAAGGTGGCGGCCAGCAAGGAGGCCCTGCTGGAACACGGC
CGCGACGACACCGTGTGGAGGAGTCAACCTGCGCGGCAAGTGAAGCCAAAGATGATCGG
CGGATCGGCGCTTCAATCAAGGTGGCGCAGTACGACCAAGTCTGATCGAGATCTGGCGCA
AGCGCGCATTCGGCACCGTGTGTTGGGCCCAACCCCGTGAACATCATCGGCGCAACCTGC
TGAACCACTGGGCTGCACCTGAACCTTCCCGCATGACGCCCATGAGAGCGTGGCGGTGAAGC
TGAAGCCCGGCATGGACGGCCCAAGGTGAAGCAAGTGGCCCTGACCGAGGAGAAGATCAAG⁺
GCCCTGACCGAGATCTGCGAGGAGATGGAGAAGGAGGGCAAGTACCAAGATCGGCCCG⁺
AGAACCCCTACACACACCCCGTGTGTCGATCAAGAGAAGAGGACAGCAACCAAGTGGCGAAG
CTGTGTGACTTCCGCGAGCTGAACAAGCGCACCCAGGACTTCTGGAGGTGAGTGGGACT
CCCCACCCCGCGCTGGAAGAAGAGAGCGGTGACGCTGCTGAGAGTGGCGGACCGCTT
ACTTACGCTGCGCTGGAAGGAGGCTTCCGCAAGTACAGGCTTCACTTCCCGAGCATCA
ACAAGCAGACCCCGGCACTCCGCTACCAAGTACAAGTGTGCTGCCCTGGAAGGGCAGC
CCCGCATCTTCCAGAGCAGCATGACCCCGATCTCGGAGCCCTTCCGACCCAGAAACCCGAG
GTGTGATATACCAAGTACATGAGCAGCTGTACGTGGGCAAGGACCTGGAGATCGCGGCA
CCCGGCAAGATCGAGGAGCTGCGCGGCCACCTGCTGAAGTGGGGCTTCAACACCCCGGCA
AGAAAGCAGAGAAGGAGCCCGCTTCTGTGGATGGGCTACGAGCTGCACCCCGACAAGTGG
ACCGTGCAGCCCATCCAGCTGCGCGAGAAGGAGAGCTGGACCGTGAACGATCTCAGAAAGCT
GGTGGGCAAGCTGAACCTGGGCCAGCGAGTCTACCCCGGCATCAAGGTGCGCCAGCTGTGCA
AGCTGCTGGCGGCGCAAGGCCCTGACCGACATCGTGGCCCTGACCGGAGGAGCGAGCTG
GAGCTGGCGGAGAACCGCGAGATCTGAAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGTACTACGACCGAG
CAAGGACCTGATCGCGAGATCCAGAAAGCAGGCAACGACAGTGGAGCTACCAAGATCTTACC
AGAGCCCTTCAAGAACTTGGCCCGCGCAAGTACCGCAAGATCGCCACCGCCACCAAC
GAGCTGAAAGCAGCTGGCGGCGGCTGCAAGATCAACCCAGGAGACATCGTGTATCTGAGT
CAAGACCCCAAGTTCGCGCTGCCATCCCAAGGAGACCTGGGAGACCTGGTGGAGGACAT
ACTGGCAGGCCAAGTGGATCCCGAGTGGGAGTGTGTTGAACACCCCGCTGGTGAAGCTGT
GTTACAGCTGGAGAAAGGAGCCCATCGTGGGCGCGAGACCTTCTACGTGGAGCGGCGCGC
AACCAGGAGACCAAGATCGGCAAGGCGGCTACGTGACCGCAAGAGGGCGGCCAGAGGTGG
TGAGCTTCAACGAGACCAACCAAGGAGACCGAGCTGCAGGCCATCCAGCTGGCCCTGCAAG
GACACGGGCCCGAGGTGAACATCGTGCAGCAGCCAGTACGCCCTGGGCATCATCCAGCC
CGAGCCGACAGAGGAGGAGGAGGAGCTGGTGAAGCAGATCATCGAGCAGCTGATCAAGAA
GAGAAGGTGTACTGAGCTGGGTGCGCGGCCACAAGGGCATCGCGGCCACAAGAGCAGGTGGA
CAAGCTGGTGAAGCGGCTCCGCAAGGTGCTGTTCTGGAGCGGATCGACAAGGCCAGG
AGGACAGGAGAGTACACAGCAACTGGCGGCCATGGCAGGAGTTCAAGTTCGCCCTC
ATGCTGGCAAGGAGATCGCGCCAGCTTGCACAAGTGGCACTGAAGGGCGAGGCAATCA
CGGCCAGGTGAGCTGCAAGCCCGCATCTGCGAGCTGGAAGTCAACCCATCGAGGCGCAAGA
TCACTGTGGCGGTGACGCTGGCCAGCGGCTACATCGAGCCGAGGATGATCCCGCGAG
ACCGGCCAGGAGACCGCTACTTCACTGAGCTGGCGCGCGCTGGCCCGTGAAGGTGATC
CAGCCGACAAGCGGCAACTTCAACAGCACCGCGCTGAAGGCGCGCTGCTGTGGGCGCA
CATCCAGCGCGAGTTCGGCATCCCGTACAACCCCGAGAGCCAGGGCGTGGTGGAGAGCATGA
ACAAGAGCTGAAGAAATGATATCGGCCAGGTGGCGGACCAAGGCGGCACTGAAGAGCCCG
GTGCAAGTGGCGGTGTTCAACCAACTTCAAGCGCAAGGGCGGCACTGGCGGCTACAGCGC
CGCGGAGCGCATCATGACATCATGCGCAGCGACATCCAGCCAAGAGGAGCTGCAAGAGCAGA
TCATCAAGATCCAGAACTTCCGCGTGTACTACCGGACAGCGCGGACCCCATCTGGAAGGGCG
CGCCAAAGCTGCTGTGGAAGGGCGAGGGGCGCGCTGGTGTATCCAGGACAACAGGACATCAAG
GTGGTCCCGCGCAAGGCAAGGATCAAGGACTCAGGCAAGCAGATGGCGGCGCGA
CTCGTGGCGCGCGCAGGACGAGGAC

FIGURE 74

【 図 7 5 】

82/114

Pol_TV2_C_ZAwt (SEQ ID NO:104)

TTTTTTGAGGAAAATTTGGCCTTCCCAAGAGGGGAGGCCAGGGAATTCCTTCAGAGCAGAAC
AGAGCCACAGCCCCAACCTAGAACCAACAGCCCCCAGCAGAGAGCTTCAAGTTCAAGG
AGACTCCGAAAGCAGAGCCGAAAGACAGGGAACCTTTAACTCCCTCAAACTCTTTGGCA
GCGACCCCTTGCTCAATAAAAGTAGGGGCCAAACAAAGGAGGCTCTTTAGATACAGAG
CAGATGATACAGTACTAGAGAAATAAATCTGGCCAGGAAATGGAACCAAAAAATGATAGG
AGGAATTTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAAAATCTTATAGAAAATTTTGGAAA
AAGGGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGT
GACTCAGCTTGGATGCACACTAAATTTTCCAATTAGCCCCATTGAACTGTACCAAGTAAAT
AAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAGGTTTAAACAATGGCCATTGACAGAGAAAAATATAAA
GCATTAAACAGAAATTTGTAGGAAATGGAGAAAGGAAGGAAAAATACAAAAATTTGGGCTGA
AAATCCATATAACACTCCAGTATTGCCATAAAGAAAGAGCAGTACAAAGTGGAGAAAAAT
TAGTAGATTTACAGGGAACCTCAATAAAGAACTCAAGACTTTTGGGAAGTCCAATTAGGAATA
CCACACCCAGCAGGGTTTAAAAAGAAAAAATCACTGACAGTACTGGATGTGGGAGATGCATA
TTTTTCAGTCCCTTTAGATTGAGAGCTTCAGAAAAATATACCTGATTCCCAATACCTAGTATAAAC
AATGAACACAGCAAGTTAGATATCAATAATAATGTTCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCAACC
AGCAATATTCCAGAGTAGCATGACAGAAATCTTAGAGCCCTTTAGAACACAAAAACCCAGAAAG
TAGTTATCTATCAATATATGGAATGACTTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAACATA
GAGCAAAAAATAGAGGAGTTAAGAGGACACCTATTGAAATTTGGGGATTTACCAACCCAGCAAG
AAACATCAGAAAGAACCCCAATTTCTTTGGATGGGGTATGAATCCATCTTGACAAATGGGACA
GTACAGCCTATACAGCTGCCAGAAAGGAGAGCTGGACTGTCAATGATATACAGAAAGTTAGT
GGGAAGGTTAAACTGGGCAAGTCAAGATTTACCCAGGGATTAAGTAAGGCAACTGTGTAAAC
TCCTTAGGGGAGCCAAAGCACTAACAGACATAGTGCCACTGACTGAAGAGCAGAAATAGAA
TTGGCTTGAGAACAGGGGAAATTTCTAAAAGAACCAAGTACATGGAGTATATTATGACCCATCAA
AGATTTAATAGCTGAAATACAGAAACAGGGGAATGACCAATGGACATATCAAAATTTACCAAG
AACCATTAAAAAATCTGAGAACAGGAAAGTATGCAAAAAATGAGGACTGCCACACTAATGAT
GTGAAACAGTTAGCAGAGGCAAGTGCAGAAAGATAACCCAGGAAAGCAATAGTAAATTTGGGAA
AACTCTCAAAATTTAGTACTACCATCCCAAGAAACATGGGAGACATGGTGCTCAGACTAAT
GGCAAGCCACTGGATTCTTGATGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTAGTAAAAATTTGTGT
ACCAAGCTGGGAAAGAACCCATAGTAGGGGCAAGAACTTTCTATGATAGTGGAGCAGCCAAAT
AGGGAATACTAAAAATAGGAAAAAGCAGGTATGTCACTGCAAAAGGAAGCAGAAAGTTGTTTC
CTTCACTGAAACAAACAAATCAGAAAGACTGAATTAACAAGCAATTCAGCTAGCTTTGACAGGATTC
AGGGCCAGGAAGTAAACATAGTAACAGACTCAAGATGTCATTAGGAATCATTTCAAGCACAAC
CAGATAAGAGTGAATCAGAAATATGTCAGTCAAAATAGAAACAGTTGATAAAAAGGAAAAA
GTCTAATCTATCTGGGTACAGCAGCATAAAGGAATTTGGAGGAAATGAACAAGTACAGCAAAAT
AGTAAGTAGTGAATCAGAAAGTACTGTTTCTAGATGGAATAGATAAGGCTCAAGAGAGGC
ATGAAAAATATCAGACGCAATTTGGAGAGCAATGGCTAGTGTGAGTTTAACTGCCACCCATAGT
GCAAGGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAAGTAAAGGGGAAAGCATTGCTAGGACA
AGTGACGCTGATGTCAGGAATATGGCAATTAGACTGTACACATTTAGAAAGGAAAAATCATCTCT
AGTAGCAGTCCATGTAGCAGATGGCTACATGGAAGCAGAGTTATCCAGCAGAAACAGGAC
AAGAAACAGCATACTTTATACTAAATTAGCAGGAAGATGGCCAGTCAAAAGTAAATACATACA
GATAATGGCAGTAATTTCAACAGTACCGCAGTTAAGGCAGCCTGTTGGTGGCAGATATCCAA
CGGGAAATTTGGAATTCOCTACAATCCCAAGTCAAGAGGATAGTAGAATCCATGAATAAGAA
ATTAAAGAAAAATCATAGGGCAAGTAAGAGATCAAGCTGAGCACCTTAAGACAGCAGTACAAA
TGGCAGTATTCACTTCACAATTTTAAAGAAAAAGGGGGGATTTGGGGGTACAGTGCAGGGGAG
AGAATAATAGACATAATAGCATCAGACATACAACTAAAGAAATTACAAAAACAAATTATAAA
AATTCAAAAATTTTCGGGTTTATTACAGAGACAGCAGAGACCCCTATTGGAAGAGGACAGCCAA
ACTACTCGGAAAGGTGAAGGGGAGTAGTAATACAGAGATAATAGTGATATAAAGGTAGTAC
CAAGAAAGGAAAGCAAAATCATTAAGGACTATGGAATAACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTG
CGAGGTAGACAGGATGAAGAT

FIGURE 75

【 図 7 9 】

86/114

RevExon2_TV2_C_ZAwt (SEQ ID NO:108)

ACCCCTTATCCCAAACCCGAGGGGACCCGACAGGCTCGGAGGAATCGAAGAA
GAAGGTGGAGAGCAAGACAGCAGCAGATCCATTGATTAGTGAGCGGATTCT
TGACACTTGCCTGGGACGACCTACGAAGCCTGTGCCTCTTCTGCTACCCACCGA
TTGAGAGACTTCATATTAATGTAGTGAGAGCAGTGGAACTTCTGGGACACA
GTAGTCTCAGGGGACTGCAGAGGGGTGGGGAACCTTAA

FIGURE 79

【 図 8 0 】

87/114

TatExon1_TV2_C_ZAopt (SEQ ID NO:109)

ATGGAGCCCCATCGACCCCAACCTGGAGCCCTGGAACCAACCCGGCAGCCAGC
CCAAAGACGCCTGCAAGCGCTGCTACTGCAAGCGCTGCAGCTACCACTGCCT
GGTGTGCTTCCAGAAAGAGGGCTGGGCATCTACTACGGCCGCAAGAGCGC
CGCCAGCGCCGACGCGCCCCCCCAGCAACAAGGACCAACAGGACCCCTGC
CCAAGCAG

FIGURE 80

【 図 8 1 】

88/114

TatExon1_TV2_C_ZAwt (SEQ ID NO:110)

ATGGAGCCAATAGATCCTAACCTAGAACCCCTGGAACCATCCAGGAAGTCAGC
CTAAAACTGCTTGTATAGGGTGTACTGTAAACGTTGCACTATCATTTGTCTA
GTTTGTCTTTCAGAAAAAAGGCTTAGGCATTTACTATGGCAGGAAGAAGCGGA
GACAGCGACGAAGCGCTCTCCCAAGCAATTAAGATCATCAAGATCCTCTTACC
AAAGCAG

FIGURE 81

【 図 8 2 】

89/114

TatExon2_TV2_C_ZAopt (SEQ ID NO:111)

CCCTTGAGCCAGACCCGCGGCGACCCACCGGACGCGAGGAGAGCAAGAAG
AAGGTGGAGAGCAAGACCGCGCGGACCCCTTCGACTAG

FIGURE 82

【 図 7 6 】

83/114

RevExon1_TV2_C_ZAopt (SEQ ID NO:105)

ATGGCCCGGCGCAGCGCGCAGCGCAGGAGCCCTGCTCAGGCCATCAAG
ATCATCAAGATCCTGTACCAAGC

FIGURE 76

【 図 7 7 】

84/114

RevExon1_TV2_C_ZAwt (SEQ ID NO:106)

ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGCGCTCTCCAAGCAATAAAG
ATCATCAAGATCCTCTACCAAGCA

FIGURE 77

【 図 7 8 】

85/114

RevExon2_TV2_C_ZAopt (SEQ ID NO:107)

CCCTACCCCAAGCCGAGGGCACCCGCGAGGCCGCGCGCAACCGCGCGCGCC
GCTGGCGCGCCCGCCAGCAGCAGATCCACAGCATCAGCGAGCGCATCTCGGA
CACCTGCTGGCCCGCCCAACCAAGCCGCTGCCCTGCTGCTGCCCCCATCG
AGCCCTGACATCAACTGCAGCGAGAGCAGCGGCACCGGCACCCCAAGT
AGAGCCAGGGCACCGCCGAGGGCGTGGGCAACCCCTAA

FIGURE 78

【 図 8 3 】

90/114

TatExon2_TV2_C_ZAwt (SEQ ID NO:112)

CCCTTATCCCAAACCCGAGGGGACCCGACAGGCTCGGAGGAATCGAAGAA
AAGGTGGAGAGCAAGACAGCAGCAGATCCATTTCGATTAG

FIGURE 83

【 図 8 4 】

91/114

Vif_TV2_C_ZAopt (SEQ ID NO:113)

ATGGAGAACCGCTGGCAGGTGCTGATCGTGTGGCAGGTGGACCGCATGAAGA
TCCGCACCTGGCACAGCCTGGTGAAGCACCAACATGTACGTGAGCCGCGCGC
CGACCGCTGGTCTACCGCCACCACTACGAGAGCCGCCACCCCAAGGTGAGC
AGCGAGGTGCACATCCCCCTGGGCGAGCCCGCCTGGTGTATCAAGACCTACT
GGGGCTGCAGACCGGCGAGCGCGCTGGCACTGGGCCACGGCGTGAGCA
TCGAGTGGCGCCTGGCGCGCTACAGCACCAGGTGGACCCGACCTGACCGCA
CCAGCTGATCCACATGCACTACTTCGACTGCTTCGCCGAGAGCGCCATCCGC
~ AAGGCCATCCTGGGCCAGATCGTGAGCCCAAGTGCAGACTACCAGGCCGCGC
ACAACAAGGTGGGCAGCCTGCACTACCTGGCCCTGACCGCCCTGATCAAGCC
CAAGAAAGTCAAGCCCCCTGCCAGCGTGCAGCAAGCTGGTGGAGGACCGC
TGGAACAAGCCCGAGAAACCCGCGGCGCGCGGCAACACACCATGAAC
GGCCACTAG

FIGURE 84

【 図 8 5 】

92/114

Vif_TV2_C_ZAwt (SEQ ID NO:114)

ATGGA AACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAGGTAGACAGGATGAAG
ATTAGAACATGGCACAGTTTTAGTAAAGCACCATATGTATGTTTCGAGGAGAG
CTGATGGATGGTTCTACAGACATCATTATGAAAGCAGACACCCAAAAGTAAG
TTCAGAAGTACACATCCCATTAGGAGATGCCAGGTTAGTAATAAAAACATAT
TGGGGTCTGCAGACAGGAGAAAGAGCTTGGCATTTGGGTACGGAGTCTCCA
TAGAATGGAGATTGAGAAGATATAGCACACAAGTAGACCCGTGACCTGACAG
ACCAACTAATTCATATGCAATTATTTGATTGTTTGCAGAAATCTGCCATAAGG-
AAAGCCATACTAGGACAGATAGTTAGCCCTAAGTGTGACTATCAAGCAGGAC
ATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTTGGCACTGACAGCATTGATAAAACC
AAAAAAGATAAAGCCACCTCTGCCTAGTGTTAGGAAATTAGTAGAGGATAGA
TGGAAACAAGCCCCAGAAGACCAGGGGCCGAGAGGGAACCATACAATGAAT
GGACACTAG

FIGURE 85

【 図 8 6 】

93/114

Vpr_TV2_C_ZAopt (SEQ ID NO:115)

ATGGAGCAGGCCCCCGAGGACCAGGGCCCCAGCGCAGCCCTACAACGAG
TGGACCCCTGGAGCTGCTGGAGGAGCTGAAAGCAGGAGCCGTGCGCCACTTCC
CCCGCCCTGGCTGCACAACTTGGGCCAGCAGCATCTACGAGACCTACGGCGA
CACCTGGACCGCGGTGGAGGCCATCATCGCATCTCGCAGCAGCTGCTGTTCC
ATCCACTTCCGCATCGGCTGCCACCACAGCCGCATCGGCATCTCGGCCAGC
GCCGCGCCCGCAACGGCGCCAACCGCAGC

FIGURE 86

【 図 9 0 】

97/114

gp120mod.TV1.delV2 (SEQ ID NO:119)

1 gaattcatgc gcgtgatggg caccagaag aactgccagc agtgggtggat ctggggcacc
61 ctgggcttct ggaatgatgat gatctgaac accaggagac ttgggtgac cgtgtactac
121 ggctgcccgt ttgtggcgga cgccaagacc accctgttct gcgccagoga cgccaaggcc
181 tacgagaocg aggtgcacaa cgtgtggccc acccagcctt gcgtgcccac cgaccccaac
241 ccccaggaga tcgtgctggg caactgtgac gagaacttca acatgtggaa gaacgacatg
301 gcgcaccaga tgcacaggga cgtgatcagc ctgtgggaac agagctgaa gccctgcgtg
361 aagctgaacc cccgtgctgt gacctgaac tgcactgaca ccaactgtac cggcaacccg
421 accgtgaccc gcaacagcac caacaacacc aacggcacgc gcatctacaa calcgaggag
481 atgaagaact gcagcttcaa cgccggcgcc ggccgcctga tcaactgcaa caccagacc
541 atcaccaggc cctgccccaa ggtgagcttc gaccccatcc ccactcacta ctgcgcccc
601 gccgctacg ccactctgaa gtgcaacaa aagacttca acggcacccg cccctgtac
661 aacgtgagca ccgtgctagt caaccaaggc atcaagcccg ttgtgagcac ccagctgctg
721 ctgaacggca gccctggcca ggagggcact atcatccga gcgagaacct gaccgagaaac
781 accaagacca tcatctgcca cctgaacgag agcgtggaga tcaactgcaa cggcccaac
841 aacaacacc gcaagcagct gcgcacggc ccggccaggc ccttctacgc caacaagcac
901 gtgacggca acatcgcca ggcccactgc acatcagca ccgaccgtg gaacaagacc
961 ctgcagcagg tgaagaa gctggcgag cacttccca acagaacct caagttaag
1021 ccccacgccc ggccgacct ggagatcacc atgcacagct tcaactggcg cggcgagttc
1081 ttctactgca acaccagaa ccgttcaac agcaactacc acagaacaa cggccctac
1141 aagtacaacg gcaacagcag cagcccatcc accctgcagt gcaagatcaa gcaatcgtg
1201 cgcattgtgc agggcggtgg ccaggccacc tacgcccccc ccactgccgc caacatcacc
1261 tgcccgagca acatcaccgc catctgctg acccgcgagc ggctgttcaa caccacaac
1321 aacccgaga ccttccgcc cggcgcgccc gacatgcgc acaactggcg cagcgagctg
1381 tacaagtaca aggtggtgga gatcaagccc ctgggcatcg cccccacaa ggccaagcgc
1441 cgcgtgtgac agcgagaa gcgttaac gag

FIGURE 90

【 図 8 7 】

94/114

Vpr_TV2_C_ZAwt (SEQ ID NO:116)

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAGGGGCCGAGAGGGAACCATACAATGAA
TGGACACTAGAGCTTTTGAAGAAGCTCAAGCAGGAAAGCTGTACAGACACTTTC
CTAGAACCATGGCTCCATAAAGTAGGACAACATATCTATGAAACCTATGGAGA
TACTTGGACAGGAGTTGAAGCAATAATAAGAAATCCTGCAACAATTACTGTTT
ATTCAATTTTCAGGATTGGGTGCCATCATAGCAGAATAGGCATTTTTCGCACAGA
GAAGAGCAAGAAATGGAGCCAATAGATCC

FIGURE 87

【 図 8 8 】

95/114

Vpu_TV2_C_ZAopt (SEQ ID NO:117)

ATGCTGGACCTGACCGCCCGCATCGACAGCCGCTGGGCATCGGCGCCCTGA
TCGTGGCCCTGATCATCGCCATCATCGTGTGGACCATCGTGTACATCGAGTAC
CGAAAGCTGGTGCGCCAGCGCAAGATCGACTGGCTGGTGAAGCGCATCCGCG
AGCGCGCCGAGGACAGCGGCAACGAGAGCGAGGGCGACACCGGAGAGCTGA
GCACCTGTTGGACATGGGCCACCTGCGCCTGCTGGACGCCAACGACGTGTGA
A

FIGURE 88

【 図 8 9 】

96/114

Vpu_TV2_C_ZAwt (SEQ ID NO:118)

ATGTTAGATTTAAGTGAAGAATAGATTCTAGATTAGGAATAGGAGCATTGA
TAGTAGCCTAATCATAGCAATAAGTGTGGACCATAGTATATATAGAATA
TAGGAAATTTGTAAGGCAAGGAAATAGACTGGTGTAGTTAAAGGATTAG
GGAAAGAGCAGAAAGCAGTGGCAATGAGAGCGAGGGGGATACTGAAGAATT
ATCGACACTGGTGGATATGGGCCATCTTAGGCTTTTGGATGCTAATGATGTGT
AA

FIGURE 89

【 図 9 1 】

98/114

gp140mod.TV1.delV2 (SEQ ID NO:120)

1 gaattcatgc gcgtgatggg caccagaag aactgccagc agtgggtggat ctggggcacc
61 ctgggcttct ggaatgatgat gatctgaac accaggagacc ttgtgggtgac cgtgtactac
121 ggctgcccgt ttgtggcgga cgccaagacc accctgttct gcgccagoga cgccaaggcc
181 tacgagaocg aggtgcacaa cgtgtggccc acccagcctt gcgtgcccac cgaccccaac
241 ccccaggaga tcgtgctggg caactgtgac gagaacttca acatgtggaa gaacgacatg
301 gcgcaccaga tgcacaggga cgtgatcagc ctgtgggaac agagctgaa gccctgcgtg
361 aagctgaacc cccgtgctgt gacctgaac tgcactgaca ccaactgtac cggcaacccg
421 accgtgaccc gcaacagcac caacaacacc aacggcacgc gcatctacaa calcgaggag
481 atgaagaact gcagcttcaa cgccggcgcc ggccgcctga tcaactgcaa caccagacc
541 atcaccaggc cctgccccaa ggtgagcttc gaccccatcc ccactcacta ctgcgcccc
601 gccgctacg ccactctgaa gtgcaacaa aagacttca acggcacccg cccctgtac
661 aacgtgagca ccgtgctagt caaccaaggc atcaagcccg ttgtgagcac ccagctgctg
721 ctgaacggca gccctggcca ggagggcact atcatccga gcgagaacct gaccgagaaac
781 accaagacca tcatctgcca cctgaacgag agcgtggaga tcaactgcaa cggcccaac
841 aacaacacc gcaagcagct gcgcacggc ccggccaggc ccttctacgc caacaagcac
901 gtgacggca acatcgcca ggcccactgc acatcagca ccgaccgtg gaacaagacc
961 ctgcagcagg tgaagaa gctggcgag cacttccca acagaacct caagttaag
1021 ccccacgccc ggccgacct ggagatcacc atgcacagct tcaactggcg cggcgagttc
1081 ttctactgca acaccagaa ccgttcaac agcaactacc acagaacaa cggccctac
1141 aagtacaacg gcaacagcag cagcccatcc accctgcagt gcaagatcaa gcaatcgtg
1201 cgcattgtgc agggcggtgg ccaggccacc tacgcccccc ccactgccgc caacatcacc
1261 tgcccgagca acatcaccgc catctgctg acccgcgagc ggctgttcaa caccacaac
1321 aacccgaga ccttccgcc cggcgcgccc gacatgcgc acaactggcg cagcgagctg
1381 tacaagtaca aggtggtgga gatcaagccc ctgggcatcg cccccacaa ggccaagcgc
1441 cgcgtgtgac agcgagaa gcgttaac gag
1501 ggccgcccgc gcagcaccat gggcgccgc agcatcacc tgcactgga gggccgag
1561 ctgctgagcg gcatctgca gcaagagagc aactctgta aggcactga gggccagag
1621 cactgctgc agctgacgt gtgggcatc aagcagctgc aggcgcgtg gctgacatc
1681 gagcgtacc tgaaggacca gcagctgctg ggcactggg gctgcagcg ccgctgcatc
1741 tgcaccaacc cctgcccctg gaacagcagc tggagcaaca agagcgagaa ggcactctg
1801 gacaacatga cctggatgca gtgggaccgc gagatgaca actacacccg cctgactac
1861 aactctgtg aggcagacca gaaccagagc gagaagaacg agaaggacct gctggagctg
1921 gacaagtga acaactctg gaactggttc gacatcagca actggccctg gtacatctaa
1981 ctgag

FIGURE 91

【 図 9 2 】

99/114

gp140mod.TV1.mut7.delV2 (SEQ ID NO:121)

1 gaattcatgc gctgatggg caccagaag aactgccagc agtgggtgat ctggggcattc
 61 ctgggcttct ggaatgctat gatctgcaac accgaggacc tgggtgtgac cgtgtactac
 121 gggctgtccc tgggtggcga cgccaagacc accctgttct ggccagcaga cgccaaggcc
 181 tacgagaccg aggtgacaaa cgtgtgggccc acccagcctt cgtgtgccac cgacccaac
 241 cccaggagga tctgtctggg caactgtacc gagaacttca acatgtggaa gaacgacatg
 301 gccagaccga tgcacgagga cgtgtacgag ctgtgggacc agagcctgaa gccctgcgtg
 361 aagctgacc ccctgtgctg gacctgaaac tgcaccgaca ccaactgtac cggcaaccgc
 421 accgtgaccg gcaacagcac caacaacac aacggcaccg gcatctaca catcgaggag
 481 atgaagaact gcagcttcaa cgcgcggccc ggccgctga tcaactgaa caccagcacc
 541 atcaccagcg cctgccccaa ggtgagcttc gaccctatcc ccatctacta ctggccccc
 601 gccggtacg ccatctgaa gttgacaac aagactttca accgaccgg cccctgtctac
 661 aactgtgaga cctgtgcagt caccaccgg atcaagccc tgggtgagca ccagctgctg
 721 ctgaacggca gctgtggcga ggaggggcat atcatccga cggagaacct gaccgagaac
 781 acaagacca tcatctgca cctgaacag agcgtggaga tcaactgac cgcgcccaac
 841 acaacacccc gcaagacgct ggcgtcggc ccggccaggg cctttacgc caccacgac
 901 gttgatggca acatccgcca ggcccactgc aatctacga ccagccctg gaacaagacc
 961 ctgcagcagg tgaagaaga gttggggcag aacttccca ccaagacctt ccagttcaag
 1021 cccaccggcg gcgcgactc ggagataccc atgcacagct tcaactggcg cggcgagttc
 1081 ttctactgca acaccagcaa cctgttcaac agcactacc acagaacaa cggcaactac
 1141 aagtacaacg gcaacagcag cagccccat accctgcagt gcaagatcaa ggaatogtg
 1201 cgtatgtggc agggcggtgg ccaggccacc tacgcccccc ccatcgccgg caacatcac
 1261 ttgcgcagca acatcacgg cctctctgt acccgcgacg gggtgttcaa caccaccaac
 1321 aacaccgaga ccttcgccc cggcgggcgc gacatcgccg acaactggcg cagcgagctg
 1381 tacaagtaca aggtgtgtga gatcaagcc ctgggcatcg cccccacaa ggccatcagc
 1441 agcgtgtgtc agagcgagaa gacgcccgtt ggatcggcg ccgtgttctt gggcttctgt
 1501 ggccgcggcg gcagagacat gggcgccgc agatcacccc tgaactgtga gggccgcccag
 1561 ctgtcgtgag gcatctgtga gcagcagagc aactctgtga agccatgca ggcccagcag
 1621 cacatgtcgc agtgcacctt gtggggcgc agcagctgca agcgccgctg cgtggccatc
 1681 gacgctacc tgaaggacca gcagctgctg ggcacttggc gctgcagcg ccgctgtatc
 1741 tgcacaccgc ccgtgtccctg gaacgacgc tggagcaaca agagcgagaa ggaactctgg
 1801 gacaacatga cctgtgtgca gtgggacgc gatatgagca atlacaccg cctgatctac
 1861 aactctgtgc aggcagacca gaacacgag gcagagaacg agaagacct cgtgagctg
 1921 gacaagtga acaactgttg gaactgttgc gatcatgca actggccctg gtacatctaa
 1981 ctgcag

FIGURE 92

【 図 9 4 】

101/114

gp160mod.TV1.delV2 (SEQ ID NO:123)

1 gaattcatgc gctgatggg caccagaag aactgccagc agtgggtgat ctggggcattc
 61 ctgggcttct ggaatgctat gatctgcaac accgaggacc tgggtgtgac cgtgtactac
 121 gggctgtccc tgggtggcga cgccaagacc accctgttct ggccagcaga cgccaaggcc
 181 tacgagaccg aggtgacaaa cgtgtgggccc acccagcctt cgtgtgccac cgacccaac
 241 cccaggagga tctgtctggg caactgtacc gagaacttca acatgtggaa gaacgacatg
 301 gccagaccga tgcacgagga cgtgtacgag ctgtgggacc agagcctgaa gccctgcgtg
 361 aagctgacc ccctgtgctg gacctgaaac tgcaccgaca ccaactgtac cggcaaccgc
 421 accgtgaccg gcaacagcac caacaacac aacggcaccg gcatctaca catcgaggag
 481 atgaagaact gcagcttcaa cgcgcggccc ggccgctga tcaactgaa caccagcacc
 541 atcaccagcg cctgccccaa ggtgagcttc gaccctatcc ccatctacta ctggccccc
 601 gccggtacg ccatctgaa gttgacaac aagactttca accgaccgg cccctgtctac
 661 aactgtgaga cctgtgcagt caccaccgg atcaagccc tgggtgagca ccagctgctg
 721 ctgaacggca gctgtggcga ggaggggcat atcatccga cggagaacct gaccgagaac
 781 acaagacca tcatctgca cctgaacag agcgtggaga tcaactgac cgcgcccaac
 841 acaacacccc gcaagacgct ggcgtcggc ccggccaggg cctttacgc caccacgac
 901 gttgatggca acatccgcca ggcccactgc aatctacga ccagccctg gaacaagacc
 961 ctgcagcagg tgaagaaga gttggggcag cacttccca ccaagacctt ccagttcaag
 1021 cccaccggcg gcgcgactc ggagataccc atgcacagct tcaactggcg cggcgagttc
 1081 ttctactgca acaccagcaa cctgttcaac agcactacc acagaacaa cggcaactac
 1141 aagtacaacg gcaacagcag cagccccat accctgcagt gcaagatcaa ggaatogtg
 1201 cgtatgtggc agggcggtgg ccaggccacc tacgcccccc ccatcgccgg caacatcac
 1261 ttgcgcagca acatcacgg cctctctgt acccgcgacg gggtgttcaa caccaccaac
 1321 aacaccgaga ccttcgccc cggcgggcgc gacatcgccg acaactggcg cagcgagctg
 1381 tacaagtaca aggtgtgtga gatcaagccc ctgggcatcg cccccacaa ggccatcagc
 1441 cgtgtgtgtc agcgcgagaa gacgcccgtt ggatcggcg ccgtgttctt gggcttctgt
 1501 ggccgcggcg gcagacacat gggcgccgc agcatcaccc tgaactgtga ggcccggcag
 1561 ctgtcgtgag gcatctgtga gcagcagagc aactctgtga agccatgca ggcccagcag
 1621 cacatgtcgc agtgcacctt gtggggcgc agcagctgca agcgccgctg cgtggccatc
 1681 gacgctacc tgaaggacca gcagctgctg ggcacttggc gctgcagcg ccgctgtatc
 1741 tgcacaccgc ccgtgtccctg gaacgacgc tggagcaaca agagcgagaa ggaactctgg
 1801 gacaacatga cctgtgtgca gtgggacgc gatatgagca atlacaccg cctgatctac
 1861 aactctgtgc aggcagacca gaacacgag gcagagaacg agaagacct cgtgagctg
 1921 gacaagtga acaactgttg gaactgttgc gatcatgca actggccctg gtacatcaag
 1981 atcttcatca tgaatgtgg cggctgtatc ggccgtgca tcatcttgc cgtgtgagc
 2041 atctgtgacc cgtgtgacca gggctacagc cccctgagct tccagacctt gaccocagc
 2101 ccccgccggc tggaccgctt gggcgggcat gaggaggagg ggccgagca ggaaccgagc
 2161 cgcagcatcc gctgtgtgag gggcttctgt agcctgtctt ggaagacctt ggaactctg
 2221 tgcctgttca gctacaccg cctgcgcgac ttcatctga tgcgtgtgc cgcctgtgag
 2281 ctgtgtggcc acagacgctt ggcgggctg cagcgccgct cagcgccgctt ggaagacctt ggaactctg
 2341 ggcagcctgg tgcagtactg ggcctgtgag ctgaagaaga ggcgcacag cctgtgtgac
 2401 acatcgcca tcaactgtgc cggggccacc gaccatctca tgcagtgtt ggcagcctac
 2461 ttgcgcgcca tctgaacct ccccgccgc atcccgaggc gcttcgagc cgcctgtctg
 2521 taactcgag

FIGURE 94

【 図 9 3 】

100/114

gp160mod.TV1.delV1V2 (SEQ ID NO:122)

1 gaattcatgc gctgatggg caccagaag aactgccagc agtgggtgat ctggggcattc
 61 ctgggcttct ggaatgctat gatctgcaac accgaggacc tgggtgtgac cgtgtactac
 121 gggctgtccc tgggtggcga cgccaagacc accctgttct ggccagcaga cgccaaggcc
 181 tacgagaccg aggtgacaaa cgtgtgggccc acccagcctt cgtgtgccac cgacccaac
 241 cccaggagga tctgtctggg caactgtacc gagaacttca acatgtggaa gaacgacatg
 301 gccagaccga tgcacgagga cgtgtacgag ctgtgggacc agagcctgaa gccctgcgtg
 361 aagctgacc ccctgtgctg gggcgccgac aactgcaaca ccagacacct caccagcgcc
 421 tggcccaagg tgaacttga cccatccc atccactact ggcgcgcgc cggctagccc
 481 atctgaagt gcaacaaca aacttcaac ggcaccggcg cctgttaca catgagcacc
 541 gtgactgtca cccaccgcat caagcccggt gttgagcccc agctgtctgt gaacggcagc
 601 ctggccgagg agggcatcat catcgcgagc gagaacctga ccgagaacac caagaccatc
 661 atcgtgcacc tgaacgagag cgttgagatc aactgcacc cccccaacaa caacaccgc
 721 aagagcgtgc gcatcgccc cggccaggcc ttctacgca ccaacgactt gatcggaac
 781 atccgcccag cccactgcaa catcgaccac gaccctgga acaagacctt gcagcaggtg
 841 atgaagaagc tggcgagaga cttcccaac aagaccatcc agttcaagc ccacgcccgc
 901 ggcgacctgc agatcaccat gcacagcttc aactgcccgc ggcagttctt ctactgaac
 961 accagcaacc tgttcaacg cacttaccac agcaacaac ggcagcttca caactgagc
 1021 aacagcaga gcccctaac cctgcagtcg aagatcaac agatctgtgc catgtggcag
 1081 gggctgggccc agggccaacta cgcgcgcgc ategccggca acatcactgt ccgagcaac
 1141 atcaccggca tctgtctgac ccggcagcgc ggtcttcaac ccaacacaa caccagagac
 1201 ttccgcccgc ggccggcgga catcgcgagc aactggcgca gogactgtga caagtacag
 1261 gtgtgtggga tcaagcccc gggcatcgcc ccaaccaagg ccaagcgccg cgtgtgtgag
 1321 cgcgagaagc ggcgctgtgg catcgccgoc gtgttctgtg gcttctgtgg cgcgcgcgc
 1381 agcaccatgc ggcgcgcgag catcaccctg accgttcagg ccgcgagctt cgtgagcggc
 1441 atgtgtgagc agcagagcaa cctgtgaag gcatctgagg cccagcagca catgtctgag
 1501 ctgacctgtt ggggcatcaa gcagctgag ccgcgcgtgc ttggcactga cgtctactgt
 1561 aagcaccagc agctgtggc catctgggct tgcagcgccc ggcgtgtctt caccaccgc
 1621 gtgcccgtga acagcagctg gacgaacag agcgagaagg acatctgga caactgagc
 1681 tggatgactt gggaccgga gatcagcaac tacaccggcc tgaactaca cctgtgtgag
 1741 gacagccaga accagcaga gaagaacag aaggacctgc tggagctgga caagtggaa
 1801 aactgttga actgttga catcagaac ttgcccctgt acataaagt cttaactat
 1861 atctgtggcg gctgtatgc cctgcgcat atcttgcgc tctgagcat cgtgagcag
 1921 gtgcccagc gctacagccc cctgagctt cagaccctga cccacgccc cgcgcgctg
 1981 gaccgctgg cggcgcatga ggaaggggc ggccagcagg acccgagcc cagatccgc
 2041 ctgtgtgagc gcttctgtg cctgcgctgg gacgacctg gcaactgtg cctgtcagc
 2101 taccaccgccc tgcgcgactt catctgtat cgcgtgcgcc cctgtgagct cgtggccac
 2161 agcagcctgc ggcgctgca ggcgcgctgg agatctgga agtactggg cagcctgtg
 2221 cagtactggg cctgtgagct gaagaagag gccatcagcc tctgtgacac catgcccac
 2281 accgtggccc agggcaccga ccgcatcac gactgtgtgc agcgtatgt ccgcgcac
 2341 ctgaacatcc cccgcgcat ccgcagggc ttgagggcg cctgtgtga actgag

FIGURE 93

【 図 9 5 】

102/114

gp160mod.TV1.mut7.delV2 (SEQ ID NO:124)

1 gaattcatgc gctgatggg caccagaag aactgccagc agtgggtgat ctggggcattc
 61 ctgggcttct ggaatgctat gatctgcaac accgaggacc tgggtgtgac cgtgtactac
 121 gggctgtccc tgggtggcga cgccaagacc accctgttct ggccagcaga cgccaaggcc
 181 tacgagaccg aggtgacaaa cgtgtgggccc acccagcctt cgtgtgccac cgacccaac
 241 cccaggagga tctgtctggg caactgtacc gagaacttca acatgtggaa gaacgacatg
 301 gccagaccga tgcacgagga cgtgtacgag ctgtgggacc agagcctgaa gccctgcgtg
 361 aagctgacc ccctgtgctg gacctgaaac tgcaccgaca ccaactgtac cggcaaccgc
 421 accgtgaccg gcaacagcac caacaacac aacggcaccg gcatctaca catcgaggag
 481 atgaagaact gcagcttcaa cgcgcggccc ggccgctga tcaactgaa caccagcacc
 541 atcaccagcg cctgccccaa ggtgagcttc gaccctatcc ccatctacta ctggccccc
 601 gccggtacg ccatctgaa gttgacaac aagactttca accgaccgg cccctgtctac
 661 aactgtgaga cctgtgcagt caccaccgg atcaagccc tgggtgagca ccagctgctg
 721 ctgaacggca gctgtggcga ggaggggcat atcatccga cggagaacct gaccgagaac
 781 acaagacca tcatctgca cctgaacag agcgtggaga tcaactgac cgcgcccaac
 841 acaacacccc gcaagacgct ggcgtcggc ccggccaggg cctttacgc caccacgac
 901 gttgatggca acatccgcca ggcccactgc aatctacga ccagccctg gaacaagacc
 961 ctgcagcagg tgaagaaga gttggggcag cacttccca ccaagacctt ccagttcaag
 1021 cccaccggcg ggcggacctt ggagatcac atgcacagct tcaactggcg cggcgagttc
 1081 ttctactgca acaccagcaa cctgttcaac agcactacc acagaacaa cggcaactac
 1141 aagtacaacg gcaacagcag cagccccat accctgcagt gcaagatcaa ggaatogtg
 1201 cgtatgtggc agggcggtgg ccaggccacc tacgcccccc ccatcgccgg caacatcac
 1261 ttgcgcagca acatcacgg cctctctgt acccgcgagc gggtgttcaa caccaccaac
 1321 aacaccgaga ccttcgccc cggcgggcgc gacatcgccg acaactggcg cagcgagctg
 1381 tacaagtaca aggtgtgtga gatcaagccc ctgggcatcg cccccacaa ggccatcagc
 1441 agcgtgtgtc agagcgagaa gacgcccgtt ggatcggcg ccgtgttctt gggcttctgt
 1501 ggccgcggcg gcagacacat gggcgccgc agcatcaccc tgaactgtga ggcccggcag
 1561 ctgtcgtgag gcatctgtga gcagcagagc aactctgtga agccatgca ggcccagcag
 1621 cacatgtcgc agtgcacctt gtggggcgc agcagctgca agcgccgctg cgtggccatc
 1681 gacgctacc tgaaggacca gcagctgctg ggcacttggc gctgcagcg ccgctgtatc
 1741 tgcacaccgc ccgtgtccctg gaacgacgc tggagcaaca agagcgagaa ggaactctgg
 1801 gacaacatga cctgtgtgca gtgggacgc gatatgagca atlacaccg cctgatctac
 1861 aactctgtgc aggcagacca gaacacgag gcagagaacg agaagacct cgtgagctg
 1921 gacaagtga acaactgttg gaactgttgc gatcatgca actggccctg gtacatcaag
 1981 atcttcatca tgaatgtgg cggctgtatc ggccgtgca tcatcttgc cgtgtgagc
 2041 atctgtgacc cgtgtgacca gggctacagc cccctgagct tccagacctt gaccocagc
 2101 ccccgccggc tggaccgctt gggcgggcat gaggaggagg ggccgagca ggaaccgagc
 2161 cgcagcatcc gctgtgtgag gggcttctgt agcctgtctt ggaagacctt ggaactctg
 2221 tgcctgttca gctacaccg cctgcgcgac ttcatctga tgcgtgtgc cgcctgtgag
 2281 ctgtgtggcc acagacgctt ggcgggctg cagcgccgct cagcgccgctt ggaagacctt ggaactctg
 2341 ggcagcctgg tgcagtactg ggcctgtgag ctgaagaaga ggcgcacag cctgtgtgac
 2401 acatcgcca tcaactgtgc cggggccacc gaccatctca tgcagtgtt ggcagcctac
 2461 ttgcgcgcca tctgaacct ccccgccgc atcccgaggc gcttcgagc cgcctgtctg
 2521 taactcgag

FIGURE 95

【図 9 6】

103/114

gp160mod.TV1.tpa1 (SEQ ID NO:125)

1 gtcagcgca ccatggtatc aatgaagaa gggctctgt gttgtctgt gttgtgtgga
 61 gcagcttttg ttgcccagc gcgcagacc gaggactgt ggggtgacct gttactaggg
 121 gtgcccgtgt gtgcccagc gcgcagacc cgtgtctgt ccagcgacc caagcctac
 181 gagaccgag tgcacaact gtgcccagc cagcgtctgt tgcaccaga cccaacccc
 241 caggagatgc tctgtggcaa cgtgacgag aatttcaaa tggtaagaa cgactgtgc
 301 gaccagatgc acgaggacct gatcagctg tgggacaga gctgaagoc ctgctgtgag
 361 ctgaccccc ttgtgtgac cgtgaactgc accgacaca acgtgacccg caaccgacc
 421 gtgaccggca acagaccac caacacac ggcacggca ttataacat cgaggagatg
 481 aagaactgca gcttaacgc caccacgag ctgcccagca agaaacaca ggtatgagcc
 541 ctgtttacc gctggacat cgtgcccgt aacgagaac gcacaactt cactacgc
 601 ctgatcaat gcaacaccg caccatcac caggctcgc ccaaggtgag cttagacccc
 661 atccccatcc actactgag ccccgcggc taagcatcc tgaagtga caacaagcc
 721 ttacacggca cggcccctgt ctacacgtg agcacgtgc agtgcacca cggctcaag
 781 cccgtgtgga gcaocacgt gctgtgaac ggcacgtgc ccagggagg calcatcac
 841 cgcagcgaga acctgacga gaacacaag accatcatg tgcactlga cgagagctg
 901 gagatcaat gcaocggcc caacaacac acccgcaaga gctgtgcat cggcccggc
 961 caggctttct agccaccaa cgaagtgtg ggcacaact gccacgcca ctgcaact
 1021 agaccagacc gctggaacaa cagcctgag caggtgatga agagctggg cgagcaact
 1081 cccaacaga ccatcagtt caagccccc gcccggcgg accgtggat caccatgca
 1141 agcttcaat gcccgggga gttcttcat tgcacaca gcaactgtt caacgacc
 1201 taccacaga acaacggcc ctacaaagt aacggcaaca gcagcagccc catcacctg
 1261 cagtgaaga taaagcagt cgtgctcatg tggcaggcg tggcgacgg cactacgcc
 1321 ccccctatc ccggcaact cactcgcgc agcacaatca cggctatct gctgacccc
 1381 gaggcggtt tcaacacac caacaacac gagactctc gcccggcgg cggcgacatg
 1441 cgcagcaat gggcgagga gctgtacaag taacaggtg tggatgcaa gcccgtggc
 1501 atgcccacca ccaagccaa gcgcgcgtg gtgcagcgc agaagcgcg cgtggcgac
 1561 gggcgctgt tctgtggtt cttgtggcc gcgcagaga ccatggcgcc cggcagcat
 1621 acctgacgc tgcagccgc cagctgtgt agcggcatg tgcagcaga gagaacatg
 1681 ctgaagcca tgcagccca gcagacatg ctgcagctga cctgtgggg catcaagcag
 1741 ctgagggccc cgtgtgtgc catgagcgc tacttgaagg accagcagct gctgggcat
 1801 tggcgctgca gggcgccgt gatctgacc accgcgtgc cctggcaag cagctgagc
 1861 aacaagagc agaagagat ctgggaacac atgactgga tgcagtggga ccgcagatc
 1921 agcaactaca ccgctgtat ctacacgtg ctggaggaac gccagaaca caggagaag
 1981 aacgagaagg acctgtgga gctgacaag tgaacaac tttggaact gttgacatc
 2041 agcaactgc cctgttcat caagatttc atcatgatg tggcgccct gatgcgtg
 2101 cgtatcatct tgcgctgtg gatcactgt aacgcgtgc ggcagggta cagccccc
 2161 agcttcaga cctgaagcc cagccccc ggcctggagc gctggcgcc catgagag
 2221 gaggcgccg agcaggacc gcagcagc atcgcgtg tgcagcgtt cttgagctg
 2281 gctgggagc acctgcgaca cctgtgtgt ttacactac acccctgcgc cgtactac
 2341 ctatgcgcg tgcgcgcgt ggaagtgtg ggcacagca gctgcgcgc cctgagcgc
 2401 tggcgggaga tctgaagta cctggcagc cgtgtgcat actggggct ggaagtgaag
 2461 aagagcgca tcaactgtg ggcacacat gccatcacg tggcgaggg caccagccc
 2521 atcatgagc tgggtgagc catctgcgc gcatctga acatccccg cgcctgcg
 2581 caggcttgc agggcgccct gctgtactc gag

FIGURE 96

【図 9 8】

105/114

1 taattatga gattgatgg gacacaga aattgtcaac aattgtggt atggggcalt
 61 ttaggcttct ggaatgtaat gattgttaac accgagacc ttgggtgac cgtgtactc
 121 ggcgtgccc gtgtgcccga cgcgaagacc accctgtct ggcggacga gcgcaaggcc
 181 tacgagacc aggtgcacaa cgtgtggccc acccagcgt ggtgtggcca cgcacccaac
 241 cccagagaga tctgtgctgg caagtgtacc gagaacttca acatgtgga gaacgacatg
 301 gccagacaga tgcagagga cgtgtacgac ctgtgggacc agagcctgaa gcoctgtgtg
 361 aagctgacc cctgtgctg gacctgaac tgcacgaca ccaactgtgac cgcgaacgc
 421 accgtgacc gcaacgac caacaacac aacgcacgc gcatctaca catcgaggag
 481 atgaagaact gcagcttcaa cgcacacac cgtgtgctg acaagaaga caaggatgac
 541 gccctgttct accgcttga catctgccc ctgacaga acagcgaca cticactac
 601 cgcctgatca actgcaaac cagcaacac acccagcgt ccccacagt gaggctgac
 661 cccatccca tccactact gcgcgcgc ggttaagca tctgaagt caacaacag
 721 accttcaag gcaacggccc ctgtacaac gtgacagcc tgcagtgaac ccagggcatc
 781 aagccgtgg tgcagaccca cgtgtctgt accgcaacc tggcgaggga gggcatcac
 841 atccgcagc agaacttgc cgaagacac aagaccatca tctgtacat gaacgagagc
 901 gtggagatca actgacccc cccaacac aacacgaca agagcgtgac caagccccc
 961 ggcagggcct tctacgccc caagcagct atggcaca tcccgacgg ccatgtcaac
 1021 atcagacgc accgctgga caagaccct cagcagctga tgaagaagct gggcgagac
 1081 ttcccaca agacatcca gttaacccc cagcgcgc ggcacttga gatcacatg
 1141 cacagttca actgcgcgc cgaatttct tactgaaca ccagaacat gttaacaga
 1201 acctaccaca gcaacagcg cactacaag taacaggca acagcagc cccatcac
 1261 ctgcagtga agatacaga gatctgccc atgtggcag gctgtggcca ggcacactc
 1321 gcccgcacca tgcgcggca catcacctg cgcagcaaca tcaacggcat cctgtgacc
 1381 cgcagcgcc gcttcaaac caacaacac accgagact tccgcgcgc cggcgggcag
 1441 atgcgcgaca actgcccgc cgaactgtac aatgaacgg ttgtgagat caagccctg
 1501 ggcacgccc ccacaagcg caagcgcgc gtgtgtgac gcgagaagc cgcctgtggc
 1561 atcggcgcc gtgtctggc cttctggcc ggcgcggca gcaacatgg cgcgcgacg
 1621 ataccctga cctgtgagc cgcgcagctg ctgacggca tctgtgaca gcagagcaac
 1681 ctgtgaagg ccatcgagc ccagcagca atgtctgac tgcactgtg gggcatcaag
 1741 cagctgagc cccgcgtgt ggcactag cgtactgga agcagcaga gctgtggc
 1801 atctgggct gcagcgccc cgtactgct accacggcg tggcctgga cagcagctg
 1861 agcaacaga gcgaagga catctggac aactgaact ggtatgag ggcacggag
 1921 atcagaact acccgccct gatctaca cgtgtgag acagcgaga ccagcaggag
 1981 aagaacaga aggaactgt ggaactgga agtgaaca acctgtgga ctgttgac
 2041 atcagaact ggccttga catcaagat ttactatga tctgtggcg cctgtgagc
 2101 ctgcatcata tctgtgct gctgagct gtaacagc tgcgcagcg ctacagccc
 2161 ctgacttcc agacttgc cccacccc cgcgcggc accgctgg cggcatgag
 2221 gaggaggcg gcgagaga cgcgcagc atgtctgac agcatcgc tggctgagc cttctgag
 2281 ctgctggcg acgactgac caactgtg ctgtactgt accacgct ggcgacttc
 2341 atctgtgct cgtgtgccc cgtgagctg ctggcgaca gcagcagc cgcgtgag
 2401 cgcgtggcg agactgtga atctggag acctgtgtc agtactgg cttggagctg
 2461 aagaagagc ccatcagct gctgaacac atgcacata cgtgtggca gggcagcag
 2521 cgtactgag agctgtgca ggcactgc cgcgcctac tgaacatcc cgcgcgcat
 2581 cgcagggct tgcagcgcc cctgtgtga ctagag

FIGURE 98

【図 9 7】

104/114

1 gaattatgc gctgtatgg caccagaag aactgcagc agtgggtgat ctggggcalt
 61 ctggcttct ggaatgctat gatctgaac accgagacc ttgggtgac cgtgtactc
 121 ggcgtgccc gtgtgcccga cgcgaagacc accctgtct ggcgcgaca gcccaaggcc
 181 tacgagacc aggtgcacaa cgtgtggcc acccagcgt gctgtggcca cgcacccaac
 241 cccagagaga tctgtgctgg caactgtgac gagaacttca acatgtgga gaacgacatg
 301 gcgacagga tgcagagga cgtgtacgc ctgtgggac agagcgtgaa gcoctgtgtg
 361 aagctgaacc cctgtgtgt gacctgaac tgcacgaca ccaactgac cgcgaacgc
 421 accgtgacg gcaacagca caacaacac aacggcagc gcatctaca catcgaggag
 481 atgaagaact gcagcttcaa cgcgaacac agctgccc acagaagca caaggatgac
 541 gccctgttct accgcttga catctgccc ctgaagaga acagcgaca cticactac
 601 cgcctgatca actgaacac cagcaccac acccagcgt gcccaaggt gactgtgac
 661 cccatccca tccactact gcgcgcgc ggtacgca tctgaagt caacaacag
 721 accttcaag gcaacggccc ctgtacaac gtgacagc tgcagtgaac ccagggcatc
 781 aagcgcgtg tgcagacca gctgtgtgt aacgcagcc tggcgagga gggcatcac
 841 atcgcagcg agaactgac cgaagaac acagcatca tctgtacat gaacgagagc
 901 gtggagatca actgacccc cccaacac acacccgca agagcgtgct catcgcccc
 961 gggcagcct tctacgccc caacgagct atcgcaca tccgcaggg cactgtcaac
 1021 atcagacgc accgttga caagacccc cagcaggtga tgaagaagt gggcgagac
 1081 ttcccaca agacatca gttaacccc cagcgcgc ggcacttga gatcacatg
 1141 cacagttca actgcgcgc cgaatttct tactgaaca ccagaact gttaacaga
 1201 acctaccaca gcaacagcg cacttacaag taacaggca acagcagc cccatcac
 1261 ctgcagtga agatacaga gatctgccc atgtggcag gctgtggcca gccacactc
 1321 gcccgcacca tgcgcggca catcacctg cgcagaca tcaacggcat cctgtgacc
 1381 cgcgagcgc gcttcaaac cacaacac accgagact tccgcgcgc cgcgcggcag
 1441 atcgcgaca actgcccag cgaactgac agtgaaggt ttgtggagat caagcccc
 1501 ggcactgccc ccacaagcg caagcgcgc ggtgtgagc gcgagaagc cgcctgtggc
 1561 atcgcgcgc tttctgtgg cttctgggc ggcgcgga gcaactgg cgcgcgacg
 1621 ataccccta cgtgtgagc cgcgcagctg ctgagcgga tctgtgaga gcagagcaac
 1681 ctgtgaagg ccatgagcg ccagcagca atgtgagc tgcagctgt gggcatcaag
 1741 cagctgagc cccgcgtgt ggcactag cgtactgga agcagcaga cgtgtggc
 1801 atctgggct gcagcgccc cgtgtgct accacgccc ggcctgga cagcagctg
 1861 agcaacaga gcgagaaga catctggac aactgact ggtgtgag ggcagcgag
 1921 atcagaact acccgccct gatctaac cgtgtggag acagcgaga ccagcagag
 1981 aagaacaga agcactgct ggaactgga aagtgaaca acctgtgga cgtgtgac
 2041 atcagaact ggccttga catcaagc ttactatga tttactgag cgtgtggc cgtactgc
 2101 ctgcatcata tctgtgct gctgagac gtgaacgc tgcgcagcg ctacagccc
 2161 ctgacttcc agacttgc cccacccc cgcgcgag accgtgtgt agtactgg cttggagctg
 2221 gaggaggcg gcgagaga cgcgcagc agcatccc tggtagcg cttctgag
 2281 ctgctggcg accagctgc caactgtg cttgtact accacgct ggcgacttc
 2341 atctgtagc cgtgtgccc cgtgtgag ctgcccga gcagcgtg cgcctgag
 2401 cgcgcgtgg agactgga gtactggc agcctgtgt agtactgg cttggagctg
 2461 aagaagagc ccatcagct gctgacac atgcacata cgtgtggca ggcagcagc
 2521 cgtactgag agctgtgca ggcactgc cgcgcctac tgaacatcc cgcgcgcat
 2581 cgcagggct tgcagcgcc cctgtgtga ctagag

FIGURE 97

【図 9 9】

106/114

1 atgagagtga tggggacaca gaagaattgt caacaattgt ggaatggg catctaggc
 61 ttttgatgc taatgattt taacaggag cactgtgg tcaagctla ctatgggta
 121 cctgtgtgga gacagcaaa aactactta tctgtgat cagatgta agcatatg
 181 acagaatgct ataattgtg gctacacat gctgtgtac ccacagacc caaccacaa
 241 gaataattt tgggaattgt aacaaaaa tttaattgt ggaataatg catggagat
 301 cagatgcatg aggatgtaat cagttatg gatcaagcc taaagccatg tgaataattg
 361 acccactct gtgtacttt aaacttga gatacaatg ttacagtgaa taagaattgt
 421 acaggtata gtacaaataa tacaattgt acagatttt ataacttga agaataatg
 481 aattgtctt tcaatgcaac cagaataa agagataaga aactaaga gtgtacttc
 541 tttatgac ttgatagt accatlaa gagaatggt acaatttca atatgata
 601 ataattga atacttca cacaacaa gctgtoca aggtcttt taccgcgt
 661 cctacatt actgtctcc agctgttt gogatttca agtgaataa taagacttc
 721 aatggagac gacattgta taattgac acagtacat gtacacatg aatgaagca
 781 gtgtatca ctaattact gttaaattg agttagac aagaaggat aatattga
 841 tctgaattt tgaacagaa tacaacaa ataattgac acctatga actgtgag
 901 ataatgta caagaccaa caataata agaaaaagt taagtatg accagacaa
 961 gacttctgt caacaatga tgaataga aactaaga aagcactg tcaattgt
 1021 acagatagt ggaacaaa tttaacag gtaatgaat aattgaga gcaatttct
 1081 aataaaca tacaattta accatgca ggggggac tagaattac aatgtagc
 1141 ttaattgt gaggagaat ttctattgt aatacata acctgttca tagacatc
 1201 cacttata atgttata caatacat ggtatttca gctacatc cactatca
 1261 tgaataata acaaatgt accatggt caagggtag gacaagca gttgcccc
 1321 ccatgtgac gaacataac atgtatga aactacag gaatactt gaacgtgat
 1381 gaggattta acacacaa caacagag acattcag ctggaggag agatagag
 1441 gataactga gaagtgaat atataat ataatgtag aaataagc atgtgga
 1501 gaccacta aggcacaaa agagtgtgt cagagaaa aagagcgt ggaatagga
 1561 gctgttct tgggttct gggagcga ggaacata tggcgagc gttcaatag
 1621 ctgacgtac aggcagaca actgtgtct ggtatgag caacgaa caattgtg
 1681 aagctatag aggcgaca gcatattgt caatcac tctgggag taagcactc
 1741 cagcgagag tctgtgct atgaagata ctaaggat acagctct aggtattg
 1801 gctgtctg gaagactat ctgacact cgtgtgct ggaactcag ttgagat
 1861 aacttgaa agatattg ggaataag acttgatg acttgagat agaatgt
 1921 aattacag gcttaata caattgtt gaagactgc aaaaacaga ggaagaat
 1981 gaaaagatt tattgaatt ggaacagt acaactgt ggaattgt tgaatata
 2041 aactggcgt ggtatata aattatca atgattag gaggctgt aggttga
 2101 ataatgtt cgtgttct tatgtatg agattgag aggtatgc actgttgc
 2161 ttacagac ttacocag cgcagggga ctgacagc tggagaa cgaagaaga
 2221 ggtggagag aagacagag catatgct cgtattgta gctgtgta gctgtgct
 2281 tgggagat tgcgaact gtccttct agctacac gcttgaga cttaata
 2341 attgagta gggcagtg acttggga cagcagtc tcaaggat acagagggg
 2401 tgggaatcc ttatgtct ggaagctt gtaacat agtactgg cgtgtgta gtaaaaa
 2461 agtcttata gctgtgta taccatga atacagat ctgaagac agataggt
 2521 atagaattg tacaagaat tttagact atcttcaac taccatag aatgaagac
 2581 ggtttgag cagcttgt ataa

FIGURE 99

【図 1 0 0】

107/114

gp140mod.TV1.tpal (SEQ ID NO:131)

1 atggtgcaaa tgaagagagg gctgtgtgt gttgtgtgtc tttgttgagg agtcttctt
61 tgcgccagcg ccagacacga ggaactgttg gtgacctgtt actacggcgt gccctgttgg
121 cgcgaagcca agaccacct gttctgtcgc agcgacgcca aggcctacga gaccaggttg
181 cacaacgtgt ggcgcaccca cgcctgtgtg cccacgagcc ccaaccccca ggaagtgtgt
241 ctgggcaacg tgcagagaaa cttcaacatg tgaagaacg acatggccga ccagatgcac
301 gaggacgtga tcaagctgtg ggaacagago ctgaagccct gctgaagct gaccoccttg
361 tgcgtgaccg tgaactgcac cgacaccaac gtgaccggga accgacogt gaccggcaac
421 agcaaccaac acaccaacgg caccggcatc tacaacatcg aggaatgaaa gaactgcagg
481 ttaacgcca ccaccagctg gcgcgaacag aagcaaacgg agtagccctt gttctacggc
541 ctggacatcg tgcctctgaa cgagaacago gaaacttca cttaccgctt gatcaactgc
601 aacaccagca ccatcaccga ggcctgcccc aagtgagctg tgaacccat cccatccac
661 tactgcgcc ccgcgcgcta gccatctctg aagtgaaca acaagacctt caacggcacc
721 ggcctctgt acaactgtg caccgtgcag tgcacccagc gcatcaagoc cgtgtgtgagc
781 acccagctgc tctgaacgg cagcctggcg gagtagggga tcatctccg cagcgagaac
841 ctgaccgaga acaccaagac catcatgtgc cactgaaoc agagctgtga gatcaactgc
901 accgcgccca acacaacac ccgaacagc gtgcgcatcg gccccggcca ggcctttac
961 gccaccaacg acgtgatggc caacatccc caggccactt gcaactcag caccgaccgc
1021 tggaaacaga ccttgcagca ggtgatgaag aagctggggc agcacttccc caacaagacc
1081 atccagtcca agcccacgc cggcgggcag ctggagatca ccatgcacag cttaactgc
1141 cgcggcgagt tctttactg caacacago aactgttcca acagaccca ccacagcaac
1201 aacggcactt acaagtcca cggcaacgc agcagcccca tcaacctgca gtgaagatc
1261 aagcagatcg tgcgtgtgtg gcaggcggtg ggcacggcca cctacgccc cccatcgcc
1321 ggcaacatca cctgcagcag caactaccc cagctatcgc tgaacggga cggcggttcc
1381 aacacaccca acacaccca gactctccg cccggggggc ggcagatcg gcacaactgg
1441 cgcagcgagc tglacaagta caagttgtg gatgacaag ccttgggcat cgcgccacac
1501 aaggccaagc gccgctgtgt gtacggcgag aagcgcgccg tggggatcgg cgcctgttcc
1561 ctgggcttcc tggcgcgccg cggcagcacc atggcgcgcg ccagcatcgc ctgacctgtg
1621 caggcccgcc agtctgtgag cggcatcgtg cagcagcaga gcaacctgct gaagccatc
1681 gagcccgacc agcaatgtg gcaatgacc gtgtggggca tcaacagct gcaagcccgcc
1741 gtgtgtgcca tgaagcgata cctgaaggac cagcagctgc tggcgatctg ggcctgcagc
1801 gccgcgctga ttcgacacac ccgcctgccc tggaaacgca gctggagcga caagagcgag
1861 aaggacatct gggacaacat gactgtgat cgttgggacc agacctgaa gccctgtgtg
1921 ggcctgatct acaactgct ggaagcagc cagaacacgc aggaagaaga cgagaaggac
1981 ctgtgtgagc tggacaatgt gaacaacctg tgaactgtt togacatcag caactggccc
2041 tggatcatct aa

FIGURE 100

【図 1 0 2】

109/114

gp140mod.TV1.wiNative (SEQ ID NO:133)

1 gaattcatga gattgatggg gacacagaag aattgtcaac aatgttgat atggggcacc
61 ttgacttctt ggaatgtaat gattgttaac accgagacc tgggtgtgac cgtgtactac
121 ggcgtgcgcg tggcgcgga cgcgaagacc accctgttct gccgcagga cgcgaaggcc
181 tacgagacgg agtggacaaa cgtgtggggc acccaagcct gctgtccac cgaccccaac
241 cccaggaga tctgttggg caaogtgacc gagaacttca acatgtggaa gaacgacatg
301 gccgaccaga tgcagagga cgtgatgac cgttgggacc agacctgaa gccctgtgtg
361 aagctgacc ccttgtgct gacotgaa tgcacgaca ccaactgac cggcaacccg
421 accgtgacc gcaacagc acacaaccc aacggcacc gcatctaca catcgaggag
481 atgaagaact gcaacttcca cgcaccacc gagctgcgcg acaagaagca caagagatc
541 gccctgttct accgcttga catgtgccc ctgaacgaga acagcgacaa cttacatc
601 cgcctgatca actgcaaac cagcaacatc accagggcct gccccaaggt gagcttgcac
661 cccatcccca tccactactg gcccccgcgc gctactgcca tctgaatgt caacaacaag
721 accttcaag gcacccggcc ctgctacac gtgagcagc tgcagtgcac ccacggcatc
781 aagccgtgg tgaacacca cgtgtgtgt aacggcagcc tggcgaggga gggcatcatc
841 atcgcgagc agaacttgac cgagaacac aagaccatca tctgtacct gaacgagagc
901 gtggagatca actgaccccg ccccaacac aaccccgcga agagcgtgct catcgcccc
961 ggccagggct tctacgccc caacgactgt atgggcaaca tccgcccagc ccaactgcaac
1021 atcagcagc accgctggaa caagacctgt cagcaggtga tgaagaagct gggcgagcac
1081 ttcccaca agacatcca gttaagccc cagccggcg ggcagctgga gatcacatg
1141 cacagcttca actgcccggc cgaatttctt tactgcaaca ccagcaacct gttaacagc
1201 acctaccaca gcaacacgg cacttacaag tacaacgcca acagcagcag cccatcacc
1261 ctgcagtcca agatcaagca gatctgtcgc atgtggcagg gctgtggcca gcccactac
1321 gcccccacca tgcgcggcaa catcaactgc cgcagcaaca tcaacggcat cctgtgacc
1381 cgcagcggcg gcttcaaac caacaacac accgagact tccgcccgc cggcgggcag
1441 atgcgcgaca actggcgagc cgaactgtac aagtacaagg tgggtggat caagccctg
1501 ggcatgccc ccaacaaggc caagcgccg gtgtgtcagc gcgagaagcg cgcctgtggc
1561 atcggcgcg gtgtctggg cttctgggc gccgcggcca gcaactggg cgcgcgac
1621 atcaacctga cgtgcagc cgcgcagctg ctgagcgcca tctgtcagca cgagagcaac
1681 ctgtgaagg ccatcaggg ccagcagcac atgtctgac tgaactgtg gggcatcaag
1741 cagctgaagg cccgctgtct ggcacatgag cgtacttga agaacagga cgtctgtggc
1801 atctggggct gcagcggcg cctgatctgc accaccgccc tgccttggaa cagcagctgg
1861 agcaacaaga gcgaagaaga catctggac aactgtgac ggaatcagtg ggaocggag
1921 atcagcaact acacggcct gatctacaac ctgtgtgagg acagcgagaa ccagcaggag
1981 aagaacgaga aggaactgct ggaactggac aagtgaaca accgttggaa ctgtgtgac
2041 atcagcaact ggcctgtgta catctaacg gag

FIGURE 102

【図 1 0 1】

108/114

gp140mod.TV1 (SEQ ID NO:132)

1 gaattcatgc cgtgtatggg caccagaag aactgccagc agtggggat ctggggcacc
61 ctgggcttct ggaatgctat gatctgcaac accgaggacc tgggtgtgac cgtgtactac
121 ggcgtgcgcg tgtgtgcgga cgcgaagacc accctgttct ggcgcagga cgcgaaggcc
181 tacgagacgg aggtgcacaa cgtgtgggoc acccaagcct gctgtccac cgaccccaac
241 cccaggaga tctgttggg caactgaccc gagaacttca acatgtggaa gaacgacatg
301 gccgaccaga tgcagagga cgtgatcagc ctgtgggacc agagcctgaa gccctgtgtg
361 aagctgacc ccttgtgct gacotgaa tgcacgaca ccaactgac cggcaacccg
421 accgtgacc gcaacgac caacaacac accggcagc gcatctaca catcgaggag
481 atgaagaact gcagcttcaa cgcacacac gagctgcgcg acaagaagca caagagatc
541 gccctgttct accgcttga catgtgccc ctgaacgaga acagcgaca cttacatc
601 cgcctgatca actgcaaac cagcaccatc accagggctt gccccaaggt gagcttgcac
661 cccatcccca tccactactg cgcgccgcgc gctacgcca tctgaatgt caacaacaag
721 accttcaag gcacccggcc ctgtacaa gtgagcaccg tgcagtcac ccacggcatc
781 aagccgtgg tgaacacca cgtgtgtgt aacggcagc tggcgaggga gggcatcatc
841 atcgcagcg agacactgac cgagaacac aagaccatc tctgtacct gaacgagagc
901 gtggagatca actgacccg ccccaacac aaccccga agagcgtgcg catcgcccc
961 ggcaggcctt tctacgccc caacgactgt atcgcaaca tccgcccagc ccaactgcaac
1021 atcagcagc accgttggaa caagacctgt cagcaggtga tgaagaagct gggcgagcac
1081 ttcccaca agacatcca gttaagccc cagccggcg ggcagctgga gatcacatg
1141 cacagcttca actgcccggc cgaatttctt tactgcaaca ccagcaacct gttaacagc
1201 acctaccaca gcaacacgg cacttacaag tacaacgcca acagcagcag cccatcacc
1261 ctgcagtcca agatcaagca gatctgtcgc atgtggcagg gctgtggcca gcccactac
1321 gcccccacca tgcgcggcaa catcaactgc cgcagcagca tcaacggct cctgtgacc
1381 cgcgagcgcg gcttcaaac caacaacac accgagact tccgcccgc cggcgggcag
1441 atgcgcgaca actggcgag cgaactgtac aagtacaagg tgggtggat caagccctg
1501 ggcatgccc ccacaaggc caagcgccg gtgtgtcagc gcgagaagcg cgcctgtggc
1561 atcggcgcg gtgtctggg cttctgggc gccgcggcca gcaactggg cgcgcgac
1621 atcaacctga cgtgcagc cgcgcagctg ctgagcgcca tctgtcagca cgagagcaac
1681 ctgtgaagg ccatcaggg ccagcagcac atgtctgac tgaactgtg gggcatcaag
1741 cagctgaagg cccgctgtct ggcacatgag cgtacttga agaacagga cgtctgtggc
1801 atctggggct gcagcggcg cctgatctgc accaccgccc tgccttggaa cagcagctgg
1861 agcaacaaga gcgaagaaga catctggac aactgtgac ggaatcagtg ggaocggag
1921 atcagcaact acacggcct gatctacaac ctgtgtgagg acagcgagaa ccagcaggag
1981 aagaacgaga aggaactgct ggaactggac aagtgaaca accgttggaa ctgtgtgac
2041 atcagcaact ggcctgtgta catctaacg gag

FIGURE 101

【図 1 0 3】

110/114

NeD125G_TV2_C_ZAopt (SEQ ID NO:134)

ATGGGCGGCAAGTGGAGCAAGAGCAGCATCATCGGCTGGCCGAGGTGCGC
GAGCGCATCCGCGCACCCCGCAGCGCCCGCAGGGCGTGGGCAGCGCCAGC
CAGGACCTGGAGAAGCAACGCGCCCTGACACCCAGCAACACCGCCACAAAC
AACCGCCGCTGCGCCTGGCTGGAGGCCAGGAGGAGGAGGGCGAGGTGGGC
TTCCCGTGCGCCGCCAGGTGCCCTGCGCCCATGACCTACAAGCCGCCAT
CGACCTGAGCTTCTTCTGAAGGAGAAGGGCGGCTGGAGGGCTGATCTAC
AGCAAGAAGCGCCAGGAGATCTTGGACCTGTGGGTGTACAACACCCAGGGC
TTCTTCCCGGCTGCGCAACTACACCCCGGCCCGCGGCTGCGCTTCCCTCT
GACCTCGGCTGTGTAAGCTGGAGCCCGGCTGGAGGGCGAGGTGGAG
GAGGCCAACGAGGGCGGAGAACAACCTGCTGCTGCACCCCATGAGCCAGCAC
GGCATGGAGGACGAGGACCGCGAGGTGCTGCGCTGGAAGTTGACAGGACAC
CTGCGCCGCGGCCACATGGCCGCGAGCTGCACCCCGAGTACTACAAGGACT
GCTGA

FIGURE 103

【図 1 0 4】

111/114

NeD125G-Myr_TV2_C_ZAopt (SEQ ID NO:135)

ATGGCCGCGCAAGTGGAGCAAGAGCAGCATCATCGGCTGGCCGAGGTGCGC
GAGCGCATCCGCGCACCCCGCAGCGCCCGCAGGGCGTGGGCAGCGCCAGC
CAGGACCTGGAGAAGCAACGCGCCCTGACACCCAGCAACACCGCCACAAAC
AACCGCCGCTGCGCCTGGCTGGAGGCCAGGAGGAGGAGGGCGAGGTGGGC
TTCCCGTGCGCCGCCAGGTGCCCTGCGCCCATGACCTACAAGCCGCCAT
CGACCTGAGCTTCTTCTGAAGGAGAAGGGCGGCTGGAGGGCGTGTACTAC
AGCAAGAAGCGCCAGGAGATCTTGGACCTGTGGGTGTACAACACCCAGGGC
TTCTTCCCGGCTGCGCAGAACTACACCCCGGCCCGCGGCTGCGCTTCCCTCT
GACCTCGGCTGTGTAAGCTGGAGCCCGTGGACCCCATGAGCCAGCAC
GGCATGGAGGACGAGGACCGCGAGGTGCTGCGCTGGAAGTTGACAGGACAC
CTGCGCCGCGGCCACATGGCCGCGAGCTGCACCCCGAGTACTACAAGGACT
GCTGA

FIGURE 104

【図 105 A】

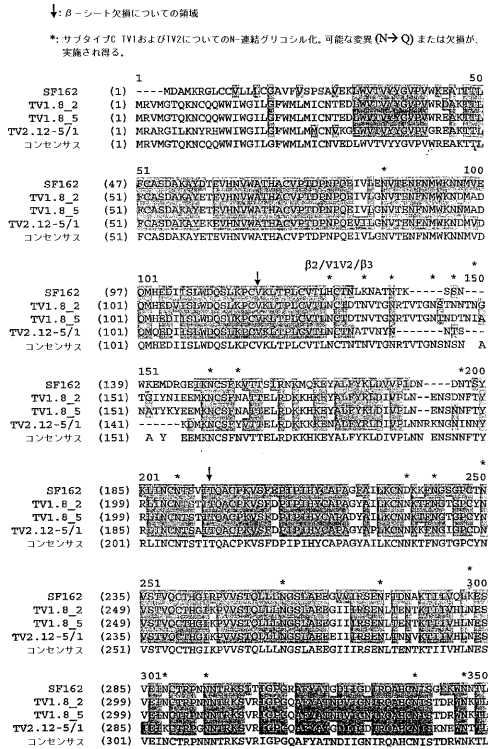


FIGURE 105A

【図 105 C】

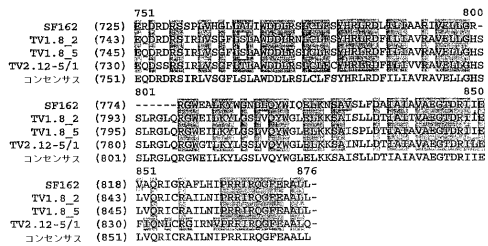


FIGURE 105C

【図 105 B】

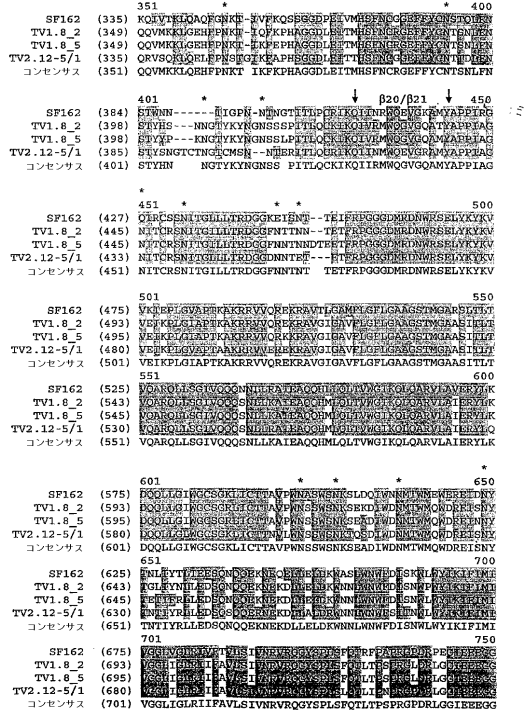


FIGURE 105B

【配列表】

2012147792000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 31/18

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ヤン ツア メゲーデ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エミリービル, ホートン ストリートーアール 4 4 0 4 5 6 0, カイロン コーポレイション気付

(72)発明者 スーザン ダブリュー. バーネット

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エミリービル, ホートン ストリートーアール 4 4 0 4 5 6 0, カイロン コーポレイション気付

(72)発明者 スーザン エンジェルブレヒト

南アフリカ 7 5 0 5 タイガーバーク, ピー. オー. ボックス 1 9 0 6 3, ユニバーシティ オブ ステレンボスク気付

(72)発明者 エストレーリタ ジャンセ ヴァン レンズバーク

南アフリカ 7 5 0 5 タイガーバーク, ピー. オー. ボックス 1 9 0 6 3, ユニバーシティ オブ ステレンボスク気付

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA35 CA04 DA01 DA02 DA05 DA12 EA04 FA02 FA06

FA07 GA11

4B065 AA01X AA72X AA88X AA90X AB01 BA02 CA24 CA45

4C085 AA03 BA69 CC08 DD62 DD86 EE06

4H045 AA11 AA20 AA30 CA05 DA86 EA29 FA74

【外国語明細書】
2012147792000001.pdf