

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7030347号
(P7030347)

(45)発行日 令和4年3月7日(2022.3.7)

(24)登録日 令和4年2月25日(2022.2.25)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/49 (2006.01)

C 1 2 N 15/49

Z N A

C 0 7 K 14/16 (2006.01)

C 0 7 K 14/16

A 6 1 K 39/21 (2006.01)

A 6 1 K 39/21

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 31/18 (2006.01)

A 6 1 P 31/18

請求項の数 23 外国語出願 (全160頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-44717(P2020-44717)
 (22)出願日 令和2年3月13日(2020.3.13)
 (62)分割の表示 特願2018-43805(P2018-43805)の
 分割
 原出願日 平成19年7月30日(2007.7.30)
 (65)公開番号 特開2020-103317(P2020-103317
 A)
 (43)公開日 令和2年7月9日(2020.7.9)
 審査請求日 令和2年4月10日(2020.4.10)
 (31)優先権主張番号 60/833,861
 (32)優先日 平成18年7月28日(2006.7.28)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/833,856
 (32)優先日 平成18年7月28日(2006.7.28)
 最終頁に続く

(73)特許権者 500429103
 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ ペンシルバニア
 アメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベ
 ニア州 フィラデルフィア シビック セ
 ンター プールパード 3 6 0 0 ナインス
 フロア
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72)発明者
 デイビッド ビー・ ウェイナー
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 9 0
 6 6 , メリオン , ビーコム レーン 7
 1 7
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改良されたワクチンおよびそれを使用するための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 3 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有しているヌクレオチド配列が含まれて
 いる、核酸分子であって、H I V サブタイプ B コンセンサスエンベロープタンパク質をコ
 ードする、核酸分子。

【請求項 2】

配列番号 3 のヌクレオチド配列が含まれている、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 3 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有しているヌクレオ
 チド配列が含まれている、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

配列番号 3 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 9 8 % の同一性を有しているヌクレオ
 チド配列が含まれている、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

配列番号 3 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 9 9 % の同一性を有しているヌクレオ
 チド配列が含まれている、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれて
 いる、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 7】

配列番号 4 に対して少なくとも 98% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が含まれている、核酸分子であって、HIV サブタイプ B コンセンサスエンベロープタンパク質をコードする、核酸分子。

【請求項 8】

配列番号 17 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれている、請求項 7 に記載の核酸分子。

【請求項 9】

前記分子がプラスミドである、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の核酸分子が含まれている薬学的組成物。

10

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の核酸分子が含まれている注射可能な薬学的組成物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の核酸分子が含まれている組み換え体ワクチン。

【請求項 13】

組み換え体ワクシニアワクチンである、請求項 12 に記載の組み換え体ワクチン。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の核酸分子が含まれている生の弱毒化病原体。

【請求項 15】

配列番号 4 に対して少なくとも 98% の同一性を有しているアミノ酸配列が含まれている、タンパク質であって、HIV サブタイプ B コンセンサスエンベロープタンパク質を含む、タンパク質。

20

【請求項 16】

配列番号 4 のアミノ酸配列が含まれている、請求項 15 に記載のタンパク質。

【請求項 17】

配列番号 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 99% の同一性を有しているアミノ酸配列が含まれている、請求項 15 に記載のタンパク質。

【請求項 18】

請求項 15 ~ 17 のいずれかに記載のタンパク質が含まれている薬学的組成物。

【請求項 19】

請求項 15 ~ 17 のいずれかに記載のタンパク質が含まれている注射可能な薬学的組成物。

30

【請求項 20】

請求項 15 ~ 17 のいずれかに記載のタンパク質が含まれている組み換え体ワクチン。

【請求項 21】

組み換え体ワクシニアワクチンである、請求項 20 に記載の組み換え体ワクチン。

【請求項 22】

請求項 15 ~ 17 のいずれかに記載のタンパク質が含まれている生の弱毒化病原体。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の核酸分子、または、請求項 15 ~ 17 のいずれかに記載のタンパク質が含まれている、個体において HIV に対する免疫応答を誘導するための組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、改良された HIV、HPV、HCV、インフルエンザ、およびガンワクチン、HIV、HPV、HCV、インフルエンザ、およびガンに対する免疫応答を誘導するための改良された方法、ならびに、それらに対して個体を予防的および/または治療的に免疫化するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

50

HIVゲノムは、突然変異率が高く、そして機能的補償も高いために、非常に柔軟性が高い。この高い突然変異率は、少なくとも2つの機構：ウイルスの逆転写酵素（RT）の低い忠実性（これにより、1回の複製サイクルあたり少なくとも1つの突然変異が生じる）、および抗レトロウイルス細胞因子APOBEC3G遺伝子とウイルス感染因子Vifアクセサリー遺伝子の二重効果によって駆動される。それぞれの可能性のある突然変異、および多くの二重変異を有しているゲノムが、それぞれの複製サイクルの間に作成され、とてつもない数の抗原多様性が生じる。したがって、個々の単離物から導かれた候補のワクチンは、出回っている多様なHIVウイルスから防御するための十分な交差反応性を誘発することができない場合があると主張されている。最近の実験では、コンセンサスな免疫原（非特許文献1；非特許文献2）または祖先型の免疫原（非特許文献3；非特許文献4；非特許文献5；非特許文献6）がこれに関して有用である可能性があることが示唆されている。しかし、これらのアプローチの最初の実験では、これらの免疫原によって誘導された細胞性免疫の促進は比較的軽微であることを示していた。

10

【0003】

最近、Derdeynらは、8人のアフリカ人異性愛者の感染ペアにおいてHIV-1サブタイプCエンベロープ糖タンパク質の配列を分析し、より短いV1、V2、およびV4の長さ、より少ないグリカンが、初期感染者（early transmitters）から得られた配列が共有している共通の特徴であることを発見した（Derdeyn, C. A. ら、2004. Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* 303:2019-2022.）。このデータは、そのようなウイルスを模倣する抗原が、感染速度の早いウイルス（early-transmitted viruses）と関連性がある可能性があることを示唆している。しかし、そのような感染速度の早い構造は、全てのサブタイプについて観察されているわけではない（Chohan, B. ら、2005. Selection for Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. *J. Virol.* 79:6528-6531.）。しかし、より短いVループをエンベロープ免疫原の中に組み込むことには、他の利点、例えば、可溶性CD4に対する感度の増強（Pickora, C. ら、2005. Identification of two N-linked glycosylation sites within the core of the Simian Immunodeficiency virus glycoprotein whose removal enhances sensitivity to soluble CD4. *J. Virol.* 79:12575-12583.）がある可能性があり、考慮されるべきである。

20

30

【0004】

複数の実験により、急性感染および無症候感染の間のウイルス量の制御、ならびに、AIDSの発症におけるHIV-1特異的CTL応答の重要性が示された。しかし、現在のエンベロープをベースとするDNAワクチンが、必要に応じた効果があるかどうかは明らかではない。HIV-1免疫原の発現レベルを増大させるためには、例えば、コドン最適化（Andre, S. ら、1998, Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J. Virol.* 72:1497-503; Deml, L. ら、A. 2001. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human imm

40

50

unodeficiency virus type 1 gag protein. J. Virol. 75:10991-11001)、RNAの最適化(Muthumani, K.ら、2003. Novel engineered HIV-1 East African Clade-A gp160 plasmid construct induces strong humoral and cell-mediated immune responses in vivo. Virology 314:134-46; Schneider, R., M.ら、1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. J. Virol 71:4892-4903)、および弱いRNA二次構造を有している免疫グロブリンリーダー配列の付加(Yang, J. S.ら、2001. Induction of potent Th1-Type immune responses from a novel DNA vaccine for West Nile Virus New York Isolate (WNV-NY1999). J. Infect Disease 184:809-816)のようないくつかの方法が使用されている。

【0005】

ヒトパピローマウイルス(HPV)は、環状のdsDNAゲノム(7,000~8,000塩基対)を有する。最大200までの様々な遺伝子型が存在する。系統発生的には、HPVは高度に保存されている。粘膜のHPVは、「高リスク(High Risk)」または「低リスク(Low Risk)」と分類される。低リスクのグループには、タイプ6、11、42などが含まれる。関連する疾患としては、生殖器疣；低悪性度の頸部、肛門、外陰部、膣の形成異常；および反復呼吸器乳頭腫症が挙げられる。高リスクのグループには、タイプ16、18、31、33、45、52、58などが含まれる。関連する疾患としては、子宮頸ガン、前ガン性形成異常の本質的な原因、肛門、外陰部、膣、へんとうのガンの主原因；ならびに、他の気道・消化器のガンの共同因子が挙げられる。毎日、800人の女性が子宮頸ガンで死亡している。

【0006】

HPV E6およびE7タンパク質は腫瘍特異的抗原であり、腫瘍形成と腫瘍状態の維持に必要である。子宮頸ガンの患者には、E7特異的免疫応答が欠失している。E6およびE7タンパク質はいずれも、細胞性のヒト腫瘍サプレッサー遺伝子の産物と、E6はp53と、そしてE7はRb(網膜芽細胞腫腫瘍サプレッサー遺伝子)と特異的に相互作用する。E6およびE7は、理想的な免疫治療の標的である。

【0007】

hTERTはヒトテロメラーゼ逆転写酵素であり、これは、テロメラーゼの末端上にTTAGGGタグを合成して、染色体が短くなることが原因である細胞死を防ぐ。胚細胞およびいくつかの生殖系列の細胞は、通常はhTERTを発現し、細胞集団の恒常性を調節する。しかし、ガン細胞は、この調節機構を、細胞集団の恒常性を崩壊させるために利用する。例えば、hTERTの過剰発現は、ヒトのガン細胞の85%より多くにおいて起こる。したがって、hTERTは、理想的な免疫治療の標的である。

【0008】

hTERTはまた、HCVまたはHPV感染が原因でhTERTを発現している過剰に増殖している細胞に対する免疫療法を促進する可能性もある。高リスクのHPVタイプに由来するE6ガンタンパク質は、ヒトのケラチン生成細胞の中でヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の転写を活性化させる。肝臓の中の形成異常の病変および初期新生物の病変もまた、異常に高いレベルでhTERTを発現する。したがって、HPVおよびHCVに対する免疫療法は、異常なレベルでhTERTを発現する細胞を標的化することによって増強できる場合がある。hTERTと、HPVもしくはHCVタンパク質またはそのようなタンパク質をコードする核酸の両方を使用する併用免疫療法は、魅力的な免疫療法

10

20

30

40

50

である。

【0009】

インフルエンザヘマグルチニン(HA)は、インフルエンザウイルス粒子の表面上で発現され、ウイルスと宿主細胞との間での最初の接触を担っている。HAは、周知の免疫原である。インフルエンザA株H1N5、トリインフルエンザ株(特に、そのHAタンパク質が原因でヒト集団を脅かすもの)は、自然な突然変異によってわずかに遺伝的に混ぜ合わされば、他のウイルス株と比較して、ヒト細胞に対して大幅に高い感染性を有することになる。乳幼児および高齢者、または免疫障害を持つ成人のヒトのウイルスH1N5株への感染は、多くの場合に、残念な臨床的結果と関係する。したがって、HAおよびインフルエンザのH1N5株の他のインフルエンザ分子は、理想的な免疫療法の標的である。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【文献】Gao, F. 5, Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein. J. Virol. (2005) 79: 1154 - 63

Scriba, T. J. 5, Functionally-inactive and immunogenic Tat, Rev and Nef DNA vaccines derived from sub-Saharan subtype C human immunodeficiency virus type 1 consensus sequences. Vaccine (2005) 23: 1158 - 69

20

Doria-Rose, N. A. 5, Human Immunodeficiency Virus Type 1 subtype B Ancestral Envelope Protein Is Functional and Elicits Neutralizing Antibodies in Rabbits Similar to Those Elicited by a Circulating Subtype B Envelope. J. Virol. (2005) 79: 11214 - 11224

Gao, F. 5, Centralized immunogens as a vaccine strategy to overcome HIV-1 diversity. Expert Rev. Vaccines (2004) 3: S161 - S168

30

Mullins, J. I. 5, Immunogen sequence: the fourth tier of AIDS vaccine design. Expert Rev. Vaccines (2004) 3: S151 - S159

Nickle, D. C. 5, Consensus and ancestral state HIV vaccines. Science (2003) 299: 1515 - 1517

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

要旨

40

本発明は、それに対して抗HIV免疫応答を生じさせることができる改良された免疫原性標的を提供する核酸構築物、およびそれによってコードされるタンパク質に関する。

【0012】

本発明によっては、HIVサブタイプAエンベロープタンパク質についてのコンセンサス配列、HIVサブタイプBエンベロープタンパク質についてのコンセンサス配列、HIVサブタイプCエンベロープタンパク質についてのコンセンサス配列、HIVサブタイプDエンベロープタンパク質についてのコンセンサス配列、HIVサブタイプBコンセンサスNef-Revタンパク質についてのコンセンサス配列、ならびに、HIV Gagタンパク質サブタイプA、B、C、およびDに由来するコンセンサス配列が提供される。

【0013】

50

本発明により、そのようなタンパク質配列をコードする構築物、そのようなタンパク質および/またはそのようなタンパク質をコードする核酸分子を含むワクチン、ならびに、抗HIV免疫応答を誘導する方法が提供される。

【0014】

本発明は、配列番号1；配列番号1の断片；配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有している配列；配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有している配列の断片；配列番号3；配列番号3の断片；配列番号3に対して少なくとも90%の同一性を有している配列；配列番号3に対して少なくとも90%の同一性を有している配列の断片；配列番号5；配列番号5の断片；配列番号5に対して少なくとも90%の同一性を有している配列；配列番号5に対して少なくとも90%の同一性を有している配列の断片；配列番号7；配列番号7の断片；配列番号7に対して少なくとも90%の同一性を有している配列；配列番号7に対して少なくとも90%の同一性を有している配列の断片；配列番号9；配列番号9の断片；配列番号9に対して少なくとも90%の同一性を有している配列；配列番号9に対して少なくとも90%の同一性を有している配列の断片；配列番号11；配列番号11の断片；配列番号11に対して少なくとも90%の同一性を有している配列；配列番号11に対して少なくとも90%の同一性を有している配列の断片からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子に関する。

10

【0015】

本発明は、配列番号16；配列番号17；配列番号18；配列番号19；配列番号20、および配列番号21からなる群より選択されるタンパク質をコードする核酸分子に関する。

20

【0016】

本発明は、配列番号2をコードするヌクレオチド配列；配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号2をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号4をコードするヌクレオチド配列；配列番号4に対して少なくとも90%の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号4をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号4に対して少なくとも90%の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号6をコードするヌクレオチド配列；配列番号6に対して少なくとも90%の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号6をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号6に対して少なくとも90%の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号8をコードするヌクレオチド配列；配列番号8に対して少なくとも90%の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号8をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号8に対して少なくとも90%の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号10をコードするヌクレオチド配列；配列番号10に対して少なくとも90%の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号10をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号10に対して少なくとも90%の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号12をコードするヌクレオチド配列；配列番号12に対して少なくとも90%の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号12をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号12に対して少なくとも90%の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子に関する。

30

40

【0017】

本発明によってはさらに、そのような核酸分子が含まれている薬学的組成物、およびHIVに対して個体において免疫応答を誘導する方法におけるそれらの使用が提供される。この方法には、そのような核酸分子が含まれている組成物を個体に投与する工程が含まれる。

【0018】

本発明によってはさらに、そのような核酸分子が含まれている組み換え体ワクチン、およ

50

びH I Vに対して個体において免疫応答を誘導する方法におけるそれらの使用が提供される。この方法には、そのような組み換え体ワクチンを個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 1 9 】

本発明によってはさらに、そのような核酸分子が含まれている弱毒化させた病原体、およびH I Vに対して個体において免疫応答を誘導する方法におけるそれらの使用が提供される。この方法には、そのような弱毒化させた病原体、生の弱毒化させた病原体を、個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 2 0 】

本発明によってはさらに、配列番号 2 ; 配列番号 2 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有している配列 ; 配列番号 2 の断片 ; 配列番号 2 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有している配列の断片 ; 配列番号 4 ; 配列番号 4 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有している配列 ; 配列番号 4 の断片 ; 配列番号 4 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有している配列の断片 ; 配列番号 6 ; 配列番号 6 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有している配列 ; 配列番号 6 の断片 ; 配列番号 6 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有している配列の断片 ; 配列番号 8 ; 配列番号 8 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有している配列 ; 配列番号 8 の断片 ; 配列番号 8 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有している配列の断片 ; 配列番号 1 0 ; 配列番号 1 0 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有している配列 ; 配列番号 1 0 の断片 ; 配列番号 1 0 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有している配列の断片 ; 配列番号 1 2 ; 配列番号 1 2 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有している配列 ; 配列番号 1 2 の断片 ; および配列番号 1 2 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有している配列の断片からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれているタンパク質が提供される。

10

20

【 0 0 2 1 】

本発明によってはさらに、配列番号 1 6 ; 配列番号 1 7 ; 配列番号 1 8 ; 配列番号 1 9 ; 配列番号 2 0、および配列番号 2 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれているタンパク質が提供される。

【 0 0 2 2 】

本発明によってはさらに、そのようなタンパク質が含まれている薬学的組成物、およびH I Vに対して個体において免疫応答を誘導する方法におけるそれらの使用が提供される。この方法には、そのようなタンパク質が含まれている組成物を個体に投与する工程が含まれる。

30

【 0 0 2 3 】

本発明によってはさらに、そのようなタンパク質が含まれている組み換え体ワクチン、およびH I Vに対して個体において免疫応答を誘導する方法におけるそれらの使用が提供される。この方法には、そのような組み換え体ワクチンを個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 2 4 】

本発明によってはさらに、そのようなタンパク質が含まれている生の弱毒化させた病原体、およびH I Vに対して個体において免疫応答を誘導する方法におけるそれらの使用が提供される。この方法には、そのような生の弱毒化させた病原体を個体に投与する工程が含まれる。

40

【 0 0 2 5 】

コンセンサスなH P V 遺伝子型 1 6 の E 6 - E 7 アミノ酸配列を含むタンパク質、およびそのようなタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれている核酸分子が提供される。

【 0 0 2 6 】

本発明は、配列番号 2 2 ; その断片 : 配列番号 2 2 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有しているヌクレオチド配列 ; およびその断片からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子に関する。

【 0 0 2 7 】

本発明はまた、配列番号 2 3 をコードする核酸配列 ; 配列番号 2 4 をコードする核酸配列

50

；配列番号 25 をコードする核酸配列；配列番号 26 をコードする核酸配列；および配列番号 27 をコードする核酸配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子にも関する。

【0028】

本発明はまた、そのような核酸分子が含まれている薬学的組成物、および HPV に対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのような核酸分子が含まれている組成物を上記個体に投与する工程が含まれる。

【0029】

本発明はさらに、そのような核酸分子が含まれている組み換え体ワクチン、および HPV に対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような組み換え体ワクチンを上記個体に投与する工程が含まれる。

10

【0030】

本発明はさらに、そのような核酸分子が含まれている生の弱毒化させた病原体、および HPV に対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような生の弱毒化させた病原体を上記個体に投与する工程が含まれる。

【0031】

本発明はまた、配列番号 23、その断片；配列番号 23 に対して少なくとも 90% の相同性を有しているヌクレオチド配列；およびその断片からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれているタンパク質からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子にも関する。

20

【0032】

本発明はまた、配列番号 23；配列番号 24；配列番号 25；配列番号 26；および配列番号 27 からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれているタンパク質にも関する。

【0033】

本発明はまた、そのようなタンパク質が含まれている薬学的組成物、および HPV に対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのようなタンパク質が含まれている組成物を上記個体に投与する工程が含まれる。

【0034】

本発明はまた、そのようなタンパク質が含まれている組換え体ワクチン、および HPV に対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのような組み換え体ワクチンを上記個体に投与する工程が含まれる。

30

【0035】

本発明はまた、そのようなタンパク質が含まれている生の弱毒化させた病原体、および HPV に対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのような生の弱毒化させた病原体を上記個体に投与する工程が含まれる。

【0036】

コンセンサス HCV 遺伝子型 1a および 1b の E1 - E2 アミノ酸配列が含まれているタンパク質、ならびに、そのようなタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれている核酸分子が提供される。

【0037】

本発明は、配列番号 30；その断片；配列番号 30 に対して少なくとも 90% の相同性を有しているヌクレオチド配列；およびその断片からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子に関する。

40

【0038】

本発明はまた、配列番号 31 をコードする核酸配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子にも関する。

【0039】

本発明はまた、そのような核酸分子が含まれている薬学的組成物、および HCV に対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのような核酸分子が含まれている組成物を上記個体に投与する工程が含まれる。

50

【 0 0 4 0 】

本発明はさらに、そのような核酸分子が含まれている組み換え体ワクチン、およびH C Vに対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような組み換え体ワクチンを上記個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 4 1 】

本発明はさらに、そのような核酸分子が含まれている生の弱毒化させた病原体、およびH C Vに対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような生の弱毒化させた病原体を、上記個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 4 2 】

本発明はまた、配列番号31；その断片；配列番号31に対して少なくとも90%の相同性を有しているヌクレオチド配列；およびその断片からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれているタンパク質からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子にも関する。

10

【 0 0 4 3 】

本発明はまた、そのようなタンパク質が含まれている薬学的組成物、およびH C Vに対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのようなタンパク質が含まれている組成物を上記個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 4 4 】

本発明はまた、そのようなタンパク質が含まれている組換え体ワクチン、およびH C Vに対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのような組み換え体ワクチンを上記個体に投与する工程が含まれる。

20

【 0 0 4 5 】

本発明はまた、そのようなタンパク質が含まれている生の弱毒化させた病原体、およびH C Vに対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのような生の弱毒化させた病原体を上記個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 4 6 】

コンセンサスh T E R Tアミノ酸配列が含まれているタンパク質、およびそのようなタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれている核酸分子が提供される。

【 0 0 4 7 】

本発明はさらに、配列番号34；その断片；配列番号34に対して少なくとも90%の相同性を有しているヌクレオチド配列；およびその断片からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子に関する。

30

【 0 0 4 8 】

本発明はまた、そのような核酸分子が含まれている薬学的組成物、およびh T E R Tを発現している過剰増殖性の細胞に対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのような核酸分子が含まれている組成物を上記個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 4 9 】

本発明はさらに、そのような核酸分子が含まれている組み換え体ワクチン、およびh T E R Tを発現している過剰増殖性の細胞に対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような組み換え体ワクチンを上記個体に投与する工程が含まれる。

40

【 0 0 5 0 】

本発明はさらに、そのような核酸分子が含まれている生の弱毒化させた病原体、およびh T E R Tを発現している過剰増殖性の細胞に対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような生の弱毒化させた病原体を、上記個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 5 1 】

本発明はまた、配列番号35；その断片；配列番号35に対して少なくとも90%の相同性を有しているヌクレオチド配列；およびその断片からなる群より選択されるアミノ酸配

50

列が含まれているタンパク質からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子にも関する。

【 0 0 5 2 】

本発明はまた、そのようなタンパク質が含まれている薬学的組成物、および h T E R T を発現している過剰増殖性の細胞に対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのようなタンパク質が含まれている組成物を上記個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 5 3 】

本発明はまた、そのようなタンパク質が含まれている組換え体ワクチン、および h T E R T を発現している過剰増殖性の細胞に対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのような組み換え体ワクチンを上記個体に投与する工程が含まれる。

10

【 0 0 5 4 】

本発明はまた、そのようなタンパク質が含まれている生の弱毒化させた病原体、および h T E R T を発現している過剰増殖性の細胞に対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのような生の弱毒化させた病原体を上記個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 5 5 】

インフルエンザ H 5 N 1 コンセンサス H A アミノ酸配列、インフルエンザ H 1 N 1 および H 5 N 1 コンセンサス N A アミノ酸配列、インフルエンザ H 1 N 1 および H 5 N 1 コンセンサス M 1 アミノ酸配列、ならびに、インフルエンザ H 5 N 1 コンセンサス M 2 E - N P アミノ酸配列が含まれているタンパク質と、そのようなタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれている核酸分子が提供される。

20

【 0 0 5 6 】

本発明はさらに、配列番号 3 6 ; その断片 ; 配列番号 3 6 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有しているヌクレオチド配列 ; およびその断片からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子に関する。

【 0 0 5 7 】

本発明はさらに、配列番号 3 8 ; その断片 ; 配列番号 3 8 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有しているヌクレオチド配列 ; およびその断片からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子に関する。

30

【 0 0 5 8 】

本発明はさらに、配列番号 4 0 ; その断片 ; 配列番号 4 0 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有しているヌクレオチド配列 ; およびその断片からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子に関する。

【 0 0 5 9 】

本発明はさらに、配列番号 4 2 ; その断片 ; 配列番号 4 2 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有しているヌクレオチド配列 ; およびその断片からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子に関する。

【 0 0 6 0 】

本発明はまた、そのような核酸分子が含まれている薬学的組成物、ならびに、H P V、H C V、およびインフルエンザウイルスに対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのような核酸分子が含まれている組成物を上記個体に投与する工程が含まれる。

40

【 0 0 6 1 】

本発明はさらに、そのような核酸分子が含まれている組み換え体ワクチン、ならびに、H P V、H C V、およびインフルエンザウイルスに対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような組み換え体ワクチンを上記個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 6 2 】

50

本発明はさらに、そのような核酸分子が含まれている生の弱毒化させた病原体、ならびに、HPV、HCV、およびインフルエンザウイルスに対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような生の弱毒化させた病原体を、上記個体に投与する工程が含まれる。

【0063】

本発明はまた、そのような核酸分子が含まれている薬学的組成物、ならびに、HPV、HCV、およびインフルエンザウイルスに対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのような核酸分子が含まれている組成物を上記個体に投与する工程が含まれる。

【0064】

本発明はさらに、そのような核酸分子が含まれている組換え体ワクチン、ならびに、HPV、HCV、およびインフルエンザウイルスに対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような組み換え体ワクチンを上記個体に投与する工程が含まれる。

【0065】

本発明はさらに、そのような核酸分子が含まれている生の弱毒化させた病原体、ならびに、HPV、HCV、およびインフルエンザウイルスに対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような生の弱毒化させた病原体を上記個体に投与する工程が含まれる。

【0066】

本発明はさらに、配列番号37；その断片；配列番号37に対して少なくとも90%の相同性を有しているヌクレオチド配列；およびその断片からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれているタンパク質分子に関する。

【0067】

本発明はさらに、配列番号39；その断片；配列番号39に対して少なくとも90%の相同性を有しているヌクレオチド配列；およびその断片からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれているタンパク質分子に関する。

【0068】

本発明はさらに、配列番号41；その断片；配列番号41に対して少なくとも90%の相同性を有しているヌクレオチド配列；およびその断片からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれているタンパク質分子に関する。

【0069】

本発明はさらに、配列番号43；その断片；配列番号43に対して少なくとも90%の相同性を有しているヌクレオチド配列；およびその断片からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれているタンパク質分子に関する。

【0070】

本発明はまた、そのようなタンパク質分子が含まれている薬学的組成物、およびインフルエンザウイルスに対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には、そのようなタンパク質分子が含まれている組成物を上記個体に投与する工程が含まれる。

【0071】

本発明はさらに、そのようなタンパク質分子が含まれている組み換え体ワクチン、およびインフルエンザウイルスに対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような組み換え体ワクチンを上記個体に投与する工程が含まれる。

【0072】

本発明はさらに、そのようなタンパク質分子が含まれている生の弱毒化させた病原体、およびインフルエンザウイルスに対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような生の弱毒化させた病原体を、上記個体に投与する工程が含まれる。

【0073】

本発明はまた、そのようなタンパク質分子が含まれている薬学的組成物、およびインフルエンザウイルスに対して個体において免疫応答を誘導する方法にも関する。この方法には

10

20

30

40

50

、そのようなタンパク質分子が含まれている組成物を上記個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 7 4 】

本発明はさらに、そのようなタンパク質分子が含まれている組換え体ワクチン、およびインフルエンザウイルスに対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような組み換え体ワクチンを上記個体に投与する工程が含まれる。

【 0 0 7 5 】

本発明はさらに、そのようなタンパク質分子が含まれている生の弱毒化させた病原体、およびインフルエンザウイルスに対して個体において免疫応答を誘導する方法に関する。この方法には、そのような生の弱毒化させた病原体を上記個体に投与する工程が含まれる。例えば、本願発明は以下の項目を提供する。

(項目 1)

以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子：配列番号 1 ；配列番号 1 の断片；配列番号 1 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 1 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 3 ；配列番号 3 の断片；配列番号 3 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 3 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 5 ；配列番号 5 の断片；配列番号 5 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 5 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 7 ；配列番号 7 の断片；配列番号 7 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 7 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 9 ；配列番号 9 の断片；配列番号 9 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 9 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 1 1 ；配列番号 1 1 の断片；配列番号 1 1 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 1 1 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 2 2 ；配列番号 2 2 の断片；配列番号 2 2 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 2 2 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 3 0 ；配列番号 3 0 の断片；配列番号 3 0 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 3 0 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 3 4 ；配列番号 3 4 の断片；配列番号 3 4 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 3 4 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 3 6 ；配列番号 3 6 の断片；配列番号 3 6 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 3 6 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 3 8 ；配列番号 3 8 の断片；配列番号 3 8 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 3 8 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 4 0 ；配列番号 4 0 の断片；配列番号 4 0 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 4 0 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 4 2 ；配列番号 4 2 の断片；配列番号 4 2 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；および、配列番号 4 2 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片。

(項目 2)

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 1 1、配列番号 2 2、配列番号 3 0、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0 および配列番号 4 2 からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 3)

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 1 1、配列番号 2 2、配列番号 3 0、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0 および配列番号 4 2 からなる群より選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有している配列が含まれている、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 4)

10

20

30

40

50

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 22、配列番号 30、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40 および配列番号 42 からなる群より選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 98% の同一性を有している配列が含まれている、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 5)

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 22、配列番号 30、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40 および配列番号 42 からなる群より選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 99% の同一性を有している配列が含まれている、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 6)

配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20 および配列番号 21、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 31、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41 および配列番号 43 からなる群より選択されるタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれている、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 7)

以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている核酸分子：配列番号 2 をコードするヌクレオチド配列；配列番号 2 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号 2 をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 2 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 4 をコードするヌクレオチド配列；配列番号 4 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号 4 をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 4 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 6 をコードするヌクレオチド配列；配列番号 6 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号 6 をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 6 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 8 をコードするヌクレオチド配列；配列番号 8 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号 8 をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 8 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 10 をコードするヌクレオチド配列；配列番号 10 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号 10 をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 10 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 12 をコードするヌクレオチド配列；配列番号 12 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号 12 をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 12 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 23 をコードするヌクレオチド配列；配列番号 23 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号 23 をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 23 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 31 をコードするヌクレオチド配列；配列番号 31 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号 31 をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 31 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 35 をコードするヌクレオチド配列；配列番号 35 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号 35 をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 35 に対して少なくとも 90% の同一性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号 37 をコードするヌクレオチド配列；配列番号 37 に

10

20

30

40

50

対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号37をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号37に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号39をコードするヌクレオチド配列；配列番号39に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号39をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号39に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号41をコードするヌクレオチド配列；配列番号41に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号41をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号41に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号43をコードするヌクレオチド配列；配列番号43に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号43をコードするヌクレオチド配列の断片；および、配列番号43に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片。
(項目8)

10

配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20および配列番号21、配列番号23、配列番号31、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41および配列番号43からなる群より選択されるタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれている、項目7に記載の核酸分子。

(項目9)

20

以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている、項目1に記載の核酸分子：配列番号1；配列番号1の断片；配列番号1に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号1に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号3；配列番号3の断片；配列番号3に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号3に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号5；配列番号5の断片；配列番号5に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号5に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号7；配列番号7の断片；配列番号7に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号7に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号9；配列番号9の断片；配列番号9に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号9に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号11；配列番号11の断片；配列番号11に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；および、配列番号11に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片。

30

(項目10)

以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている、項目7に記載の核酸分子：配列番号2をコードするヌクレオチド配列；配列番号2に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号2をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号2に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号4をコードするヌクレオチド配列；配列番号4に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号4をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号4に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号6をコードするヌクレオチド配列；配列番号6に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号6をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号6に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号8をコードするヌクレオチド配列；配列番号8に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号8をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号8に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号10をコードするヌクレオチド配列；配列番号10に対し

40

50

て少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号10をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号10に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号12をコードするヌクレオチド配列；配列番号12に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号12をコードするヌクレオチド配列の断片；および、配列番号12に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片。

(項目11)

以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている、項目1に記載の核酸分子：配列番号22；配列番号22の断片；配列番号22に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；および、配列番号22に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片。

10

(項目12)

以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている、項目7に記載の核酸分子：配列番号23をコードするヌクレオチド配列；配列番号23に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；および、配列番号23をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号23に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片。

(項目13)

以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている、項目1に記載の核酸分子：配列番号30；配列番号30の断片；配列番号30に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；および、配列番号30に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片。

20

(項目14)

以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている、項目7に記載の核酸分子：配列番号31をコードするヌクレオチド配列；配列番号31に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；および、配列番号31をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号31に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片。

(項目15)

以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている、項目1に記載の核酸分子：配列番号34；配列番号34の断片；配列番号34に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；および、配列番号34に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片。

30

(項目16)

以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている、項目7に記載の核酸分子：配列番号35をコードするヌクレオチド配列；配列番号35に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；および、配列番号35をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号35に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片。

40

(項目17)

以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている、項目1に記載の核酸分子：配列番号36；配列番号36の断片；配列番号36に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；および、配列番号36に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号38；配列番号38の断片；配列番号38に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号38に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号40；配列番号40の断片；配列番号40に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号40に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号42；配列番号42の断片；配列番号42に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；および、配列番号42に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片。

50

0%の相同性を有している配列の断片。

(項目18)

以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列が含まれている、項目7に記載の核酸分子：配列番号37をコードするヌクレオチド配列；配列番号37に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号37をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号37に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号39をコードするヌクレオチド配列；配列番号39に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号39をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号39に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号41をコードするヌクレオチド配列；配列番号41に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号41をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号41に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；配列番号43をコードするヌクレオチド配列；配列番号43に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；および、配列番号43をコードするヌクレオチド配列の断片；および、配列番号43に対して少なくとも90%の相同性を有しているアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片。

10

(項目19)

前記分子がプラスミドである、項目1から18のいずれかに記載の核酸分子。

20

(項目20)

項目1から19のいずれかに記載の核酸分子が含まれている薬学的組成物。

(項目21)

項目1から19のいずれかに記載の核酸分子が含まれている注射可能な薬学的組成物。(

項目22)

項目1～18のいずれかに記載の核酸分子が含まれている組み換え体ワクチン。

(項目23)

前記組み換え体ワクチンが組み換え体ワクシニアワクチンである、項目22に記載の組み換え体ワクチン。

(項目24)

30

項目1から18のいずれかに記載の核酸分子が含まれている生の弱毒化病原体。

(項目25)

以下からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれているタンパク質：配列番号2；配列番号2に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号2の断片；配列番号2に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号4；配列番号4に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号の断片；配列番号4に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号6；配列番号6に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号6の断片；配列番号6に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号8；配列番号8に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号8の断片；配列番号8に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号10；配列番号10に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号10の断片；配列番号10に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号12；配列番号12に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号12の断片；配列番号12に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号23；配列番号23に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号23の断片；配列番号23に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号31；配列番号31に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号31の断片；配列番号31に対して少なくとも90%の相同性を有している配列の断片；配列番号35；配列番号35に対して少なくとも90%の相同性を有している配列；配列番号35の断片；

40

50

配列番号 35 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列の断片；配列番号 37；配列番号 37 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列；配列番号 37 の断片；配列番号 37 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列の断片；配列番号 39；配列番号 39 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列；配列番号 39 の断片；配列番号 39 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列の断片；配列番号 41；配列番号 41 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列；配列番号 41 の断片；配列番号 41 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列の断片；配列番号 43；配列番号 43 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列；配列番号 43 の断片；および、配列番号 43 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列の断片。

10

(項目 26)

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10 および配列番号 12、配列番号 23、配列番号 31、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41 および配列番号 43 からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれている、項目 25 に記載のタンパク質。

(項目 27)

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10 および配列番号 12、配列番号 23、配列番号 31、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41 および配列番号 43 からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有している配列が含まれている、項目 25 に記載のタンパク質。

20

(項目 28)

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10 および配列番号 12、配列番号 23、配列番号 31、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41 および配列番号 43 からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 98% の同一性を有している配列が含まれている、項目 25 に記載のタンパク質。

(項目 29)

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10 および配列番号 12、配列番号 23、配列番号 31、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41 および配列番号 43 からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 99% の同一性を有している配列が含まれている、項目 25 に記載のタンパク質。

30

(項目 30)

以下からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれている、項目 25 に記載のタンパク質：配列番号 2；配列番号 2 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列；配列番号 2 の断片；配列番号 2 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列の断片；配列番号 4；配列番号 4 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列；配列番号 4 の断片；配列番号 4 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列の断片；配列番号 6；配列番号 6 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列；配列番号 6 の断片；配列番号 6 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列の断片；配列番号 8；配列番号 8 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列；配列番号 8 の断片；配列番号 8 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列の断片；配列番号 10；配列番号 10 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列；配列番号 10 の断片；配列番号 10 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列の断片；配列番号 12；配列番号 12 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列；配列番号 12 の断片；および、配列番号 12 に対して少なくとも 90% の同一性を有している配列の断片。

40

(項目 31)

以下からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれている、項目 30 に記載のタンパク質：配列番号 16；配列番号 17；配列番号 18；配列番号 19；配列番号 20；および配列番号 21。

(項目 32)

以下からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれている、項目 25 に記載のタンパク

50

質：配列番号 2 3、配列番号 2 3 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 2 3 の断片；および、配列番号 2 3 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片。

(項目 3 3)

以下からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれている、項目 3 2 に記載のタンパク質：配列番号 2 3；配列番号 2 4；配列番号 2 5；配列番号 2 6；および配列番号 2 7。

(項目 3 4)

以下からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれている、項目 2 5 に記載のタンパク質：配列番号 3 1、配列番号 3 1 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 3 1 の断片；および、配列番号 3 1 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片。

10

(項目 3 5)

以下からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれている、項目 3 4 に記載のタンパク質：配列番号 3 1；配列番号 3 2；および配列番号 3 3。

(項目 3 6)

以下からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれている、項目 2 5 に記載のタンパク質：配列番号 3 5、配列番号 3 5 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 3 5 の断片；および、配列番号 3 5 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片。

(項目 3 7)

20

アミノ酸配列である配列番号 3 5 が含まれている、項目 3 4 に記載のタンパク質。

(項目 3 8)

以下からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれている、項目 2 5 に記載のタンパク質：配列番号 3 7；配列番号 3 7 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 3 7 の断片；配列番号 3 7 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 3 9；配列番号 3 9 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 3 9 の断片；配列番号 3 9 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 4 1；配列番号 4 1 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 4 1 の断片；配列番号 4 1 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片；配列番号 4 3；配列番号 4 3 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列；配列番号 4 3 の断片；および、配列番号 4 3 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有している配列の断片。

30

(項目 3 9)

以下からなる群より選択されるアミノ酸配列が含まれている、項目 3 8 に記載のタンパク質：配列番号 3 7；配列番号 3 9；配列番号 4 1；および配列番号 4 3。

(項目 4 0)

項目 2 5 から 3 9 のいずれかに記載のタンパク質が含まれている薬学的組成物。

(項目 4 1)

項目 2 5 から 3 9 のいずれかに記載のタンパク質が含まれている注射可能な薬学的組成物。

(項目 4 2)

40

項目 2 5 から 3 9 のいずれかに記載のタンパク質が含まれている組み換え体ワクチン。(項目 4 3)

前記組み換え体ワクチンが組み換え体ワクシニアワクチンである、項目 4 2 に記載の組み換え体ワクチン。

(項目 4 4)

項目 2 5 から 3 9 のいずれかに記載のタンパク質が含まれている生の弱毒化病原体。

(項目 4 5)

H I V に対して個体において免疫応答を誘導する方法であって、項目 9 または 1 0 に記載の核酸分子、あるいは項目 3 0 または 3 1 に記載のタンパク質が含まれている組成物を該個体に投与する工程が含まれる、方法。

50

(項目 4 6)

H P V に対して個体において免疫応答を誘導する方法であって、項目 1 1 または 1 2 に記載の核酸分子、あるいは項目 3 2 または 3 3 に記載のタンパク質が含まれている組成物を該個体に投与する工程が含まれる、方法。

(項目 4 7)

H C V に対して個体において免疫応答を誘導する方法であって、項目 1 3 または 1 4 に記載の核酸分子、あるいは項目 3 4 または 3 5 に記載のタンパク質が含まれている組成物を該個体に投与する工程が含まれる、方法。

(項目 4 8)

h T E R T に対して個体において免疫応答を誘導する方法であって、項目 1 5 または 1 6 に記載の核酸分子、あるいは項目 3 6 または 3 7 に記載のタンパク質が含まれている組成物を該個体に投与する工程が含まれる、方法。

10

(項目 4 9)

インフルエンザに対して個体において免疫応答を誘導する方法であって、項目 1 7 または 1 8 に記載の核酸分子、あるいは項目 3 8 または 3 9 に記載のタンパク質が含まれている組成物を該個体に投与する工程が含まれる、方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 6 】

【図 1】図 1 は、E Y 2 E 1 - B および E K 2 P - B のアミノ酸配列の比較を示す。I g E リーダー配列に下線を付けた。四角で囲んだ領域は可変領域を示す。* は、C C R 5 の利用に関係している 6 個の重要な残基を示す。切断部位は矢印によって示される。膜貫通ドメインは点線で示した。

20

【図 2】図 2 は、2 つの H I V - 1 サブタイプ B エンベロープ配列の系統発生的関係を示す。4 2 個の H I V - 1 サブタイプ B エンベロープ配列、E Y 2 E 1 - B、E K 2 P - B、2 つのサブタイプ D、および 2 つのサブタイプ C の配列（外集団）を、系統発生的分析に含めた。幅広い試料多様性を示すサブタイプ B エンベロープ配列は、以下の 1 1 の国に由来するものであった：アルゼンチン（1）；オーストラリア（6）；中国（1）；フランス（4）；ドイツ（1）；イギリス（2）；イタリア（1）；日本（1）；オランダ（4）；スペイン（1）；アメリカ合衆国（20）。E Y 2 E 1 - B および E K 2 P - B 配列を黒色の箱の中に示した。

30

【図 3】図 3 は、エンベロープ免疫原の発現を示す。パネル A は、E Y 2 E 1 - B および E K 2 P - B 遺伝子のウェスタンブロット分析による結果を示す。R D 細胞を様々なプラスミドでトランスフェクトした。4 8 時間後に、細胞溶解物を回収した。試料をウェスタンブロットによって分析し、H I V - 1 g p 1 2 0 モノクローナル（2 G 1 2）でプローブした。対照のロードに関しては、ブロットを細片とし、モノクローナル抗アクチン抗体で再度プローブした。パネル B は、E Y 2 E 1 - B および E K 2 P - B 遺伝子の免疫蛍光アッセイによる結果を示す。エンベロープタンパク質を発現しているトランスフェクトした R D 細胞は、象徴的な赤色の蛍光を示した。H I V - 1 エンベロープ特異的モノクローナル抗体 F 1 0 5 を、一次抗体の供給源とした。

【図 4 - 1】図 4 は、免疫化したマウスの血清の中での全 I g G 抗体力価を示す。パネル A は、サブタイプ B エンベロープ特異的抗体応答の測定を示す。パネル B は、サブタイプ A / E エンベロープ特異的抗体応答の測定を示す。パネル C は、サブタイプ C エンベロープ特異的抗体応答の測定を示す。D N A 構築物 p E Y 2 E 1 - B および p E K 2 P - B での免疫化後の体液性免疫応答を、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）によって検出した。それぞれのマウスを粘膜内に 3 回、それぞれ 1 0 0 μ g の D N A で、1 週間間に 2 回の間隔で免疫化した。それぞれのグループに由来するマウス（n = 3）を、3 回目の免疫化の 1 週間後に採血し、等量ずつプールした血清をブロック緩衝液中に希釈し、材料および方法に記載したとおり分析した。p V A X で免疫化したマウスから回収したプールした血清を対照として使用した。吸光度（O D）を 4 5 0 n m で測定した。個々のデータ点は、1 つのグループあたり 3 匹のマウスの血清による 3 つの O D 値の平均を示し、値は、

40

50

3回の別々のアッセイにおいて得られたELISAの平均を示す。

【図4-2】図4は、免疫化したマウスの血清の中での全IgG抗体力価を示す。パネルAは、サブタイプBエンベロープ特異的抗体応答の測定を示す。パネルBは、サブタイプA/Eエンベロープ特異的抗体応答の測定を示す。パネルCは、サブタイプCエンベロープ特異的抗体応答の測定を示す。DNA構築物pEY2E1-BおよびpEK2P-Bでの免疫化後の体液性免疫応答を、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって検出した。それぞれのマウスを粘膜内に3回、それぞれ100 μ gのDNAで、1週間に2回の間隔で免疫化した。それぞれのグループに由来するマウス(n=3)を、3回目の免疫化の1週間後に採血し、等量ずつプールした血清をブロック緩衝液中に希釈し、材料および方法に記載したとおり分析した。pVAXで免疫化したマウスから回収したプールした血清を対照として使用した。吸光度(OD)を450nmで測定した。個々のデータ点は、1つのグループあたり3匹のマウスの血清による3つのOD値の平均を示し、値は、3回の別々のアッセイにおいて得られたELISAの平均を示す。

10

【図5-1】図5は、BalB/CマウスとHLA-A2トランスジェニックマウスのいずれにおいても、pEY2E1-Bによる細胞媒介性免疫応答の誘導を示す。pEY2E1-BおよびpEK2P-BでのDNAワクチン接種後の、脾細胞100万個あたりのサブタイプBコンセンサスエンベロープ特異的IFN- γ スポット形成細胞数(SFC)の頻度を、BalB/Cマウス(パネルA)とトランスジェニックマウス(パネルC)の両方においてELISpotアッセイによって決定した。pEY2E1-BおよびpEK2P-BでのDNAワクチン接種後の、脾細胞100万個あたりの、枯渇させたCD8、サブタイプBコンセンサスエンベロープ特異的IFN- γ スポット形成細胞の頻度もまた、BalB/Cマウス(パネルB)とトランスジェニックマウス(パネルD)の両方において決定した。脾臓を個々の免疫化したマウス(1つのグループあたり3匹)から単離し、重複しているコンセンサスサブタイプBエンベロープペプチドのプールを用いてインビトロで刺激した。基幹であるpVAXで免疫化したマウスを陰性対照として含めた。値は、IFN- γ SFCの平均+平均の標準偏差である。(パネルE)サブタイプBコンセンサスエンベロープ特異的優勢エピトープの特性決定。pEY2E1-BおよびpEK2P-Bをワクチン接種したBalB/Cマウスからそれぞれ回収した脾細胞を、29個のHIV-1サブタイプBコンセンサスエンベロープペプチドのプールとともに24時間培養した。IFN- γ を分泌している細胞を、上記のようにELISpotアッセイによって決定した。

20

30

【図5-2】図5は、BalB/CマウスとHLA-A2トランスジェニックマウスのいずれにおいても、pEY2E1-Bによる細胞媒介性免疫応答の誘導を示す。pEY2E1-BおよびpEK2P-BでのDNAワクチン接種後の、脾細胞100万個あたりのサブタイプBコンセンサスエンベロープ特異的IFN- γ スポット形成細胞数(SFC)の頻度を、BalB/Cマウス(パネルA)とトランスジェニックマウス(パネルC)の両方においてELISpotアッセイによって決定した。pEY2E1-BおよびpEK2P-BでのDNAワクチン接種後の、脾細胞100万個あたりの、枯渇させたCD8、サブタイプBコンセンサスエンベロープ特異的IFN- γ スポット形成細胞の頻度もまた、BalB/Cマウス(パネルB)とトランスジェニックマウス(パネルD)の両方において決定した。脾臓を個々の免疫化したマウス(1つのグループあたり3匹)から単離し、重複しているコンセンサスサブタイプBエンベロープペプチドのプールを用いてインビトロで刺激した。基幹であるpVAXで免疫化したマウスを陰性対照として含めた。値は、IFN- γ SFCの平均+平均の標準偏差である。(パネルE)サブタイプBコンセンサスエンベロープ特異的優勢エピトープの特性決定。pEY2E1-BおよびpEK2P-Bをワクチン接種したBalB/Cマウスからそれぞれ回収した脾細胞を、29個のHIV-1サブタイプBコンセンサスエンベロープペプチドのプールとともに24時間培養した。IFN- γ を分泌している細胞を、上記のようにELISpotアッセイによって決定した。

40

【図5-3】図5は、BalB/CマウスとHLA-A2トランスジェニックマウスのい

50

ずれにおいても、pEY2E1-Bによる細胞媒介性免疫応答の誘導を示す。pEY2E1-BおよびpEK2P-BでのDNAワクチン接種後の、脾細胞100万個あたりのサブタイプBコンセンサスエンベロープ特異的IFN- γ スポット形成細胞数(SFC)の頻度を、BalB/Cマウス(パネルA)とトランスジェニックマウス(パネルC)の両方においてELISpotアッセイによって決定した。pEY2E1-BおよびpEK2P-BでのDNAワクチン接種後の、脾細胞100万個あたりの、枯渇させたCD8⁺サブタイプBコンセンサスエンベロープ特異的IFN- γ スポット形成細胞の頻度もまた、BalB/Cマウス(パネルB)とトランスジェニックマウス(パネルD)の両方において決定した。脾臓を個々の免疫化したマウス(1つのグループあたり3匹)から単離し、重複しているコンセンサスサブタイプBエンベロープペプチドのプールを用いてインビトロで刺激した。基幹であるpVAXで免疫化したマウスを陰性対照として含めた。値は、IFN- γ SFCの平均+平均の標準偏差である。(パネルE)サブタイプBコンセンサスエンベロープ特異的優勢エピトープの特性決定。pEY2E1-BおよびpEK2P-Bをワクチン接種したBalB/Cマウスからそれぞれ回収した脾細胞を、29個のHIV-1サブタイプBコンセンサスエンベロープペプチドのプールとともに24時間培養した。IFN- γ を分泌している細胞を、上記のようにELISpotアッセイによって決定した。

10

【図6-1】図6は、BalB/CマウスとHLA-A2トランスジェニックマウスの両方において、pEY2E1-Bによって誘導された交差反応性を示す。HIV-1 MNエンベロープペプチド(パネルA)、HIV-1グループM(パネルB)、サブタイプCコンセンサスエンベロープペプチド(パネルC)、ならびに、2つのサブタイプC単離物エンベロープペプチド(パネルDおよびE)の4種類の個々のペプチドのプールに対する、pEY2E1-BおよびpEK2P-Bでのワクチン接種によって誘導されたBalB/Cマウスにおける付加的なT細胞免疫応答を、IFN- γ ELISpotアッセイによって測定した。HIV-1 MNエンベロープペプチド(パネルF)、HIV-1グループM(パネルG)、サブタイプCコンセンサスエンベロープペプチド(パネルH)、ならびに、2つのサブタイプC単離物エンベロープペプチド(パネルIおよびJ)の4種類の個々のペプチドのプールに対する、pEY2E1-BおよびpEK2P-Bでのワクチン接種によって誘導されたHLA-A2トランスジェニックマウスにおける付加的なT細胞免疫応答もまた、測定した。基幹pVAXで免疫化したマウスを陰性対照として含めた。

20

30

【図6-2】図6は、BalB/CマウスとHLA-A2トランスジェニックマウスの両方において、pEY2E1-Bによって誘導された交差反応性を示す。HIV-1 MNエンベロープペプチド(パネルA)、HIV-1グループM(パネルB)、サブタイプCコンセンサスエンベロープペプチド(パネルC)、ならびに、2つのサブタイプC単離物エンベロープペプチド(パネルDおよびE)の4種類の個々のペプチドのプールに対する、pEY2E1-BおよびpEK2P-Bでのワクチン接種によって誘導されたBalB/Cマウスにおける付加的なT細胞免疫応答を、IFN- γ ELISpotアッセイによって測定した。HIV-1 MNエンベロープペプチド(パネルF)、HIV-1グループM(パネルG)、サブタイプCコンセンサスエンベロープペプチド(パネルH)、ならびに、2つのサブタイプC単離物エンベロープペプチド(パネルIおよびJ)の4種類の個々のペプチドのプールに対する、pEY2E1-BおよびpEK2P-Bでのワクチン接種によって誘導されたHLA-A2トランスジェニックマウスにおける付加的なT細胞免疫応答もまた、測定した。基幹pVAXで免疫化したマウスを陰性対照として含めた。

40

【図6-3】図6は、BalB/CマウスとHLA-A2トランスジェニックマウスの両方において、pEY2E1-Bによって誘導された交差反応性を示す。HIV-1 MNエンベロープペプチド(パネルA)、HIV-1グループM(パネルB)、サブタイプCコンセンサスエンベロープペプチド(パネルC)、ならびに、2つのサブタイプC単離物エンベロープペプチド(パネルDおよびE)の4種類の個々のペプチドのプールに対する、pEY2E1-BおよびpEK2P-Bでのワクチン接種によって誘導されたBalB/Cマウスにおける付加的なT細胞免疫応答を、IFN- γ ELISpotアッセイに

50

よって測定した。H I V - 1 M Nエンベロープペプチド (パネル F)、H I V - 1 グループ M (パネル G)、サブタイプ C コンセンサスエンベロープペプチド (パネル H)、ならびに、2つのサブタイプ C 単離物エンベロープペプチド (パネル I および J) の4種類の個々のペプチドのプールに対する、p E Y 2 E 1 - B および p E K 2 P - B でのワクチン接種によって誘導された H L A - A 2 トランスジェニックマウスにおける付加的な T 細胞免疫応答もまた、測定した。基幹 p V A X で免疫化したマウスを陰性対照として含めた。【図 7 - 1】図 7 は、p E Y 2 E 1 - B および p E K 2 P - B で免疫化した B a l B / C マウス (パネル A) と H L A - A 2 トランスジェニックマウス (パネル B) の両方における、サブタイプ B の M N エンベロープ特異的優勢エピトープの特徴を示す。p E Y 2 E 1 - B および p E K 2 P - B をワクチン接種した B a l B / C マウスおよびトランスジェニックマウスからそれぞれ回収した脾細胞を、29種類の H I V - 1 サブタイプ B の M N エンベロープペプチドのプールとともに24時間培養した。I F N - を分泌している細胞を、上記に記載したように E L I S p o t アッセイによって決定した。

10

【図 7 - 2】図 7 は、p E Y 2 E 1 - B および p E K 2 P - B で免疫化した B a l B / C マウス (パネル A) と H L A - A 2 トランスジェニックマウス (パネル B) の両方における、サブタイプ B の M N エンベロープ特異的優勢エピトープの特徴を示す。p E Y 2 E 1 - B および p E K 2 P - B をワクチン接種した B a l B / C マウスおよびトランスジェニックマウスからそれぞれ回収した脾細胞を、29種類の H I V - 1 サブタイプ B の M N エンベロープペプチドのプールとともに24時間培養した。I F N - を分泌している細胞を、上記に記載したように E L I S p o t アッセイによって決定した。

20

【図 8】図 8 は、E 7 2 E 1 - B の機能的ドメイン (約 7 0 0 + のアミノ酸) の模式図を示す。

【図 9】図 9 は、E 7 2 E 1 - B 構築物のマップを示す。

【図 1 0】図 1 0 のパネル A および B は、強い細胞性免疫応答が E 7 2 E 1 - B によって誘導されたことを示す。

【図 1 1】図 1 1 のパネル A および B は、強く、そして幅広い交差反応性の細胞性免疫応答が E 7 2 E 1 - B によって誘導されたことを示す。

【図 1 2 - 1】図 1 2 のパネル A ~ D は、強い交差クレード (c r o s s - c l a d e) の細胞性免疫応答が E 7 2 E 1 - B によって誘導されたことを示す。

【図 1 2 - 2】図 1 2 のパネル A ~ D は、強い交差クレード (c r o s s - c l a d e) の細胞性免疫応答が E 7 2 E 1 - B によって誘導されたことを示す。

30

【図 1 3】図 1 3 は、実施例 2 の実験のために設計した免疫原を示す。

【図 1 4】図 1 4 は、系統発生的関係を示す: 36個の H I V - 1 サブタイプ C エンベロープ配列、E Y 3 E 1 - C、E K 3 P - C、2つのサブタイプ B、1つのサブタイプ A、および1つのサブタイプ (D の配列外集団) を系統発生的分析に含めた。幅広い試料多様性を示すサブタイプ C エンベロープ配列は 12 の国に由来した。

【図 1 5】図 1 5 のパネル A および B は、p E Y 3 E 1 - C によって誘発された細胞性応答の実験によるデータを示す。

【図 1 6】図 1 6 は、p E Y 3 E 1 - C によって誘発された細胞性応答の実験によるデータを示す。

40

【図 1 7 - 1】図 1 7 のパネル A ~ D は、同じクレードの中での、p E Y 3 E 1 - C によって誘発された交差反応性の細胞性応答の実験によるデータを示す。

【図 1 7 - 2】図 1 7 のパネル A ~ D は、同じクレードの中での、p E Y 3 E 1 - C によって誘発された交差反応性の細胞性応答の実験によるデータを示す。

【図 1 8】図 1 8 のパネル A および B は、p E Y 3 E 1 - C によって誘発された交差反応性の細胞性応答の実験によるデータを示す。パネル A は、サブタイプ C (ウルグアイ) e n v - 特異的 I F N - E L I S p o t によるデータを示す。パネル B は、サブタイプ C (南アフリカ) e n v - 特異的 I F N - E L I S p o t によるデータを示す。

【図 1 9 - 1】図 1 9 のパネル A ~ F は、クレード間で p E Y 3 E 1 - C によって誘発された交差反応性の細胞性応答の実験によるデータを示す。

50

【図19-2】図19のパネルA～Fは、クレード間でpEY3E1-Cによって誘発された交差反応性の細胞性応答の実験によるデータを示す。

【図19-3】図19のパネルA～Fは、クレード間でpEY3E1-Cによって誘発された交差反応性の細胞性応答の実験によるデータを示す。

【図20-1】図20のパネルA～Xは、HIV-1 gag コンセンサス構築物によって誘発された免疫応答の実験によるデータを示す。

【図20-2】図20のパネルA～Xは、HIV-1 gag コンセンサス構築物によって誘発された免疫応答の実験によるデータを示す。

【図20-3】図20のパネルA～Xは、HIV-1 gag コンセンサス構築物によって誘発された免疫応答の実験によるデータを示す。

10

【図20-4】図20のパネルA～Xは、HIV-1 gag コンセンサス構築物によって誘発された免疫応答の実験によるデータを示す。

【図20-5】図20のパネルA～Xは、HIV-1 gag コンセンサス構築物によって誘発された免疫応答の実験によるデータを示す。

【図20-6】図20のパネルA～Xは、HIV-1 gag コンセンサス構築物によって誘発された免疫応答の実験によるデータを示す。

【図20-7】図20のパネルA～Xは、HIV-1 gag コンセンサス構築物によって誘発された免疫応答の実験によるデータを示す。

【図20-8】図20のパネルA～Xは、HIV-1 gag コンセンサス構築物によって誘発された免疫応答の実験によるデータを示す。

20

【図21】図21は、生殖系上皮組織の中でのHPVの生活環を示す。

【図22】図22は、HPV-16ゲノムの構造のマップを示す。

【図23】図23は、免疫原の設計を示す：*は、p53結合および分解に重要な欠失または変異を意味する；は、Rb結合部位の中での変異を意味する。

【図24】図24は、HPV E6およびE7タンパク質のコード配列とpVAXを含む遺伝子構築物p1667と、HPV挿入断片を含まない、陰性対照として使用した基幹プラスミドの説明を含む。

【図25-1】図25のパネルA～Dは、DNA免疫原p1667によって誘導された細胞性の免疫応答を示す。

【図25-2】図25のパネルA～Dは、DNA免疫原p1667によって誘導された細胞性の免疫応答を示す。

30

【図26】図26は、免疫優勢エピトープマッピングの結果を示す。

【図27】図27は、C57/BL6マウスにおける防御を実験するための、E6/E7 DNAワクチンを使用する予防的実験による結果を示す。

【図28】図28は、C57/BL6マウスにおける防御を実験するための、E6/E7 DNAワクチンを使用した腫瘍退縮実験による結果を示す。

【図29】図29は、脾臓の中のE7テトラマー陽性リンパ球を検出する実験によるデータを示す。

【図30】図30は、腫瘍の中のE7テトラマー陽性リンパ球を検出する実験によるデータを示す。

40

【図31】図31は、トランスジェニックマウスにおけるDNAワクチン防御実験によるデータを示す。

【図32】図32は、プラスミドによってコードされるIL-12のIM同時注射、それに続くエレクトロポレーション(EP)を用いた、HIV-1コンセンサス免疫原に対する細胞性免疫応答の増強を示す。IFN ELISpotsを、(a)最初の免疫化、(b)2回目の免疫化、および(c)3回目の免疫化の2週間後に行った(他の3つと比較して見た場合)。envに対する応答を黒色の棒として示し、gagは、白色の棒として示し、データは積み重ねたグループの平均の応答±SEMとして示した。

【図33】図33は、筋肉内エレクトロポレーションを用いた交差反応性の細胞性免疫応答の増強を示す。3回の免疫化の後、pEY2E1-Bを免疫化したアカゲザルにおける

50

、H I V - 1 グループ M ペプチドの 4 つのペプチドプールに対する全 T 細胞免疫応答を、I F N E L I S p o t によって決定した。データは、積み重ねたグループの平均 \pm S E M として示す。

【図 3 4】図 3 4 は、I M エレクトロポレーションおよびプラスミド I L - 1 2 を用いた場合の、H I V - 1 免疫原に対するメモリー応答の増強を示す。最後の免疫化の 5 ヶ月後に、E L I S p o t アッセイを行って、I L - 1 2 プラスミドを用いて同時免疫を行った、および同時免疫をしなかった、I M および E P で免疫化したグループにおける、g a g および e n v に対する抗原特異的メモリー応答を決定した。データは、グループの平均応答 \pm S E M として示す。

【発明を実施するための形態】

【0077】

好ましい実施形態の詳細な説明

定義

本明細書中で使用される場合は、表現「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジェントな条件」は、核酸分子が別の核酸分子にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしないであろう条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、様々な状況において異なるであろう。より長い配列は、より高温で特異的にハイブリダイズする。一般的には、ストリンジェントな条件は、定義されたイオン強度および pH での特異的配列についての融点 (T_m) よりも約 5 低くなるように選択される。 T_m は、標的配列に相補的なプローブのうちの 50 % が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度 (定義されたイオン強度、pH、および核酸濃度下) である。標的配列は、一般的には過剰量で存在するので、 T_m では、プローブのうちの 50 % が平衡状態で占有される。通常、ストリンジェントな条件は、pH 7.0 から 8.3 で、塩濃度が約 1.0 M 未満のナトリウムイオンであり、通常は、約 0.01 から 1.0 M のナトリウムイオン (または他の塩) であり、温度は、短いプローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチド (例えば、10 から 50 ヌクレオチド) については、少なくとも約 30 であり、より長いプローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチドについては少なくとも約 60 である。ストリンジェントな条件はまた、脱安定化剤 (例えば、ホルムアミド) の添加によって得られる場合もある。

【0078】

ヌクレオチドおよびアミノ酸についての配列相同性は、FASTA、BLAST、および Gapped BLAST (Altschulら、Nuc. Acids Res., 1997, 25, 3389, これはその全体が引用により本明細書中に組み入れられる)、ならびに、PAUP* 4.0b10 ソフトウェア (D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts) を使用して決定することができる。「類似性の割合 (%)」は、PAUP* 4.0b10 ソフトウェア (D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts) を使用して計算される。コンセンサス配列についての類似性の平均は、系統樹のすべての配列と比較して計算される (図 2 および 14 を参照のこと)。

【0079】

簡単に説明すると、BLAST アルゴリズム (これは、Basic Local Alignment Search Tool を意味する) が配列類似性の決定に適している (Altschulら、J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410, これはその全体が引用により本明細書中に組み入れられる)。BLAST 分析を実行するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を通じて公表されている。このアルゴリズムには、データベース配列中の同じ長さの言語とアラインメントされた場合にいくつかの陽的な値のスコア閾値 T と適合するかまたはそれを満たす、照会配列 (query sequence) 中の長さ W の短い言語を同定することにより、最初に高スコアの配列対 (HSP) を同定することが含まれる。 T は

10

20

30

40

50

、隣接ワードスコア閾値 (neighborhood word score threshold) (Altschulら、前出) と呼ばれる。これらの最初の隣接ワードのヒットを、HSPが含まれているものを見つけるための検索を開始するための種とする。ワードのヒットは、累積アルゴリズムスコアを増大させることができる限り、それぞれの配列に沿って両方向に伸張させられる。それぞれの方向でのワードのヒットの伸張は、以下の場合に停止する：1) 累積アルゴリズムスコアが、その最大達成値よりも量 X 下がった時；2) 1つ以上の陰性にスコアされる残基のアラインメントの蓄積が原因で、累積スコアがゼロまたはそれ未満になった時；あるいは、3) 配列のいずれかの末端に到達した時。Blastアルゴリズムのパラメーター W 、 T 、および X は、アラインメントの感度と速度を決定する。Blastプログラムでは、デフォルトとして、11のワード長 (W)、50のBLOSUM62スコアリングマトリックス (Henikoffら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 10915-10919を参照のこと、これはその全体が引用により本明細書中に組み入れられる) アラインメント (B)、10の期待値 (E)、 $M=5$ 、 $N=4$ 、および両方の鎖の比較が使用される。BLASTアルゴリズム (Karlinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873-5787、これはその全体が引用により本明細書中に組み入れられる) と、Gapped BLASTは、2つの配列間での類似性の統計学的分析を行う。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの測定値は、最小合計確立 (smallest sum probability) ($P(N)$) であり、これにより、2つのヌクレオチド配列間での適合が偶然に起こる確立の目安が提供される。例えば、核酸は、他の核酸に対する試験の比較において最小合計確立が約1未満、好ましくは、約0.1未満、より好ましくは、約0.01未満、そして最も好ましくは、約0.001未満である場合に、別のものに対して類似であると考えられる。

【0080】

本明細書中で使用される場合は、用語「遺伝子構築物」は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むDNAまたはRNA分子をいう。コード配列には、核酸分子が投与される個体の細胞の中で発現を指示することができるプロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントに対して動作可能であるように連結させられた、開始および終結シグナルが含まれる。

【0081】

本明細書中で使用される場合は、「～から発現させることができる」は、個体の細胞の中に存在する場合には、コード配列が発現させられるように、タンパク質をコードするコード配列に対して動作可能であるように連結させられた必須の調節エレメントを含む遺伝子構築物をいう。

【0082】

概要

本発明により、免疫原によって誘導される細胞性の免疫応答を増強させるための多段階のストラテジー (multi-phase strategy) を利用することによる、改良されたワクチンが提供される。免疫原についての改変されたコンセンサス配列が作成された。コドン最適化、RNA最適化、および構築物の免疫原性を高めるための高効率の免疫グロブリンリーダー配列の付加を含む遺伝子の改変もまた開示される。新規の免疫原は、対応するコドン最適化された免疫原よりも、強く、そして幅広い細胞性の免疫応答を誘発するように設計されている。

【0083】

本発明により、改良されたHIV、HPV、HCV、インフルエンザ、およびガンワクチンが提供される。これは、それぞれ、それに対して抗HIV、抗HPV、抗HCV、抗インフルエンザ、および抗hTert免疫応答を誘導することができる免疫原として、それらを特に有効にするエピトープを含むタンパク質、ならびにそのようなタンパク質をコードする遺伝子構築物を提供することによる。したがって、治療的または予防的免疫応答を誘導するためのワクチンを提供することができる。いくつかの実施形態においては、免疫

原を送達するための手段は、DNAワクチン、組み換え体ワクチン、タンパク質サブユニットワクチン、免疫原を含む組成物、弱毒化ワクチン、または死滅ワクチンである。いくつかの実施形態においては、ワクチンには、以下からなる群より選択される組み合わせが含まれる：1つ以上のDNAワクチン、1つ以上の組み換え体ワクチン、1つ以上のタンパク質サブユニットワクチン、免疫原を含む1つ以上の組成物、1つ以上の弱毒化ワクチン、および1つ以上の死滅ワクチン。

【0084】

本発明のいくつかの実施形態にしたがうと、本発明のワクチンは、個体の免疫系の活性を調節し、それにより、HIV、HPV、HCV、インフルエンザ、またはHERTに対する免疫応答を増進するために、個体に送達される。タンパク質をコードする核酸分子が個体の細胞によって取り込まれると、ヌクレオチド配列が細胞の中で発現され、それにより、タンパク質が個体に送達される。本発明の複数の態様により、核酸分子（例えば、プラスミド）上のタンパク質のコード配列を、組み換え体ワクチンの一部として、そして弱毒化ワクチンの一部として、単離されたタンパク質として、またはベクターのタンパク質部分として送達する方法が提供される。

10

【0085】

本発明のいくつかの態様にしたがうと、HIV、HPV、HCV、インフルエンザ、およびガンに対して個体を予防的ならびに/または治療的に免疫化する組成物と方法が提供される。

【0086】

本発明は、調節エレメントに動作可能であるように連結させられた本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれている核酸分子を送達するための組成物に関する。本発明の複数の態様は、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれている組成物組み換え体ワクチン；本発明のタンパク質をコードする、および/または本発明のタンパク質を含む生の弱毒化された病原体；本発明のタンパク質を含む死滅させられた病原体；あるいは、本発明のタンパク質を含むリポソームまたはサブユニットワクチンのような組成物に関する。本発明はさらに、複数の組成物が含まれている注射することができる薬学的組成物に関する。

20

【0087】

HIV

本発明により、HIV免疫原によって誘導される細胞性免疫応答を増進するための多段階の戦略を利用することによる、改良された抗HIVワクチンが提供される。免疫原についての改変されたコンセンサス配列が作成された。コドン最適化、RNA最適化、および構築物の免疫原性を高めるための高効率の免疫グロブリンリーダー配列の付加を含む遺伝子の改変もまた開示される。新規の免疫原は、対応するコドン最適化された免疫原よりも、強く、そして幅広い細胞性の免疫応答を誘発するように設計されている。

30

【0088】

配列番号1は、サブタイプAのコンセンサスエンベロープDNA配列構築物である。配列番号1には、HIVワクチン配列のコード配列が含まれる。これには、サブタイプAエンベロープタンパク質についてのコンセンサス配列に対して連結させられたIgEリーダー配列が含まれる。配列番号2には、HIVワクチン配列構築物のアミノ酸配列が含まれる。これには、サブタイプAのエンベロープタンパク質についてのコンセンサス配列に対して連結させられたIgEリーダー配列が含まれる。IgEリーダー配列は配列番号15である。配列番号16は、サブタイプAのコンセンサスエンベロープタンパク質配列である。

40

【0089】

いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号16、その断片、配列番号16をコードする核酸分子、またはその断片が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号2またはそれをコードする核酸分子が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号1が含まれることが好ましい。本発明のワクチンには、IgEリーダー配列であ

50

る配列番号 15、またはそれをコードする核酸配列が含まれることが好ましい。

【0090】

配列番号 1 の断片には、90 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 1 の断片には、180 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、270 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、360 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、450 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、540 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、630 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、720 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、810 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、900 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、990 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1080 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1170 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1260 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1350 個またはそれ以上のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1440 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1530 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1620 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1710 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1800 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1890 個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1980 個またはそれ以上のヌクレオチド；そして、いくつかの実施形態においては、2070 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 1 の断片には、IgE リーダー配列のコード配列が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 1 の断片には、IgE リーダー配列のコード配列は含まれない。断片には、180 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、270 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、360 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、450 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、540 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、630 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、720 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、810 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、900 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、990 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1080 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1170 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1260 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1350 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1440 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1530 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1620 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1710 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1800 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1890 個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1980 個未満のヌクレオチド、そしていくつかの実施形態においては、2070 個未満のヌクレオチドが含まれる場合がある。

【0091】

配列番号 2 の断片には、30 個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 2 の断片には、60 個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、90 個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、120 個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、150 個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、180 個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、210 個またはそれ以上のアミノ酸；いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態においては、240個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、270個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、300個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、330個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、360個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、390個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、420個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、450個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、480個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、510個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、540個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、570個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、600個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、630個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、660個またはそれ以上のアミノ酸；そして、いくつかの実施形態においては、690個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。断片には、90個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、120個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、150個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、180個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、210個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、240個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、270個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、300個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、330個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、360個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、390個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、420個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、450個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、480個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、540個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、600個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、660個未満のアミノ酸、そして、いくつかの実施形態においては、690個未満のアミノ酸が含まれる場合がある。

10

20

【0092】

配列番号3は、サブタイプBのコンセンサスエンベロープDNA配列構築物である。配列番号3には、HIVワクチン配列のコード配列が含まれる。これには、サブタイプBエンベロープタンパク質についてのコンセンサス配列に対して連結させられたIgEリーダー配列が含まれる。配列番号4には、HIVワクチン配列構築物のアミノ酸配列が含まれる。これには、サブタイプBのエンベロープタンパク質についてのコンセンサス配列に対して連結させられたIgEリーダー配列が含まれる。IgEリーダー配列は配列番号15である。配列番号17は、サブタイプBのコンセンサスエンベロープタンパク質配列である。

30

【0093】

いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号17、その断片、配列番号17をコードする核酸分子、またはその断片が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号4またはそれをコードする核酸分子が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号3が含まれることが好ましい。本発明のワクチンには、IgEリーダー配列である配列番号15、またはそれをコードする核酸配列が含まれることが好ましい。

40

【0094】

配列番号3の断片には、90個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号3の断片には、180個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、270個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、360個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、450個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、540個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、630個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、720個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、810個またはそれ以上のヌクレオチ

50

のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、210個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、240個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、270個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、300個またはそれ以上のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、330個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、360個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、390個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、420個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、450個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、480個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、510個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、540個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、570個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、600個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、630個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、660個またはそれ以上のアミノ酸；そして、いくつかの実施形態においては、690個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。断片には、90個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、120個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、150個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、180個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、210個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、240個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、270個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、300個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、330個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、360個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、390個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、420個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、450個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、480個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、540個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、600個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、660個未満のアミノ酸、そして、いくつかの実施形態においては、690個未満のアミノ酸が含まれる場合がある。

10

20

【0096】

配列番号5は、サブタイプCのコンセンサスエンペロープDNA配列構築物である。配列番号5には、HIVワクチン配列のコード配列が含まれる。これには、サブタイプCエンペロープタンパク質についてのコンセンサス配列に対して連結させられたIgEリーダー配列が含まれる。配列番号6には、HIVワクチン配列構築物のアミノ酸配列が含まれる。これには、サブタイプCのエンペロープタンパク質についてのコンセンサス配列に対して連結させられたIgEリーダー配列が含まれる。IgEリーダー配列は配列番号15である。配列番号18は、サブタイプCのコンセンサスエンペロープタンパク質配列である。

30

【0097】

いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号18、その断片、配列番号18をコードする核酸分子、またはその断片が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号6またはそれをコードする核酸分子が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号5が含まれることが好ましい。本発明のワクチンには、IgEリーダー配列である配列番号15、またはそれをコードする核酸配列が含まれることが好ましい。

40

【0098】

配列番号5の断片には、90個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号5の断片には、180個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、270個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、360個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、450個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、540個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、630個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、720個またはそれ以上

50

おいては、570個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、600個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、630個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、660個またはそれ以上のアミノ酸；そして、いくつかの実施形態においては、690個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。断片には、90個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、120個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、150個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、180個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、210個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、240個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、270個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、300個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、330個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、360個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、390個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、420個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、450個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、480個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、540個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、600個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、660個未満のアミノ酸、そして、いくつかの実施形態においては、690個未満のアミノ酸が含まれる場合がある。

10

【0100】

配列番号7は、サブタイプDのコンセンサスエンベロープDNA配列構築物である。配列番号7には、HIVワクチン配列のコード配列が含まれる。これには、サブタイプDエンベロープタンパク質についてのコンセンサス配列に対して連結させられたIgEリーダー配列が含まれる。配列番号8には、HIVワクチン配列構築物のアミノ酸配列が含まれる。これには、サブタイプDのエンベロープタンパク質についてのコンセンサス配列に対して連結させられたIgEリーダー配列が含まれる。IgEリーダー配列は配列番号15である。配列番号19は、サブタイプDのコンセンサスエンベロープタンパク質配列である。

20

【0101】

いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号19、その断片、配列番号19をコードする核酸分子、またはその断片が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号8またはそれをコードする核酸分子が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号7が含まれることが好ましい。本発明のワクチンには、IgEリーダー配列である配列番号15、またはそれをコードする核酸配列が含まれることが好ましい。

30

【0102】

配列番号7の断片には、90個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号7の断片には、180個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、270個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、360個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、450個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、540個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、630個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、720個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、810個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、900個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、990個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1080個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1170個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1260個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1350個またはそれ以上のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1440個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1530個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1620個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1710個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態に

40

50

個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、330個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、360個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、390個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、420個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、450個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、480個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、540個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、600個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、660個未満のアミノ酸、そして、いくつかの実施形態においては、690個未満のアミノ酸が含まれる場合がある。

【0104】

配列番号9は、サブタイプB Nef - RevのコンセンサスエンベロープDNA配列構築物である。配列番号9には、HIVワクチン配列のコード配列が含まれる。これには、サブタイプB Nef - Revタンパク質についてのコンセンサス配列に対して連結させられたIgEリーダー配列が含まれる。配列番号10には、HIVワクチン配列構築物のアミノ酸配列が含まれる。これには、サブタイプB Nef - Revのタンパク質についてのコンセンサス配列に対して連結させられたIgEリーダー配列が含まれる。IgEリーダー配列は配列番号15である。配列番号20は、サブタイプB Nef - Revのコンセンサスタンパク質配列である。

10

【0105】

いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号20、その断片、配列番号20をコードする核酸分子、またはその断片が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号10またはそれをコードする核酸分子が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号9が含まれることが好ましい。本発明のワクチンには、IgEリーダー配列である配列番号15、またはそれをコードする核酸配列が含まれることが好ましい。

20

【0106】

配列番号9の断片には、90個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号9の断片には、180個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、270個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、360個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、450個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、540個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、630個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、720個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、810個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、900個またはそれ以上のヌクレオチド；そして、いくつかの実施形態においては、990個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号9の断片には、IgEリーダー配列のコード配列が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号9の断片には、IgEリーダー配列のコード配列は含まれない。断片には、180個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、270個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、360個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、450個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、540個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、630個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、720個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、810個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、900個未満のヌクレオチド、そして、いくつかの実施形態においては、990個未満のヌクレオチドが含まれる場合がある。

30

40

【0107】

配列番号2の断片には、30個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号2の断片には、60個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、90個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、120個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、150

50

個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、180個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、210個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、240個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、270個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、300個またはそれ以上のアミノ酸；そして、いくつかの実施形態においては、330個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。

【0108】

配列番号11は、サブタイプA、B、C、およびDのDNA配列構築物のGagコンセンサスDNA配列である。配列番号11には、HIVワクチン配列のコード配列が含まれる。これには、GagコンセンサスサブタイプA、B、C、およびDタンパク質のコンセンサス配列に対して連結させられたIgeリーダー配列が含まれる。配列番号12には、HIVワクチン配列構築物のアミノ酸配列が含まれる。これには、GagサブタイプA、B、C、およびDタンパク質のコンセンサス配列に対して連結させられたIgeリーダー配列が含まれる。Igeリーダー配列は配列番号15である。配列番号21は、コンセンサスGagサブタイプA、B、C、およびDタンパク質配列である。

10

【0109】

いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号21、その断片、配列番号21をコードする核酸分子、またはその断片が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号12またはそれをコードする核酸分子が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号11が含まれることが好ましい。本発明のワクチンには、Igeリーダー配列である配列番号15、またはそれをコードする核酸配列が含まれることが好ましい。

20

【0110】

配列番号11の断片には、90個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号11の断片には、180個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、270個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、360個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、450個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、540個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、630個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、720個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、810個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、900個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、990個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1080個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1170個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1260個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1350個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1440個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1530個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1620個またはそれ以上のヌクレオチド；いくつかの実施形態においては、1710個またはそれ以上のヌクレオチド；そして、いくつかの実施形態においては、1800個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号11の断片には、Igeリーダー配列のコード配列が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号11の断片には、Igeリーダー配列のコード配列は含まれない。断片には、180個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、270個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、360個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、450個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、540個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、630個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、720個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、810個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、900個未満のヌクレオチド、いくつかの実

30

40

50

施形態においては、990個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1080個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1170個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1260個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1350個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1440個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1530個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1620個未満のヌクレオチド、いくつかの実施形態においては、1710個未満のヌクレオチド、そして、いくつかの実施形態においては、1800個未満のヌクレオチドが含まれる場合がある。

【0111】

配列番号12の断片には、30個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号12の断片には、60個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、90個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、120個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、150個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、180個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、210個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、240個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、270個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、300個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、330個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、360個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、390個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、420個またはそれ以上のアミノ酸；いくつかの実施形態においては、450個またはそれ以上のアミノ酸；そして、いくつかの実施形態においては、510個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。断片には、90個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、120個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、150個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、180個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、210個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、240個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、270個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、300個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、330個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、360個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、390個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、420個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、450個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、480個未満のアミノ酸、そして、いくつかの実施形態においては、510個未満のアミノ酸が含まれる場合がある。

【0112】

HPV

配列番号22には、HPVワクチン配列のコード配列が含まれる。これには、IgEリーダー配列、タンパク質分解的切断される配列によりHPV E7についてのコンセンサス配列に対して連結させられたHPV E6についてのコンセンサス配列が含まれる。HPV E6についてのコンセンサス配列には、配列番号24に示される免疫優勢エピトープが含まれる。HPV E7についてのコンセンサス配列には、配列番号25に示される免疫優勢エピトープが含まれる。HPV E6についてのコンセンサス配列は配列番号26である。HPV E6についてのコンセンサス配列は配列番号27である。IgEリーダー配列は配列番号28である。2つのコンセンサス配列を連結させるために有用なタンパク質分解的切断される配列は配列番号29である。

【0113】

いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号24および/または配列番号25、あるいは、それらの両方のうちの一方をコードする核酸配列が含まれることが好ましい。本発明のワクチンには、配列番号27および/または配列番号28、あるいは、それらの両方のうちの一方をコードする核酸配列が含まれることが好ましい。本発明

10

20

30

40

50

のワクチンには、配列番号 29 のようなタンパク質分解的切断される配列によって配列番号 28 に連結させられた配列番号 27、または融合タンパク質をコードする核酸配列が含まれることが好ましい。本発明のワクチンには、IgE リーダー配列である配列番号 28、またはそれをコードする核酸配列が含まれることが好ましい。本発明のワクチンには、配列番号 23、または配列番号 22 の中の核酸配列が含まれることが好ましい。

【0114】

いくつかの実施形態においては、タンパク質には、配列番号 23 の断片が含まれる。いくつかの実施形態においては、タンパク質は、配列番号 23 の断片からなる。いくつかの実施形態においては、核酸には、配列番号 22 の断片が含まれる。いくつかの実施形態においては、核酸は、配列番号 22 の断片からなる。

【0115】

配列番号 22 の断片には、30 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、45 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、60 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、75 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、90 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、120 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、150 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、180 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、210 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、240 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、270 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、300 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、360 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、420 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、480 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、540 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、600 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 22 の断片には、300 個また

10

20

30

40

50

場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 23 の断片には、90 個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 23 の断片には、120 個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 23 の断片には、150 個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 23 の断片には、180 個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 23 の断片には、210 個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 23 の断片には、240 個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 23 の断片には、260 個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合があり、これには、免疫優勢エピトープをコードする配列が含まれることが好ましい。いくつかの実施形態においては、配列番号 23 の断片には、I g E リーダー配列のコード配列が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 23 の断片には、I g E リーダー配列のコード配列は含まれない。断片には、24 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、30 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、36 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、42 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、48 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、54 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、60 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、72 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、90 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、120 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、150 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、180 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、210 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、240 個未満のアミノ酸、そして、いくつかの実施形態においては、260 個未満のアミノ酸が含まれる場合がある。

【0117】

H C V

配列番号 30 には、H C V ワクチン配列のコード配列が含まれる。これには、I g E リーダー配列、タンパク質分解的切断される配列によって H C V E 2 についてのコンセンサス配列に対して連結させられた H C V E 1 についてのコンセンサス配列が含まれる。H C V E 1 についてのコンセンサス配列は配列番号 32 である。H C V E 2 についてのコンセンサス配列は配列番号 33 である。

【0118】

いくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号 32 および / または配列番号 33、またはそれらの両方のうちの一方をコードする核酸配列が含まれることが好ましい。本発明のワクチンには、配列番号 29 のようなタンパク質分解的切断される配列によって配列番号 33 に連結させられた配列番号 32、または融合タンパク質をコードする核酸配列が含まれることが好ましい。本発明のワクチンには、I g E リーダー配列である配列番号 28、またはそれをコードする核酸配列が含まれることが好ましい。本発明のワクチンには、配列番号 31、または配列番号 30 の中の核酸配列が含まれることが好ましい。

【0119】

本発明のいくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号 30、ならびに、配列番号 34、配列番号 35、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される核酸配列、またはそれらの核酸配列によってコードされるアミノ酸配列が含まれる。

いては、配列番号 31 の断片には、420 個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 31 の断片には、480 個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 31 の断片には、540 個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 31 の断片には、575 個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。断片には、30 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、45 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、60 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、75 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、90 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、120 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、150 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、180 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、210 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、240 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、270 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、300 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、360 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、420 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、480 個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、540 個未満のアミノ酸、そして、いくつかの実施形態においては、575 個未満のアミノ酸が含まれる場合がある。

10

【0122】

h T E R T

h T E R T はヒトテロメラーゼ逆転写酵素であり、これは、テロメラーゼの末端上に T T A G G G タグを合成して、染色体が短くなることが原因である細胞死を防ぐ。h T E R T の異常な高発現を行っている過剰増殖性の細胞は、免疫治療により標的化される場合がある。最近の実験はまた、H C V または H P V に感染した過剰増殖性の細胞の異常な h T E R T 発現をサポートしている。したがって、H P V および H C V の両方に対する免疫療法は、異常なレベルで h T E R T を発現する細胞を標的化することによって増強できる場合がある。

20

【0123】

最近の実験は、h T E R T 遺伝子でトランスフェクトされた樹状細胞の中での h T E R T の発現が C D 8 + 細胞傷害性 T 細胞を誘導することができ、そして抗原特異的様式で C D 4 + T 細胞を誘発できることを明らかに示している。したがって、老化を遅らせ、そして選択された抗原を提示するそれらの能力を維持するための、抗原提示細胞 (A P C) の中での h T E R T 発現の使用は、新しい免疫療法の方法の開発において魅力的である。

30

【0124】

本発明のいくつかの実施形態にしたがうと、免疫原に対して個体の中で免疫応答を誘導する方法には、h T E E R タンパク質およびその機能的断片またはその発現され得るコード配列を、本発明のタンパク質をコードする単離された核酸分子および/または本発明のタンパク質をコードする組み換え体ワクチンおよび/または本発明のタンパク質のサブユニットワクチンおよび/または生の弱毒化ワクチンおよび/または死滅ワクチンと組み合わせ、個体に対して投与する工程が含まれる。

【0125】

本発明のいくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、本発明のワクチンには、配列番号 30 と、以下からなる群より選択される核酸配列またはそれらの核酸配列によってコードされるアミノ酸配列が含まれる：配列番号 34、配列番号 35、およびそれらの任意の組み合わせ。本発明のいくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号 34 または配列番号 35 が含まれる。配列番号 34 には h T E R T をコードする核酸配列が含まれる。配列番号 35 には h T E R T のアミノ酸配列が含まれる。

40

【0126】

本発明のいくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号 22 と、配列番号 34 または配列番号 35 が含まれる。h T E R T をコードする核酸配列、および/または h T E R T のタンパク質を、H P V 免疫原と組み合わせ使用することにより、H P

50

つかの実施形態においては、290個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、320個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、350個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、380個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、410個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、440個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、470個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、500個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、530個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、560個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、590個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、620個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、650個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、680個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、710個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、740個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、770個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、800個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、830個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、860個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、890個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、920個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、950個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、980個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1010個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1040個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1070個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1200個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1230個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1260個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1290個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1320個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1350個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1380個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1410個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1440個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、1470個未満のアミノ酸、そして、いくつかの実施形態においては、1500個未満のアミノ酸が含まれる場合がある。

【0129】

インフルエンザ

本発明のいくつかの実施形態にしたがうと、免疫原に対して個体の中で免疫応答を誘導する方法には、インフルエンザ株H5N1ヘマグルチニン(HA)タンパク質およびその機能的断片またはその発現され得るコード配列を、本発明のタンパク質をコードする単離された核酸分子および/または本発明のタンパク質をコードする組み換え体ワクチンおよび/または本発明のタンパク質のサブユニットワクチンおよび/または生の弱毒化ワクチンおよび/または死滅ワクチンと組み合わせて、個体に対して投与する工程が含まれる。いくつかの実施形態においては、インフルエンザワクチン組成物および方法には、複数のインフルエンザウイルス種に由来するHAタンパク質をコードする核酸配列の使用が含まれる。いくつかの実施形態においては、インフルエンザワクチン組成物および方法には、インフルエンザウイルス株H1N5由来のHAをコードする核酸配列と、以下からなる群より選択されるインフルエンザタンパク質をコードする核酸配列の使用が含まれる：配列番号38、配列番号40、および配列番号42。本発明のいくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号36または配列番号37が含まれる。配列番号36には、インフルエンザウイルスのH1N5 HAをコードする核酸配列が含まれる。配列番号37には、インフルエンザウイルスのH1N5 HAのアミノ酸配列が含まれる。本発明のいくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号38または配列番号39が含まれる。配列番号38には、インフルエンザH1N1およびH5N1 NAコンセンサス配列をコードする核酸配列が含まれる。配列番号39には、インフルエンザH1N1およびH5N1 NAコンセンサス配列のアミノ酸配列が含まれる。本発明のいくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号40または配列番号41が含まれる。配列番号40には、インフルエンザH1N1およびH5N1 M1コンセンサス

10

20

30

40

50

配列をコードする核酸配列が含まれる。配列番号 4 1 には、インフルエンザ H 1 N 1 および H 5 N 1 M 1 コンセンサス配列のアミノ酸配列が含まれる。本発明のいくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号 4 2 または配列番号 4 3 が含まれる。配列番号 4 2 には、インフルエンザ H 5 N 1 M 2 E - N P コンセンサス配列をコードする核酸配列が含まれる。配列番号 4 3 には、インフルエンザ H 5 N 1 M 2 E - N P コンセンサス配列のアミノ酸配列が含まれる。本発明のいくつかの実施形態においては、本発明のワクチンには、配列番号 3 6 と、以下の群より選択される配列が含まれる：配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、およびそれらの任意の組み合わせ。インフルエンザウイルス株 H 5 N 1 H A についてのコンセンサス配列には、配列番号 3 6 に示される免疫優勢エピトープが含まれる。配列番号 3 6 によってコードされるインフルエンザウイルス H 5 N 1 H A のアミノ酸配列は配列番号 3 7 である。インフルエンザウイルス H 1 N 1 / H 5 N 1 N A についてのコンセンサス配列には、配列番号 3 8 に示される免疫優勢エピトープが含まれる。配列番号 3 8 によってコードされるインフルエンザウイルス株 H 1 N 1 / H 5 N 1 N A のアミノ酸配列は配列番号 3 9 である。インフルエンザウイルス株 H 1 N 1 / H 5 N 1 M 1 についてのコンセンサス配列は、配列番号 4 0 に示される免疫優勢エピトープが含まれる。配列番号 4 0 によってコードされるインフルエンザウイルス H 1 N 1 / H 5 N 1 M 1 アミノ酸配列は配列番号 4 1 である。インフルエンザウイルス H 5 N 1 M 2 E - N P についてのコンセンサス配列には、配列番号 4 2 に示される免疫優勢エピトープが含まれる。配列番号 4 2 によってコードされるインフルエンザウイルス H 5 N 1 M 2 E - N P のアミノ酸配列は配列番号 4 3 である。本発明のワクチンには、上記で定義された核酸分子によってコードされるタンパク質産物、または任意のタンパク質断片が含まれる場合がある。

【 0 1 3 0 】

配列番号 3 6 の断片には、3 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、4 5 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、6 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、7 5 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、9 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、1 2 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、1 5 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、1 8 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、2 1 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、2 4 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、2 7 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、3 0 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、3 6 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、4 2 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、4 8 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、5 4 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、6 0 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、6 6 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号 3 6 の断片には、7 2 0 個またはそれ以上のヌクレオチドが含まれる場合

10

20

30

40

50

オチド、いくつかの実施形態においては、1680個未満のヌクレオチド、そして、いくつかの実施形態においては、1740個未満のヌクレオチドが含まれる場合がある。

【0131】

配列番号37の断片には、15個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、30個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、45個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、60個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、75個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、90個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、105個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、120個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、150個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、180個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、210個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、240個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、270個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、300個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、360個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、420個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、480個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、540個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。いくつかの実施形態においては、配列番号37の断片には、565個またはそれ以上のアミノ酸が含まれる場合がある。配列番号37の断片には、30個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、45個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、60個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、75個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、90個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、120個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、150個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、180個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、210個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、240個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、270個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、300個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、360個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、420個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、480個未満のアミノ酸、いくつかの実施形態においては、540個未満のアミノ酸、そして、いくつかの実施形態においては、565個未満のアミノ酸が含まれる場合がある。

【0132】

本発明のいくつかの実施形態にしたがうと、免疫原に対して個体の中で免疫応答を誘導する方法には、インフルエンザ株H1N1およびインフルエンザ株H5N1のHAタンパク質、ならびに、その機能的断片またはその発現され得るコード配列を、本発明のタンパク質をコードする単離された核酸分子および/または本発明のタンパク質をコードする組み換え体ワクチンおよび/または本発明のタンパク質のサブユニットワクチンおよび/または生の弱毒化ワクチンおよび/または死滅ワクチンと組み合わせて、個体に対して投与する工程が含まれる。

【0133】

本発明のいくつかの実施形態にしたがうと、免疫原に対して個体の中で免疫応答を誘導す

10

20

30

40

50

る方法には、インフルエンザ株 H 1 N 1 およびインフルエンザ株 H 5 N 1 の M 1 タンパク質、ならびに、その機能的断片またはその発現され得るコード配列を、本発明のタンパク質をコードする単離された核酸分子および/または本発明のタンパク質をコードする組み換え体ワクチンおよび/または本発明のタンパク質のサブユニットワクチンおよび/または生の弱毒化ワクチンおよび/または死滅ワクチンと組み合わせて、個体に対して投与する工程が含まれる。

【 0 1 3 4 】

本発明のいくつかの実施形態にしたがうと、免疫原に対して個体の中で免疫応答を誘導する方法には、インフルエンザ株 H 5 N 1 の M 2 E - N P タンパク質、およびその機能的断片またはその発現され得るコード配列を、本発明のタンパク質をコードする単離された核酸分子および/または本発明のタンパク質をコードする組み換え体ワクチンおよび/または本発明のタンパク質のサブユニットワクチンおよび/または生の弱毒化ワクチンおよび/または死滅ワクチンと組み合わせて、個体に対して投与する工程が含まれる。

10

【 0 1 3 5 】

ワクチン

本発明により、それに対する免疫応答を誘導することができる免疫原としてそれらを特に有効にするエピトープを含むタンパク質、ならびにそのようなタンパク質をコードする遺伝子構築物を提供することにより、改良されたワクチンが提供される。したがって、治療的または予防的免疫応答を誘導するためのワクチンを提供することができる。いくつかの実施形態においては、免疫原を送達するための手段は、DNA ワクチン、組み換え体ワクチン、タンパク質サブユニットワクチン、免疫原を含む組成物、弱毒化ワクチン、または死滅ワクチンである。いくつかの実施形態においては、ワクチンには、以下からなる群より選択される組み合わせが含まれる：1つ以上のDNA ワクチン、1つ以上の組み換え体ワクチン、1つ以上のタンパク質サブユニットワクチン、免疫原を含む1つ以上の組成物、1つ以上の弱毒化ワクチン、および1つ以上の死滅ワクチン。

20

【 0 1 3 6 】

本発明のいくつかの実施形態にしたがうと、本発明のワクチンは、個体の免疫系の活性を調節し、それにより、免疫応答を増進するために個体に送達される。タンパク質をコードする核酸分子は個体の細胞によって取り込まれると、ヌクレオチド配列が細胞の中で発現され、それにより、タンパク質が個体に送達される。本発明の複数の態様により、核酸分子（例えば、プラスミド）上のタンパク質のコード配列を、組み換え体ワクチンの一部として、そして弱毒化ワクチンの一部として、単離されたタンパク質として、またはベクターのタンパク質部分として送達する方法が提供される。

30

【 0 1 3 7 】

本発明のいくつかの態様にしたがうと、個体を予防的および/または治療的に免疫化する組成物と方法が提供される。

【 0 1 3 8 】

DNA ワクチンは、米国特許第 5, 593, 972 号、同第 5, 739, 118 号、同第 5, 817, 637 号、同第 5, 830, 876 号、同第 5, 962, 428 号、同第 5, 981, 505 号、同第 5, 580, 859 号、同第 5, 703, 055 号、同第 5, 676, 594 号、およびその中で引用されている先行出願に記載されている。これらはそれぞれが引用により本明細書中に組み入れられる。これらの出願の中に記載されている送達プロトコールに加えて、DNA の別の送達方法が、米国特許第 4, 945, 050 号および同第 5, 036, 006 号に記載されている。これらはいずれも引用により本明細書中に組み入れられる。

40

【 0 1 3 9 】

本発明は、改良された弱毒化生ワクチン、改良された死滅ワクチン、ならびに、抗原をコードする外来遺伝子を送達するために組み換え体ベクターを使用する改良されたワクチン、ならびに、サブユニットワクチンおよび糖タンパク質ワクチンに関する。外来抗原を送達するために組み換え体ベクターを使用する弱毒化生ワクチン、サブユニットワクチン、

50

および糖タンパク質ワクチンの例は、以下の米国特許に記載されている：

【 0 1 4 0 】

【 化 1 】

4,510,245; 4,797,368; 4,722,848;
 4,790,987; 4,920,209; 5,017,487; 5,077,044; 5,110,587; 5,112,749; 5,174,993; 5,223,424;
 5,225,336; 5,240,703; 5,242,829; 5,294,441; 5,294,548; 5,310,668; 5,387,744; 5,389,368;
 5,424,065; 5,451,499; 5,453,364; 5,462,734; 5,470,734; 5,474,935; 5,482,713; 5,591,439;
 5,643,579; 5,650,309; 5,698,202; 5,955,088; 6,034,298; 6,042,836; 6,156,319 および 6,589,529

10

これらはそれぞれが引用により本明細書中に組み入れられる。

【 0 1 4 1 】

細胞によって取り込まれると、遺伝子構築物（単数または複数）は、機能性の染色体外分子として細胞の中に留まる場合も、そして/または細胞の染色体DNAの中に組み込まれる場合もある。DNAは、これがプラスミド（単数または複数）の形態で別の遺伝的材料として留まる場合には、細胞に導入され得る。あるいは、染色体に組み込むことができる直鎖状DNAは細胞に導入することができる。細胞内にDNAが導入される場合には、染色体へのDNAの組み込みを促進する試薬が加えられる場合がある。組み込みを促進させるために有用なDNA配列もまた、DNA分子に含められる場合がある。あるいは、RNAが細胞に投与される場合がある。セントロメア、テロメア、および複製起点を含む直鎖状のミニ染色体として遺伝子構築物を提供することもまた意図される。遺伝子構築物は、弱毒化された生の微生物の中に遺伝的材料の一部、または細胞の中で生存している組み換え体微生物ベクターとして留まる場合がある。遺伝子構築物は、組み換え体ウイルスワクチンのゲノムの一部であり得る。この場合、遺伝的材料は、細胞の染色体に組み込まれるか、または染色体外に留まるかのいずれかである。遺伝的構築物には、核酸分子の遺伝子発現に不可欠な調節エレメントが含まれる。このエレメントには、プロモーター、開始コドン、終結コドン、およびポリアデニル化シグナルが含まれる。加えて、エンハンサーが、多くの場合には、標的タンパク質または免疫調節タンパク質をコードする配列の遺伝子発現に必要である。これらのエレメントが、所望されるタンパク質をコードする配列に対して動作可能であるように連結させられること、および調節エレメントが、それらが投与される個体によって動作可能であるように連結されたことが不可欠である。

20

30

【 0 1 4 2 】

開始コドンと終結コドンは、一般的には、所望されるタンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部と考えられる。しかし、これらのエレメントが、遺伝子構築物が投与される個体の中で機能的であることが不可欠である。開始コドンおよび終結コドンは、コード配列の中ではインフレームでなければならない。

【 0 1 4 3 】

使用されるプロモーターとポリアデニル化シグナルは、個体の細胞の中で機能的でなければならない。

40

【 0 1 4 4 】

本発明を実施するために、（特に、ヒト用の遺伝的ワクチンの生産において）有用なプロモーターの例としては、以下が挙げられるがこれらに限定はされない：シミアンウイルス40（SV40）に由来するプロモーター、マウス乳ガンウイルス（MMTV）プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス（MV）（例えば、BIV長末端反復（LTR）プロモーター）、モロニーウイルス、ALV、サイトメガロウイルス（CMV）、例えば、CMV極初期（immediate early）プロモーター、エプスタインバーウイルス（EBV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、ならびに、ヒト遺伝子（例えば、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、およびヒトメタロチオネイン）由来のプロモーター。

50

【0145】

本発明を実施するために、(特に、ヒト用の遺伝的ワクチンの生産において)有用なポリアデニル化シグナルの例としては、SV40ポリアデニル化シグナル、およびLTRポリアデニル化シグナルが挙げられるが、これらに限定はされない。特に、pCEP4プラスミド(Invitrogen, San Diego CA)の中に存在しているSV40ポリアデニル化シグナル(これは、(SV40ポリアデニル化シグナルとも呼ばれる)が使用される。

【0146】

DNA発現に必要な調節エレメントに加えて、他のエレメントもまたDNA分子に含まれる場合がある。そのようなさらなるエレメントとしてはエンハンサーが挙げられる。エンハンサーは、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、ならびにウイルスエンハンサー(例えば、CMV、RSV、およびEBV由来のエンハンサー)を含むがこれらに限定されない群より選択することができる。

10

【0147】

遺伝子構築物は、構築物を染色体外に維持し、そして細胞内で構築物の複数のコピーを生じさせるための哺乳動物の複製起点を伴って提供され得る。Invitrogen(San Diego, CA)によるプラスミドpVAX1、pCEP4、およびpREP4には、エプスタインバーウイルスの複製起点と、核抗原EBNA-1のコード領域(これは、組み込まれずに、高コピー数のエピソーム複製を生じる)が含まれている。

20

【0148】

免疫化の用途に関するいくつかの好ましい実施形態においては、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列、加えて、そのような標的タンパク質に対する免疫応答をさらに増強するタンパク質の遺伝子を含む核酸分子(単数または複数)が送達される。そのような遺伝子の例は、他のサイトカインおよびリンホカイン(例えば、 γ -インターフェロン、 β -インターフェロン、血小板由来成長因子(PDGF)、TNF α 、TNF β 、GM-CSF、表皮成長因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、MHC、CD80、CD86、およびIL-15(シグナル配列が欠失しているIL-15、および状況に応じてIgE由来のシグナルペプチドを含むIL-15を含む)をコードする遺伝子である。有用である可能性がある他の遺伝子としては、以下をコードする遺伝子が挙げられる：MCP-1、MIP-1、MIP-1 β 、IL-8、RANTES、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18の変異体形態、CD40、CD40L、血管増殖因子、IL-7、神経成長因子、血管内皮成長因子、Fas、TNF受容体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、カスパーゼICE(Caspase ICE)、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、I κ B、不活性なNIK(Inactive NIK)、SAPK、SAP-1、JNK、インターフェロン応答遺伝子、NF κ B、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40 LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2、およびそれらの機能的断片。

30

40

【0149】

何らかの理由のために遺伝的構築物を受け取った細胞を排除することが所望される場合には、細胞の破壊のための標的となるさらなるエレメントが付加される場合もある。発現され得る形態のヘルペスチミジンキナーゼ(tk)遺伝子を遺伝子構築物に含めることができる。薬物であるガングシクロビル(gangcyclovir)を個体に投与すること

50

ができ、この薬物は、tkを生産する任意の細胞の選択的死滅を引き起こし、それにより、遺伝子構築物を有している細胞の選択的破壊のための手段を提供するであろう。

【0150】

タンパク質の生産を最大にするためには、構築物が投与される細胞の中での遺伝子発現に十分に適している調節配列が選択され得る。さらに、細胞内で最も効率よく転写されるコドンが選択され得る。当業者は、細胞内で機能性であるDNA構築物を生産することができる。

【0151】

いくつかの実施形態においては、本明細書中に記載されるタンパク質のコード配列がIgEシグナルペプチドに連結させられた遺伝子構築物が提供され得る。いくつかの実施形態においては、本明細書中に記載されるタンパク質はIgEシグナルペプチドに連結させられる。

10

【0152】

タンパク質が使用されるいくつかの実施形態においては、例えば、当業者は、周知の技術を使用して、本発明のタンパク質を生産し、単離することができる。タンパク質が使用されるいくつかの実施形態においては、例えば、当業者は、周知の技術を使用して、周知の発現システムを使用するために、本発明のタンパク質をコードするDNA分子を市販されている発現ベクターの中に挿入することができる。例えば、市販されているプラスミドpSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.) が、大腸菌 (E. coli) の中での生産のために使用され得る。例えば、市販されているプラスミドpYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.) が、酵母のS. cerevisiae株の中での生産のために使用され得る。例えば、市販されているMAXBAC (登録商標) 完全バキュロウイルス発現システム (Invitrogen, San Diego, Calif.) が、昆虫細胞の中での生産のために使用され得る。例えば、市販されているプラスミドpcDNA 1またはpcDNA 3 (Invitrogen, San Diego, Calif.) が、哺乳動物細胞 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞) の中での生産のために使用され得る。当業者は、日常的に行われている技術と、容易に入手することができる出発材料によって、タンパク質を生産するために、これらの市販されている発現ベクターおよびシステムなどを使用することができる (例えば、Sambrookら、Molecular Cloning a Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Press (1989) を参照のこと、これは引用により本明細書中に組み入れられる)。したがって、所望されるタンパク質は、原核生物システムと真核生物システムのいずれにおいても調製ことができ、これによりタンパク質の様々なプロセッシングされた形態が生じる。

20

30

【0153】

当業者は、他の市販されている発現ベクターとシステムを使用する場合があります。また、周知の方法と、容易に入手することができる出発材料を使用して、ベクターを生産する場合もある。必要な制御配列 (例えば、プロモーターとポリアダニル化シグナル、そして好ましくは、エンハンサー) が含まれている発現システムは容易に入手ことができ、様々な宿主について当該分野で公知である。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning a Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Press (1989) を参照のこと。遺伝子構築物には、その構築物がトランスフェクトされる細胞株の中で機能的であるプロモーターに対して動作可能であるように連結させられたタンパク質コード配列が含まれる。構成的プロモーターの例としては、サイトメガロウイルスまたはSV40由来のプロモーターが挙げられる。誘導性プロモーターの例としては、マウス乳ガンウイルス (mouse mammary leukemia virus) またはメタロチオネインのプロモーターが挙げられる。当業者は、容易に入手することができる出発材料に由来する本発明のタンパク質をコードするDNAで細胞をトランスフェクトするために有用な遺伝子構築物を容易に生産することができる。タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターが、適合する宿主を形質転換す

40

50

るために使用され、これは次いで、培養されて、外来DNAの発現が起こる条件下で維持される。

【0154】

生産されたタンパク質は、適切である場合には、当業者に公知であるように、培養物から、細胞を溶解させることによるかまたは培養培地からのいずれかにより、回収される。当業者は、周知の技術を使用して、そのような発現システムを使用して生産されたタンパク質を単離することができる。天然の供給源から、上記の特異的なタンパク質に特異的に結合する抗体を使用してタンパク質を精製する方法を、組み換えDNA方法によって生産されたタンパク質を精製することにも同様に適用することができる。

【0155】

組み換え技術によるタンパク質の生産に加えて、自動ペプチド合成もまた、単離された、原則として純粋なタンパク質を生産するために使用される場合がある。そのような技術は当業者に周知であり、置換を有している誘導体がDNAによってコードされるタンパク質の生産において提供されない限りは、有用である。

【0156】

核酸分子は、DNAの注入(DNAワクチン接種(DNA vaccination)とも呼ばれる)、組み換え体ベクター(例えば、組み換え体アデノウイルス、組み換え体アデノ随伴ウイルス、および組み換え体ワクシニア)を含むいくつかの周知の技術のうちのいずれかを使用して送達される場合がある。

【0157】

投与経路としては、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、皮内、皮下、静脈内、動脈内、眼内、および経口、ならびに、局所、経皮、吸入による、または坐剤、あるいは、膣、直腸、尿道、口腔、および舌下組織に対する洗浄によるような粘膜組織に対しての投与経路が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい投与経路としては、筋肉内、腹腔内、皮内、および皮下注射が挙げられる。遺伝子構築物は、従来の注射器、針なしの注射デバイス、または「マイクロプロジェクトイルボンバードメント遺伝子銃(microparticle bombardment gene guns)」を含むが、これらに限定されない手段によって投与することができる。

【0158】

いくつかの実施形態においては、核酸分子は、ポリヌクレオチド機能のエンハンサー、または遺伝子ワクチン促進因子(genetic vaccine facilitator agent)の投与と組み合わせ、細胞に送達される。ポリヌクレオチド機能のエンハンサーは、米国特許出願番号5,593,972、同5,962,428、および1994年1月26日に提出された国際特許出願番号PCT/US94/00899に記載されている。これらはそれぞれ、引用により本明細書中に組み入れられる。遺伝子ワクチン促進因子は、1994年4月1日に提出された米国特許出願番号021,579に記載されている。これは引用により本明細書中に組み入れられる。核酸分子と組み合わせ投与される共働因子(co-agents)は、核酸分子との混合物として投与される場合も、また、核酸分子の投与と同時に、その前に、もしくはその後で、別々に投与される場合もある。加えて、トランスフェクト因子および/または複製因子および/または炎症因子として機能することができ、そしてGVFと同時に投与することができる他の因子としては、成長因子、サイトカイン、およびリンホカイン(例えば、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、GM-CSF、血小板由来成長因子(PDGF)、TNF、表皮成長因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、およびIL-15、ならびに、線維芽細胞増殖因子、表面活性化因子、例えば、免疫刺激複合体(ISCOMS)、フロイトの不完全なアジュバント、LPSアナログ(モノホスホリルリピッドA(WL)、ムラミルペプチド、キノンアナログを含む)、およびベシクル(例えば、スクワレンおよびスクワレン)が挙げられ、そして、ヒアルロン酸もまた、遺伝子構築物と組み合わせ使用され、投与される場合がある。いくつかの実施形態においては、免疫調節タンパク質が、GVFとして使用される場合がある。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態においては、核酸分子は、送達 / 取り込みを促進するために、P L G と組み合わせて提供される。

【 0 1 5 9 】

本発明の薬学的組成物には、約 1 ナノグラムから約 2 0 0 0 マイクログラムの DNA が含まれる。いくつかの好ましい実施形態においては、本発明の薬学的組成物には、約 5 ナノグラムから約 1 0 0 0 マイクログラムの DNA が含まれる。いくつかの好ましい実施形態においては、薬学的組成物には、約 1 0 ナノグラムから約 8 0 0 マイクログラムの DNA が含まれる。いくつかの好ましい実施形態においては、薬学的組成物には、約 0 . 1 から約 5 0 0 マイクログラムの DNA が含まれる。いくつかの好ましい実施形態においては、薬学的組成物には、約 1 から約 3 5 0 マイクログラムの DNA が含まれる。いくつかの好ましい実施形態においては、薬学的組成物には、約 2 5 から約 2 5 0 マイクログラムの DNA が含まれる。いくつかの好ましい実施形態においては、薬学的組成物には、約 1 0 0 から約 2 0 0 マイクログラムの DNA が含まれる。

10

【 0 1 6 0 】

本発明の薬学的組成物は、使用される投与の態様にしたがって処方される。薬学的組成物が注射可能な薬学的組成物である場合には、これらは、滅菌の、発熱物質を含まないものであり、そして、微粒子を含まないものである。等張性の処方物が使用されることが好ましい。一般的には、等張性のために加えられるものとしては、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール、およびラクトースを挙げることができる。いくつかの場合には、等張性の溶液（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水）が好ましい。安定化剤としては、ゼラチンおよびアルブミンが挙げられる。いくつかの実施形態においては、血管収縮剤が処方物に添加される。

20

【 0 1 6 1 】

本発明のいくつかの実施形態にしたがうと、免疫応答を誘導する方法が提供される。ワクチンは、タンパク質をベースとする、生の弱毒化ワクチン、細胞ワクチン、組み換え体ワクチン、または核酸もしくは DNA ワクチンであり得る。いくつかの実施形態においては、免疫原に対して、個体において免疫応答を誘導する方法（粘膜の免疫応答を誘導する方法を含む）には、個体に対して、C T A C K タンパク質、T E C K タンパク質、M E C タンパク質、およびそれらの機能的断片、またはそれらの発現可能なコード配列のうちの 1 つ以上を、本発明のタンパク質をコードする単離された核酸分子および / または本発明のタンパク質をコードする組換え体ワクチンおよび / または本発明のタンパク質のサブユニットワクチンおよび / または生の弱毒化ワクチンおよび / または死滅ワクチンと組み合わせて投与する工程が含まれる。C T A C K タンパク質、T E C K タンパク質、M E C タンパク質、およびそれらの機能的断片のうちの 1 つ以上が、免疫原をコードする単離された核酸分子；および / または免疫原をコードする組換え体ワクチン、および / または免疫原を含むサブユニットワクチン、および / または生の弱毒化ワクチン、および / または死滅ワクチンの投与の前に、それらの投与と同時に、あるいはそれらの投与の後に投与される場合がある。いくつかの実施形態においては、C T A C K、T E C K、M E C、およびそれらの機能的断片からなる群より選択される 1 つ以上のタンパク質をコードする単離された核酸分子が個体に投与される。

30

40

【実施例】

【 0 1 6 2 】

（実施例 1）

材料および方法

H I V - 1 サブタイプ B エンベロープ配列。H I V - 1 サブタイプ B コンセンサスエンベロープ配列を作成するために、1 1 の国から回収された 4 2 種類のサブタイプ B エンベロープ遺伝子の配列を、サンプリングの偏りを回避するために G e n B a n k から選択した。それぞれの配列は、異なる患者を示す。使用した全ての配列は組み換え体ではない。

【 0 1 6 3 】

多重アラインメント。系統発生的実験に適用したアラインメント手順には、C l u s t

50

al X (バージョン 1.81) (Thompson, J. D. B., 1997, The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876 - 4882) の適用を含めた。対アラインメントパラメーター (pairwise alignment parameters) は、ギャップ開放ペナルティーとして 10、そして伸張ペナルティーとして 0.1 を使用する、動的「slow-accurate」プログラミングに設定した。多重アラインメントパラメーターには、0.2 に等しいギャップ伸張ペナルティーを含めた。

【0164】

HIV-1 サブタイプ B エンベロープコンセンサス配列の構築。HIV-1 サブタイプ B エンベロープコンセンサスヌクレオチド配列は、多重アラインメントと、主要ではない最終的な手作業による調整を行った後に得られた。推定されたアミノ酸配列を、コドンの間に挿入されるアラインメントギャップの導入の指針とするために使用した。コンセンサスアミノ酸配列は、コンセンサスヌクレオチド配列を翻訳することによって得た。

【0165】

系統樹。プログラム PAUP* 4.0b10 (Swofford, D. L., 1999, PAUP* 4.0: phylogenetic analysis using parsimony (*および他の方法), バージョン 4.0b2a. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.) を使用する近隣結合法 (neighbor-joining (NJ) method) を、アミノ酸の系統樹の構築のために使用した。サブタイプ D に由来する 2 つのさらなる配列 (K03454 および AA44873) と、サブタイプ C に由来する 2 つの配列 (AAD12103 および AAD12112) を、ルーティングのための外周団として使用した (Kuiken, C., B. T. Korber, and R. W. Shafer. 2003. HIV sequence databases. *AIDS Rev.* 5: 52 - 61)。

【0166】

HIV-1 サブタイプ B エンベロープコンセンサス配列の改変。いくつかの改変を、HIV-1 サブタイプ B コンセンサスエンベロープ配列を得た後に行った: 可変性の高い V1 および V2 領域を短縮し、V3 ループをCCR5 の利用のために設計し、細胞質末端領域を C 末端から除去し、リーダー配列と上流の Kozak 配列を N 末端に付加し、コドン最適化および RNA 最適化を GeneOptimizer (登録商標) (GENEART, Germany) を使用することにより行った。

【0167】

エンベロープ免疫原。改変された HIV-1 サブタイプ B アーリートランスミッター (early transmitter) コンセンサスエンベロープ糖タンパク質 (EY2E1-B) をコードする遺伝子を合成し、そして配列を GENEART によって確認した。合成した EY2E1-B を BamHI と NotI で消化し、発現ベクター pVAX (Invitrogen) に、サイトメガロウイルス即時初期プロモーターの制御下にクローニングし、この構築物を pEY2E1-B と命名した。

【0168】

一次サブタイプ B 免疫原 (EK2P-B) を、M. Sidhm (Wyeth) から譲り受けたヒトコドンに偏った一次サブタイプ B 単離物 6101 gp140 エンベロープ遺伝子から作成した。基本的には、最適化した 6101 エンベロープ遺伝子を、天然のリーダー配列と細胞質末端を除去することによって変異させた。その後、IgE-リーダー配列と Kozak 配列を、以下の正方向と逆方向の特異的プライマーを設計することにより導入した:

【0169】

10

20

30

40

50

【化2】

Env-F: 5'-GTCGCTCCGCTAGCTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACC-3' (配列番号 13)

Env-R: 5'-GGTCCGATCCTTACTCCACCACTCTCTTTTGGCC-3' (配列番号 14)

精製したPCR産物をpVAXプラスミドベクターにクローニングし、これをまた、EcoRIおよびXbaIで直鎖状にした。この構築物をpEK2P-Bと命名した。

【0170】

EY2E1-Bのインビボでの発現とモノクローナル抗体との反応性。ヒト横紋筋肉腫(RD)細胞(2×10⁶)を、FuGENE6トランスフェクション試薬(Roche, Germany)を使用して、それぞれ、3gのpEY2E1-BおよびpEK2P-Bプラスミドで60mm皿の中でトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を1×PBSで3回洗浄し、150μlの溶解緩衝液(Cell Signaling Technology)の中に溶解させた。全タンパク質溶解物(50μg)をSDS-PAGEゲル上で分画させ、PVDF膜(Amersham)に移動させた。免疫ブロット分析をエンベロープ特異的モノクローナル抗体2G12(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA)とモノクローナル抗アクチン抗体(Sigma-Aldrich)を用いて行い、そしてHRP-結合ヤギ抗ヒトIgG(Sigma-Aldrich)で、ECLTMウェスタンブロット分析システム(Amersham)を使用して視覚化した。アクチンをウェスタンブロットのローディング対照として使用した。

【0171】

EY2E1-Bのモノクローナル抗体との反応性を検出するために、トランスフェクションによる全タンパク質溶解物(100μg)を、5μgのエンベロープ特異的モノクローナル抗体(2G12、4G10、およびID6(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA)を含む)で免疫沈降させた。空のpVAXベクターでトランスフェクトした細胞に由来する同じ量の全タンパク質溶解物を陰性対照として使用した。免疫沈降したタンパク質をSDS-PAGEゲル上で分画し、上記に記載したようにウェスタンブロットングによって検出した。

【0172】

間接的な免疫蛍光アッセイ。EY2E1-BおよびEK2P-B遺伝子の発現を確認するための間接的な免疫蛍光アッセイを行った。ヒト横紋筋肉種(RD)細胞を組織培養チャンバースライド(BD Biosciences)に、10%のFBS(GIBCO)を含む完全DMEM培地の中で翌日に60~70%の細胞集密度が得られるような密度でプレートし、一晚附着させた。翌日、細胞をpEY2E1-B、pEK2P-B、および対照プラスミドpVAX(1μg/ウェル)で、製造業者の説明書にしたがってFuGENE6トランスフェクション試薬(Roche)を使用してトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を冷却した1×PBSで2回洗浄し、メタノールを使用してスライド上に15分間かけて固定した。スライドから残った溶媒を除去し、細胞を、抗マウスHIV-1 envモノクローナルF105(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA)とともに90分間インキュベートした。その後、スライドをTRITC結合二次抗体(Sigma-Aldrich)とともに45分間インキュベートした。4',6-ジアミド-2-フェニルインドールヒドロクロライド(Sigma-Aldrich)を二次抗体の溶液に加えて核を対比染色して、任意の領域の中の利用することができる細胞の総数の核を示した。スライドを、フェージング防止剤(Molecular Probes)を含む取り付け媒体を用いてマウントした。画像を、蛍光顕微鏡用のPhase 3 Proプログラム(Media Cybernetics)を使用して分析した。

【0173】

10

20

30

40

50

エンベロープ特異的抗体の決定。エンベロープに特異的なIgG抗体の測定を、免疫化したマウスと対照マウスの両方において、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)によって行った。Nunc-Immuno™ Plates(Nalge Nunc International, Rochester, NY)を1μg/mlのクレードB組換え体HIV-1 IIB糖タンパク質可溶性gp160(Immuno Diagnostics, MA)、クレードA/E一次エンベロープタンパク質HIV-1 93TH975 gp120、およびクレードC一次エンベロープタンパク質HIV-1 96ZM651 gp120(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA)でそれぞれコーティングし、室温で一晩インキュベートした。洗浄後、プレートをPBST(1×PBS+0.05%のTween-20)中の3%のBSAで37℃で1時間ブロックした。その後、プレートを再び洗浄し、特異的マウス血清とともにインキュベートし、PBST中の3%のBSAで一晩、4℃で希釈し、続いて、1/10,000希釈のHRP結合ヤギ抗マウスIgG(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)とともに37℃で1時間インキュベートした。反応を、基質であるTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)(Sigma-Aldrich)を用いて行った。反応を1ウェルあたり100μlの2.5Mの硫酸を用いて停止させ、プレートをEL808プレートリーダー(Biotech Instrument Inc.)で、450nmのODで読み取った。

10

【0174】

20

マウスの免疫化。雌の4~6週齢のBALB/cマウスをThe Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME.から購入した。トランスジェニックB6.Cg-Tg(HLA-A/2-D)2Eng/Jマウスの雄雌の対は、Jackson Laboratoryから購入し、Michelle Kutzler博士によって本発明者らの研究室において繁殖させられた。これらのトランスジェニックマウスは、種間ハイブリッドクラスI MHC遺伝子AADを発現する。AADには、ヒトHLA-A2.1遺伝子の-1ドメインと-2ドメイン、そして、マウスH-2Dd遺伝子の-3膜貫通ドメインと細胞質ドメインが、ヒトHLA-A2.1プロモーターの方向下に含まれる。マウス-3ドメインの発現は、このシステムの免疫応答を促進する。未変更のHLA-A2.1と比較して、キメラHLA-A2.1/H2-Dd MHCクラスI分子は、マウスT細胞の効率的な陽性選択を媒介して、HLA-A2.1クラスI分子によって提示されるペプチドを認識することができるより完全なT細胞レパートリーを提供する。HLA-A2.1クラスI分子の状況においてマウスT細胞によって提示され認識されるペプチドエピトープは、HLA-A2.1+ヒトにおいて提示されるものと同じである。雌の4~6週齢のトランスジェニックマウスを、以下に記載するさらなる実験に使用した。それらの世話は、National Institutes of Health and the University of Pennsylvania Institutional Care and Use Committee(IACUC)のガイドラインにしたがった。個々のマウスを、それぞれ100μgのDNAで、1週間に2回の間隔で3回筋肉内に免疫化した。それぞれのグループには3匹のマウスを含め、対照グループはpVAX DNAをワクチン接種した。マウスを3回目の免疫化の1週間後に殺し、脾臓を無菌的に取り出した。脾臓細胞を回収し、RBC溶解緩衝液の中に再度懸濁させて、赤血球を除去した。溶解後、同じグループに由来する脾細胞をプールし、10%のFBSを含むRPMI 1640培地の中に再度懸濁させた。分析のために細胞をカウントし、準備した。

30

40

【0175】

IFN-γ ELISpotアッセイ。High-Protein Binding IP96ウェルMultiscreen(登録商標)プレート(Millipore, Bedford, MA, USA)を使用した。プレートを、1×PBSの中に希釈したマウスIFN-γに対するmAb(R&D Systems, Minneapolis, MN)で

50

、4 で一晩コーティングした。プレートをPBSで3回洗浄し、1%のBSAと5%のスクロースを含む1×PBSで、室温で2時間ブロックした。マウスの脾細胞を、完全培養培地(10%のFBSと抗生物質を補充したRPMI1640)の中に再度懸濁させた、1ウェルあたり2×10⁵細胞の入力細胞数で、3連で加えた。HIV-1サブタイプB、サブタイプC、グループMのタンパク質コンセンサス配列全体、HIV-1MN(サブタイプB単離物)、HIV-1C.UY.01.TRA3011およびC.ZA.01.J54Ma(2つのサブタイプC単離物)エンベロープのタンパク質配列全体を提示する11個のアミノ酸が重複している15個のアミノ酸残基をそれぞれ含む6セットのペプチドを、NIH AIDS Research and Reference Reagent Programから入手した。envペプチドのそれぞれのセットを、IFN- の放出の特異的刺激のための抗原として、4つのプールになるように、2μg/ml/ペプチドの濃度でプールした。5g/mlのコンカナバリンA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)と完全培養培地を、それぞれ、陽性対照および陰性対照として使用した。プレートを、37、5%のCO₂雰囲気インキュベーターの中での24時間のインキュベーション後に、4回洗浄した。その後、ビオチニル化抗マウスIFN- 検出抗体を添加し、プレートを4 で一晩インキュベートした。プレートを洗浄し、発色を製造業者の説明書(ELISPOT Blue Color Module, R&D Systems, Minneapolis, MN)にしたがって追跡した。プレートを風乾させ、スポットを自動ELISPOTリーダーシステム(CTL Analyzers, Cleveland, OH)をImmunoSpot(登録商標)ソフトウェアとともに使用してカウントした。スポット形成細胞(spot forming cells)(SFC)の平均数を、データの表示のために1×10⁶個の脾細胞に調整した。ELISPOTアッセイを、3つの別々の実験において3回繰り返した。

【0176】

CD8+T-細胞枯渇実験。CD8リンパ球を、CD8に対する抗体(Dynal Biotech Inc., Lake Success, NY)でコーティングした免疫磁気(immune-magnetic)ビーズを使用し、製造業者の説明書にしたがって、脾細胞から枯渇させた。CD8+T-細胞の枯渇後、IFN- ELISPOTアッセイを上記に記載したとおりに行った。

【0177】

エピトープマッピング実験。反応性エピトープをマップするために、HIV-1コンセンサスサブタイプBおよびHIV-1MNの完全なエンベロープタンパク質を提示する11個のアミノ酸が重複している15個のアミノ酸残基を含むペプチドの2つのセットを、それぞれ、14~15ペプチド/プールの29のプールになるようにプールし、IFN- ELISPOTアッセイを上記に記載したとおりに行った。29のプールした刺激因子のこれらの様々なセットを、エピトープマッピングを容易にするマトリックスアッセイにおいて使用した。

【0178】

統計分析。対応のあるStudent t-testを、pEY2E1-Bで免疫化したマウスとpEK2P-Bで免疫化したマウスとの間での細胞性免疫応答の比較のために使用した。この実験では、p<0.05を統計的に有意と考えている。

【0179】

結果

新規のサブタイプB初期トランスミッターコンセンサスをベースとするエンベロープ遺伝子の構築と設計。HIV-1サブタイプBのコンセンサス配列を、GenBankから取ってきた42種類のサブタイプB配列から作成した。図1にまとめるように、いくつかの改変を、コンセンサス配列の作成後に行った。簡単に説明すると、粘膜から感染するウイルスを模倣したHIV-1エンベロープのCCR5-向性バージョンを生産するために、V3ループの中の6個の重要なアミノ酸を、初期トランスミッター単離物の配列にしたがって設計した。さらに、V1ループの中の10個のアミノ酸とV2ループの中の1個のア

10

20

30

40

50

ミノ酸もまた、コンセンサス配列から欠失させた。高効率のリーダー配列を、発現を促進させるために開始コドンの上流に、インフレイムで融合させた。膜貫通ドメインは、表面発現を促進させるために完全な状態のまま保ち、切断部位を、エンベロープタンパク質の適正な折り畳みおよび宿主プロテイナーゼ切断を得るために完全な状態のまま保った。細胞質末端は、エンベロープの再利用を防ぎ、そしてより安定で高度な表面発現を促進するために除去した (Berlitz - Torrent, C, 1999. Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J. Virol.* 73: 1350 - 1359; Bultmann, A. 2001. Identification of two sequences in the cytoplasmic tail of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that inhibit cell surface expression. *J. Virol.* 75: 5263 - 5276)。さらに、より高レベルの発現を有するように、この遺伝子のコドン使用を、ヒト (*Homo Sapiens*) 遺伝子のコドンの偏重に合わせた (Andre, S. 1998. Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J. Virol.* 72: 1497 - 503; Demi, L. 2001. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. *J. Virol.* 75: 10991 - 11001)。加えて、RNA最適化 (Schneider, R. 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J. Virol.* 71: 4892 - 4903) もまた行った: GC含有量の極めて高い (> 80%) 領域または極めて低い (< 30%) 領域と、シス作用配列モチーフ (例えば、内部TATAボックス、chi-部位、およびリボソーム侵入部位) を回避した。合成により操作したEY2E1-B遺伝子を構築し、これは2734bpの長さであった。EY2E1-B遺伝子を、さらなる実験のために、pVAXの中のBarnHIとNotI部位にサブクローニングした。

【0180】

系統発生分析。無作為にサンプリングしたエンベロープサブタイプB配列からEY2E1-B配列までの距離の分布を評価するために、系統発生分析を行った。図2に示すように、サンプリングした全ての配列に対して、EY2E1-B配列の相対的な近さが観察された。EY2E1-B配列は、一次単離物であるEK2P-B配列と比較すると、類似するスコアの同等の分布を有していた (表1)。EY2E1-Bについての平均の類似性スコアの割合 (%) は85.7%であり、一方、EK2P-Bについては79.4%であった。

【0181】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

	類似性スコアの平均%	類似性スコアの%の範囲
EY2E1-B	85.7	92.1-79.6
EK2P-B	79.4	86.3-73.9

表 1 可能性のあるエンベロープワクチン候補とサブタイプ B エンベロープ配列のアライメントとの間での類似性スコアの割合 (%) の平均と範囲。

10

【0182】

EY2E1-B のインピボでの発現と抗原性の決定。pEY2E1-B と pEK2P-B のインピボでの発現を試験するために、RD 細胞を材料および方法のセクションに記載したように、これらのプラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクション後に、全タンパク質を細胞溶解物から抽出し、pEY2E1-B の発現を検出するために、材料および方法のセクションに記載したエンベロープ特異的モノクローナル抗体 2G12 で免疫ブロットした。ウェスタンブロットの結果は、これらの 2 つの構築物がエンベロープタンパク質を発現していたことを示していた (図 3A)。検出されたエンベロープタンパク質は約 120 kD であった。表 2 は、pEY2E1-B と pEK2P-B の比較を示す。

【0183】

20

【表 2】

表 2

	コンセンサス / 一次	初期トランスミッター	コドン最適化	RNA 最適化	IgEL5	細胞質末端
EY2E1-B	コンセンサス	あり	あり	あり	あり	なし
EK2P-B	一次	なし	あり	あり	あり	なし

抗原性エピトープを決定するために、RD 細胞溶解物に由来する発現されたエンベロープタンパク質を、3 種類の gp120 - 特異的抗体 2G12、4G10、および ID6 で免疫沈降させた。免疫沈降の後、ウェスタンブロットティングを行って、免疫沈降させたタンパク質を検出した。本発明者らの結果は、合成の免疫原は抗体 2G12 と ID6 には結合することができたが、4G10 には結合できなかったことを示していた。抗体 2G12 は多種多様な一次単離物を中和し、立体構造と炭水化物に依存性の gp120 エピトープと反応し、抗体 ID6 は gp120 と gp160 に結合して、gp120 の最初の 204 個のアミノ酸に対して向けられるので、本発明者らの結果は、合成によって操作された免疫原である EY2E1-B が比較的天然のままの立体構造に折り畳まれることができ、いくつかの天然の抗原性エピトープを保存していることを示唆していた。さらに、抗体 4G10 が HIV-1 LAI/BRU V3 モノクローナル抗体 (LAI gp160 を認識する、T 細胞系統適用株) であるので、本発明者らのデータはまた、この合成のエンベロープが受容体 CXCR4 を利用しないことを示唆していた。

30

【0184】

さらに、発現を確認し、抗原性エピトープを決定するために、間接的な免疫蛍光アッセイを、トランスフェクトした RD 細胞を使用して行った。高い特異的発現が、pEY2E1-B でトランスフェクトした細胞と、pEK2P-B でトランスフェクトした細胞において、蛍光顕微鏡下で観察された。HIV-1 env モノクローナル F105 (不連続な、または立体構造的な gp120 エピトープと反応する) をこのアッセイにおいて使用した。図 3B に示すように、Env タンパク質を発現しているトランスフェクトされた細胞は、典型的なローダミン蛍光を示し、これもまた、合成のタンパク質が発現されたこと、

40

50

そして比較的天然のままの立体構造を有していることを示唆していた。対照としての、p V A XでトランスフェクトされたR D細胞の中では、発現は検出されなかった。

【0185】

体液性応答の誘導。合成の免疫原がより高い力価のエンベロープ特異的抗体応答を誘導できるかどうかを決定するために、血清を、p V A X、p E Y 2 E 1 - B、およびp E K 2 P - Bで免疫化したB a 1 B / Cマウスから回収し、E L I S Aを行った。図4 Aに示すように、本発明者らは、比較的高いレベルのクレードBエンベロープ特異的抗体応答を、p E K 2 P - Bで免疫化したマウスのものと比較して、p E Y 2 E 1 - Bで免疫化したマウスから回収した血清を用いた場合に、観察した。対照的に、ベクターだけのマウスは、特異的抗体応答は生じなかった。しかし、クレードA / EおよびクレードCタンパク質に対しては、p E Y 2 E 1 - Bおよびp E K 2 P - Bを注射したマウスのいずれにおいても、検出可能な応答は存在しなかった(図4 Bおよび4 C)。このことは、合成のコンセンサスをベースとする免疫原は比較的天然のままの立体構造を有しており、天然の抗原性エピトープを保存しているが、広範な交差クレードの抗体免疫応答を誘導することができない場合があることを示している。

10

【0186】

E L I S p o tによって測定した強い、そして広範な細胞性免疫応答。B a 1 B / Cマウスを、p E Y 2 E 1 - Bおよびp E K 2 P - Bで免疫化し、E L I S p o t分析を行って、H I V - 1コンセンサスサブタイプBタンパク質由来のペプチドの4つのプールに対して応答した抗原特異的I F N - 分泌細胞の数を決定した(図5 A)。100万個の細胞あたりのスポット形成単位(S F U)の数による測定としての応答の大きさは、p E Y 2 E 1 - Bをワクチン接種したマウスにおいては27.5から520の範囲であった。比較して、p E K 2 P - Bをワクチン接種したマウスに由来する脾細胞は、わずかに、2から237.5のスポットの範囲を示した($p < 0.05$)。p E Y 2 E 1 - Bを免疫化したマウスにおける4つのプール全てについての、100万個の脾細胞あたりのS F Uの付加頻度(additive frequency)は、 $1976.25 + 260$ であったが、p E K 2 P - Bで免疫化したマウスの中での100万個の細胞あたりのS F Uの数は、 $519 + 45$ であった。p V A Xベクターで免疫化したマウスに由来する細胞を陰性対照として使用し、これは、コンセンサスエンベロープBペプチドプールについては、100万個の脾細胞あたりわずか $60 + 5$ のS F Uを示した($p < 0.05$)。本発明者らは、3つの別々の実験において同様の結果を観察した。したがって、p E Y 2 E 1 - B構築物は、さらに4回まで、細胞によって媒介される免疫応答を駆動する能力がある。本発明者らはまた、C D 8 + リンパ球が、p E Y 2 E 1 - Bで免疫化したB a 1 B / Cマウスにおいて検出されたI F N - の分泌に応答するかどうかも決定した。図5 Bに示すように、100万個の細胞あたりのS F Uの数は、C D 8 + 枯渇の後には、 $127.5 + 11$ にまで減少した。このことは、C D 8 + T細胞枯渇E L I S p o tによって観察されたI F N - 生産細胞の頻度の約90%の減少が存在することを示している。p E Y 2 E 1 - Bによって誘導されたI F N - の生産は、主にC D 8 + T細胞によって媒介される。

20

30

【0187】

加えて、H L A - A 2によって提示される抗原に対するヒトT細胞免疫応答をモデル化し、そしてそれらの抗原を同定するために、本発明者らは、トランスジェニックH L A - A 2.1 / H 2 - D dマウスを使用して、上記に記載したものと同一E L I S p o tアッセイを行った。図5 Cに示すように、p E Y 2 E 1 - Bで免疫化したトランスジェニックマウスにおける4つのプールの全てについて、100万個の脾細胞あたりのS F Uの付加頻度は、 $2362 + 257$ であり、一方、p E K 2 P - Bで免疫化したトランスジェニックマウスの中の100万個の細胞あたりのS F Uの数は、わずか $493 + 57$ であった。これらの結果は、p E Y 2 E 1 - B構築物が、トランスジェニックマウスにおいて、さらに4回まで、細胞によって媒介される免疫応答を駆動する能力があることを示していた。C D 8 枯渇後のE L I S p o tのデータは、p E Y 2 E 1 - Bによって誘導されたI F N - の生産が主にC D 8 + T細胞によって媒介されることを示唆していた(図5 D)。

40

50

【0188】

さらに、本発明者らは、E L I S p o t アッセイにおいて観察された細胞性の免疫応答をさらに詳細に分析することに興味を抱いた。したがって、さらに別のE L I S p o t アッセイのセットを、コンセンサスサブタイプBエンベロープタンパク質にまたがるペプチドのライブラリーに対して行った。サブタイプBコンセンサスエンベロープタンパク質を含む11個のアミノ酸が重複している15マーのペプチドの完全なセットを、このマッピング実験を実施するために使用した。この実験は、合成のエンベロープによって誘導された明確な優勢エピトープは存在しないことを示していた。しかし、p E Y 2 E 1 - B - をワクチン接種したB a 1 B / Cマウスに由来する脾細胞のI F N - E L I S p o t分析は、29のプールのうちの18のプールが50を超えるスポットを示し、一方、p E K 2 P - Bをワクチン接種したB a 1 B / Cマウスにおいては、わずかに6つのプールがそのようなスポットを示したことを明らかにした(図5E)。これらの結果は、E Y 2 E 1 - B免疫原によって誘導された細胞性の免疫応答の幅と大きさの有意な増大を示していた。

10

【0189】

p E Y 2 E 1 - Bによって誘導された強く交差反応性の細胞性免疫応答。E Y 2 E 1 - B免疫原が広範囲の交差反応性の細胞性免疫応答を誘導できるかどうかを決定するために、I F N - E L I S p o tを、B a 1 B / CトランスジェニックマウスとH L A - A 2トランスジェニックマウスの両方において、H I V - 1 M NグループM、コンセンサスサブタイプC、H I V - 1 M N(サブタイプB単離物)、H I V - 1 C . U Y . 0 1 . T R A 3 0 1 1とC . Z A . 0 1 . J 5 4 M a(2つのサブタイプC単離物)エンベロープペプチドを使用して行った。これらのアッセイではさらに、図5A、C、およびEで観察された結果が単独で、ペプチド標的と関係しているかどうか、または免疫幅の増大が実際に原因であるかどうかを決定するであろう。図6Aに示すように、p E Y 2 E 1 - Bをワクチン接種したB a 1 B / Cマウスにおける、H I V - 1 M Nエンベロープペプチドの4つのプールに対する、100万個の脾細胞あたりのS F Uの付加数は、 $1855 + 215.8$ であった。これは、p E K 2 P - Bで免疫化したB a 1 B / Cマウスにおけるもの(100万個の脾細胞あたりのS F Uは $700 + 168.2$ であった)の約2倍であり、このことは、p E Y 2 E 1 - Bが、サブタイプBの中でp E K 2 P - Bよりも強い交差反応性を有していることを示している。p E Y 2 E 1 - Bで免疫化したB a 1 B / Cマウスにおける、4つのH I VグループM(図6B)およびサブタイプC(図6C)コンセンサスエンベロープペプチドのプールでの刺激に反応したI F N - スポットの数は、それぞれ、 $1150 + 191.3$ および $715 + 116.1$ であった。グループMおよびサブタイプCペプチドに対するスポットの数(これらは、p E K 2 P - Bをワクチン接種したB a 1 B / Cマウスにおいては、 $635 + 152.3$ および $345 + 82.3$ であった)と比較して、これらのデータは、p E Y 2 E 1 - Bによって誘導された交差クレードの免疫応答が、B a 1 B / Cマウスにおいてp E K 2 P - Bによって誘導されたものよりも、およそ45%強いことを示している。

20

30

【0190】

重要なことは、本発明者らが、トランスジェニックマウスにおいてp E Y 2 E 1 - Bによって誘導された、はるかに強い交差反応性の細胞性免疫応答を観察したことである(図6F~J)。p E Y 2 E 1 - Bをワクチン接種したトランスジェニックマウスにおけるH I V - 1 M Nエンベロープペプチドの4つのプールに対する100万個の脾細胞あたりのS F Uの付加数は $1087 + 153$ であり、これは、p E K 2 P - Bを免疫化したH L A - A 2マウスにおける付加数(100万個の脾細胞あたりのS F Uは、 $316 + 63$ であった)よりも約3倍大きく(図6F)、このことは、p E Y 2 E 1 - Bもまた、トランスジェニックマウスにおいてサブタイプBの中でp E K 2 P - Bよりも強い交差反応性を誘発することができたことを示している。p E Y 2 E 1 - Bで免疫化したトランスジェニックマウスにおいて、4つのH I VグループM(図6G)およびサブタイプC(図6H)のコンセンサスエンベロープペプチドのプールでの刺激に反応したI F N - スポットの数は、それぞれ、 $2116 + 216$ および $893 + 154$ であった。p E K 2 P - Bをワク

40

50

チン接種したトランスジェニックマウスにおいて473 + 50および266 + 55であった、グループMおよびサブタイプCペプチドに対するスポットの数と比較して、これらのデータは、pEY2E1 - Bによって誘発された交差クレードの免疫応答が、トランスジェニックマウスにおいては、pEK2P - Bによって誘導されたものよりも約3倍から4倍強かったことを示していた。さらに、他のペプチドセットによって得られる幅と交差反応性を評価するためのストリンジентな対照とすべき、2つのサブタイプC単離物ペプチドのセットを、交差クレードC免疫応答をさらに決定するために使用した。BalB / Cマウスにおいては、pEY2E1 - BおよびpEK2P - Bによって誘発された、これらの2つのサブタイプC単離物のセットに対する交差反応性についてはそれほど多くの相違はなかったが(図6DおよびE)、pEY2E1 - Bによって誘導されたこれらの2つのサブタイプC単離物のセットに対する交差クレードの反応性は、pEK2P - Bによって誘導されたものよりも約3倍強かった(図6IおよびJ)。C.ZA.01.J54MaおよびC.UY.01.TRA3011ペプチドに対するスポットの数は、pEY2E1 - Bをワクチン接種したトランスジェニックにおいては、1080 + 206および890 + 150であったが、pEK2P - Bをワクチン接種したトランスジェニックマウスにおいては、数は、わずかに305 + 38および310 + 62であった。

【0191】

最後に、本発明者らは、BalB / CおよびHLA - A2トランスジェニックマウスの両方において上記で観察された、HIV - 1 MNに対する細胞性免疫応答を詳細に実験することにより、EY2E1 - B免疫原によって誘導されたサブタイプ特異的標的に対する交差反応性の細胞性免疫応答の幅の増大もまた存在するかどうかを決定した。エピトープマッピングアッセイを、サブタイプB MNエンベローブタンパク質にまがたるペプチドのライブラリーに対して行った。結果は、いずれのマウス株においても、合成のエンベローブによって誘導された明確な優勢エピトープはなかったことを示唆していた。しかし、pEY2E1 - Bをワクチン接種したBalB / Cマウスに由来する脾細胞のIFN - ELISpot分析は、29個のプールのうちの14個のプールが50を超えるスポットを示し、一方、pEK2P - Bをワクチン接種したBalB / Cマウスにおいてはわずかに9個のプールしか50個を超えるスポットを示さなかったことを明らかにした(図7A)。同様に、トランスジェニックマウスにおいては、pEY2E1 - Bで免疫化したトランスジェニックマウスにおいては、29個のプールのうちの18個のプールが50個を超えるスポットを示し、一方、pEK2P - Bをワクチン接種したトランスジェニックマウスにおいては、わずかに6個のプールしか、50個を超えるスポットを示さなかった(図7B)。これらのデータは、BalB / CおよびHLA - A2トランスジェニックマウスのいずれにおいても、EY2E1 - B免疫原によって誘導された交差反応性の細胞性免疫応答の幅と大きさの有意な増大を示していた。

【0192】

考察

世界的なHIV - 1 DNAワクチンの努力は、HIV特異的T細胞応答により、感染からの防御または感染後の複製の制御に対するいくらかの寄与が提供され得るという原理によって導かれている。DNAワクチンは、ウイルスの複製に影響を及ぼすことができるが、一般的には、これらは、弱毒化された生のウイルスベクターの場合の免疫の誘導ほどは強力ではない(Almond, N.ら、1995. Protection by attenuated simian immunodeficiency virus in macaques against challenge with virus-infected cells. Lancet 345:1342 - 1344; Berman, P. W.ら、1996, Protection of MN - rgp120-immunized chimpanzees from heterologous infection with a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. J Infect Dis 173:52 - 9; Boyer, J.ら、1997. Protection of

10

20

30

40

50

chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. Nat Med 3: 526-532; Daniel, M. C. ら、1992. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. Science 258: 1938-1941)。したがって、細胞性免疫応答の幅と大きさを改善することを助ける戦略が重要である。本発明により、別のアプローチとして文献に報告されているが、これまでには1つのワクチン様式として一緒に集められていなかった、複数の免疫原のいくつかの特徴を使用して、新規の抗原が提供される。概念の実証として、合成によって操作されたコンセンサスをベースとするエンベロープ免疫原を開発し、細胞媒介性の免疫応答の誘導のために最適化された一次配列免疫原と比較した。発現のデータは、この操作された新しいエンベロープ遺伝子が、哺乳動物の細胞株の中で効率よく発現され得るが、これらの2つの免疫原の発現レベルは極めて似ていることを示していた(図3A)。本発明者らは、免疫原性の実験において、この機能性の免疫原によって誘導された細胞性免疫応答が、一次エンベロープワクチンと比較して大きな多様性と大きさを示したことを観察した。BalB/CおよびHLA-A2トランスジェニックマウスの両方において得られたエピトープマッピングのデータは、この多様性と大きさの改善が、これらのハプロタイプを超えて維持されることを明らかに示していた。この発見をさらに確認するために、本発明者らはまた、コンセンサスをベースとするサブタイプCエンベロープ免疫原を開発し、これを、一次サブタイプC免疫原と比較した。再び、この合成のコンセンサスをベースとするサブタイプCエンベロープ免疫原は、一次C免疫原と比較して、細胞性免疫応答の多様性と大きさの増大を示した(未公開データ)。

【0193】

ワクチン設計の戦略の観点から、ワクチンの候補と、感染性ウイルスまたはチャレンジウイルスとの間での配列相同性は、重要な考慮事項であり得る。ワクチン株と今まさに流行しているウイルスとの間での配列相違の程度を最小にするための有効なアプローチは、これらのウイルスにとって「中枢的な」人工的な配列を作成することである。そのような配列を設計するための1つの戦略は、アラインメントの中のそれぞれの位置にある最も一般的なアミノ酸から導かれたコンセンサス配列を使用することである。この実験において、本発明者らは、コンセンサスをベースとするサブタイプBエンベロープワクチンを開発し、この合成の免疫原が高い交差反応性を有すると考えた。本発明者らの結果は、pEY2E1-Bワクチンによって誘導された多様な細胞性免疫応答が存在することを示していた。Balb/cと、トランスジェニックマウスの両方でのペプチドマッピングの結果も、さらに、EY2E1-B免疫原が免疫応答の幅を広げたことを示した。さらに、交差反応性の細胞性免疫応答実験の結果は、pEY2E1-Bが有意に強く、幅広い交差反応性の細胞性免疫応答を誘発できたことを示していた。したがって、人工的なコンセンサスエンベロープ免疫原には、任意の個々の自然界に存在している単離物において見られるものよりも保存されているエピトープが含まれ、これらは、より幅広い交差クレードのCTL応答を誘導する。

【0194】

理論的には、コンセンサス配列には利点と欠点がある。コンセンサス配列は、今流行している単離物に基づいて作成されるので、これは、任意の所定の自然界に存在しているウイルス単離物よりも今現在流行しているウイルス株に遺伝的により近い可能性がある。しかし、グローバルな配列決定は、一般的には、急性の感染の際にサンプリングされたウイルスの代わりに、慢性的な感染の際にサンプリングされたウイルスを用いて行われるので、そのほとんどの部分が回避されているエピトープに対するコンセンサスなワクチン応答が不利であり得る可能性が生じる。この欠点を最小にするために、ワクチンの設計のための1つの有用な戦略では、初期トランスミッター配列が考慮され得る。エンベロープタンパク質は、HIV-1エンベロープ遺伝子の中の超可変領域が迅速な挿入および欠失によって変異し、そして、点変異によっては変異しないという理由から、HIVタンパ

10

20

30

40

50

ク質を人工的に構築することは最も困難である。超可変領域の長さの相違は、これらの領域のコンセンサス配列を作成することを難しくする。最近、Gaoら、(Gao, F., Eら、2005. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein. *J Virol* 79:1154-63)がグループMコンセンサスエンベロープ配列を作成したが、CRF08_BC組み換え体株の対応する領域に由来するコンセンサスではない配列が、これらの可変領域において使用された。実験は、より短いV1、V2、およびV4領域を有しているエンベロープ糖タンパク質をコードするサブタイプCウイルスが、レシピエントにおいて、偶然によって期待される頻度よりも有意に大きい頻度で感染することを示した。初期感染に由来するサブタイプAエンベロープ配列もまた、有意に短いV1およびV2ループ配列と、より少ない可能性のあるN結合グリコシル化部位を有していた(Chohan, B., D.ら、2005. Selection for Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. *J. Virol.* 79:6528-6531)。対照的に、最近流行したサブタイプB変異体は、より短いV1およびV2ループは有していなかった。しかし、サブタイプB感染の症例が、主に、同性愛者間での感染または注射の使用の結果であったことに注目することが重要であり得る。さらに、実験は、コンパクトなV1、V2領域を有している可能性のある機能性のコンセンサスが、CD4結合ドメインの露出を大きくし、ゆえに、中和に対する感度を高めることを示唆した(Edwards, T.G.ら、2001. Relationships between CD4 independence, neutralization sensitivity, and exposure of a CD4-induced epitope in a Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* 75:5230-5239; Kolchinsky, P.ら、2001. Increased neutralization sensitivity of CD4-independent Human Immunodeficiency Virus variants. *J. Virol.* 75:2041-2050; Pickora, C.ら、2005. Identification of two N-linked glycosylation sites within the core of the Simian Immunodeficiency virus glycoprotein whose removal enhances sensitivity to soluble CD4. *J. Virol.* 79:12575-12583; Puffer, B.A.ら、2002. CD4 independent of Simian Immunodeficiency Virus Envs is associated with macrophage tropism, neutralization sensitivity, and attenuated pathogenicity. *J. Virol.* 76:2595-2605)。本発明者らは、本発明者らがサブタイプBコンセンサス配列を作成する際には、V1およびV2領域を短くした。

【0195】

HIV-1感染の初期には、非合胞体形成型(non-syncytium-inducing)(NSI)ウイルスが優勢であり、これはゆっくりと複製し、それらの主要な受容体としてCCR5を使用する。合胞体形成型(Syncytium-inducing)(SI)ウイルス(これは、感染した個体のうちの約50%において現われ、これには、CD4細胞の減少の加速と、進行性の感染の臨床的経過が先行する)は、主要な受容体としてCXCR4を使用する。HIV変異体の様々な共受容体の使用は、全てのサブタイ

10

20

30

40

50

プについて明らかにされている。サブタイプCウイルスは、サブタイプCのHIV変異体を使用するCCR4の提示不足が頻繁に報告されていることが原因で、ほとんどの他のサブタイプとは異なるようである。したがって、CCR5の利用は、ワクチンの設計については極めて重要な考慮事項であるはずである。これまでの報告では、gp120のV3領域が受容体利用において重要な役割を担っていることが示されている。V3ループの中の6個の残基が、CCR5相互作用に重要であることが特定されている：アルギニン307、リジン314、イソロイシン316、アルギニン322、フェニルアラニン324、およびアラニン337。しかし、サブタイプC初期トランスミッターの配列に基づくと、322位の残基は、アルギニンではなくグルタミンであるべきである。まとめると、CCR5の利用に重要な残基を示している以前の実験と初期トランスミッターの配列に基づいて、本発明者らは、理論上、CCR5共受容体利用を標的化し得る免疫応答を駆動することができる、サブタイプBコンセンサスエンベロープ免疫原を設計した。

10

【0196】

交差反応性の可能性を最大にするために、HIV-1グループMコンセンサスエンベロープ配列が作成された。しかし、サブタイプ特異的エンベロープコンセンサスワクチンが、少なくとも細胞性免疫応答のレベルで、流行しているウイルスと比較してワクチン抗原の全体的な配列類似性についての歩み寄りを示し得る可能性がある。実験は、サブタイプBおよびCのエンベロープタンパク質の様々な領域において高度な選択性が同定されたことを示している。これは、サブタイプBおよびCにおいては、エンベロープタンパク質の様々な領域に対する様々な免疫の圧力 (immune pressure) によって引き起こされ得る。したがって、ワクチンと流行しているウイルスに対する免疫応答として、サブタイプ特異的エンベロープワクチンを使用することにおいては、抗原性ドメインを共有しているとの利点がある。グループMとサブタイプの特異的エンベロープワクチンを比較するさらなる実験が、この問題点をさらに明確にするためには必要である。

20

【0197】

コンセンサス配列を使用することについての別の重要な懸案事項は、その配列が、いずれの自然界に存在しているウイルスの中でも見られない組み合わせで多形を組み合わせしており、したがって、不適切なタンパク質の折り畳みを生じる可能性があることである。これまでの実験は、グループMコンセンサス免疫原が自然界に存在している立体構造に折り畳まれ得、エンベロープの抗原性エピトープを保存しており、弱い中和抗体応答を誘発することを示した。合成のタンパク質が抗体2G12、ID6、およびF105に結合できるという事実に基づいて、本発明者らは、pEY2E1-Bが、いくらか自然界に存在している立体構造を有し得ると考えた。重要なことは、本発明者らのデータもまた、EY2E1-B免疫原が、高力価のサブタイプBエンベロープ特異的抗体を誘導することができることを示したことであり、このことは、さらに、この合成の免疫原がクラスIIエピトープをより十分に保存している可能性があることを示している。この領域でのさらなる実験が重要であろう。

30

【0198】

新規のHIV-1ワクチンストラテジーの作成の場合には、前臨床モデルを使用して、ヒトにおいてこれらのワクチンの効力を予想する要望もまた高まっている。本発明者らの実験においては、HLA-A2トランスジェニックマウスを使用して、合成の免疫原によって誘発された細胞性免疫応答を実験した。実験は、このトランスジェニック株が、ヒトCD8+細胞溶解性T細胞の最適な刺激を含む感染性疾患のためのワクチンの設計および試験のための重要な前臨床モデルであることを示した。このモデルにおいては、結果は、EY2E1-Bが、EK2P-Bと比較して、はるかに幅広く、強い細胞性免疫応答を誘発できたことを示しており、このことは、この新しいワクチンがHLA-A2拘束細胞性応答を誘導するより強い能力を有している可能性があることを示唆している。ヒト以外の霊長類におけるこの免疫原のさらなる実験を計画している。

40

【0199】

まとめると、本発明者らの結果は、EY2E1-Bが、DNAワクチンカセットとして、

50

C T L 応答の大きさと幅の両方を増大させる免疫原となり得ることを示唆している。より一般的な意味においては、この構築物は、D N A ベクター以外のアプローチにおいて、H I V 株に対してより強く、そしてより幅広い細胞性免疫応答の誘導のための他の土台において有用である可能性がある。

【 0 2 0 0 】

(実施例 2)

誘発された細胞性免疫応答の多様性および幅を増大させる新規の操作された H I V - 1 クレード C エンベロープ D N A ワクチンの開発

強い H I V - 1 特異的 C T L 応答は、急性感染および無症候性感染の間のウイルス量の管理において重要な役割を有している。しかし、コンセンサス免疫原についての最近の実験は、改良された細胞性免疫応答を目に見えるほどに明らかにすることはできていない。ここでは、本発明者らは、改善された細胞性免疫応答について、新規の操作されたクレード C コンセンサスをベースとするエンベロープ免疫原を試験する。新規のワクチン (p E Y 3 E 1 - C) を、H I V - 1 クレード C コンセンサスエンベロープ配列から作成した。初期トランスミッター配列に基づいて高度に可変性の V 1 および V 2 領域を短くすること、C C R 5 の利用のための V 3 ループの保持、エンベロープの再利用を防ぐための C 末端からの細胞質末端領域の除去、ならびに、適正な折り畳みのための切断部位と T M D の保持を含む、いくつかの改変を行った。また、I g E リーダー配列を N 末端に付加した。このコンセンサス D N A ワクチンもまた、R N A 最適化を行い、コドン最適化を行った。細胞性免疫応答を、E L I S p o t およびエピトープマッピングアッセイによって、B a 1 B / C マウスにおいて実験した。D N A ワクチンとして実験した場合には、p E K 3 P - C (クレード C e n v の一次単離物に由来する) と比較して、本発明者らの構築物 (p E Y 3 E 1 - C) は、細胞性免疫応答を駆動することにおいてより有効であった。p E Y 3 E 1 - C によって誘発された細胞性免疫応答は、コンセンサスクレード C ペプチドによって刺激した場合には、p E K 3 P - C よりも大きさにおいて大きかった。加えて、コンセンサス免疫原は、これらもまたクレード C に由来する一次単離物ペプチドの 2 つの他のセットによって刺激された場合には、細胞性免疫応答の大きさの増大を誘発した。大きくなった大きさに加えて、C T L 応答の幅の増大が、2 9 の強い反応性のペプチドのプールのうちの少なくとも 1 5 (1 0 0 万個の脾細胞あたり 5 0 個を超えるスポットを有している) を誘導する p E Y 3 E 1 - C の能力によってサポートされたが、p E K 3 P - C は、わずかに、2 9 個のプールのうちの 3 個、そして、2 つの一時単離物ペプチドのセットに反応する強い反応性を有している 2 9 のプールのうちの 9 個しか誘導しなかった。これらは、幅を評価するためのストリンジェントな対照となるそれらの独自性と能力について選択した。さらに、p E Y 3 E 1 - C は、強い交差クレードの細胞性免疫応答を、クレード B ペプチドで刺激された場合に誘発した。コンセンサス免疫原 p E Y 3 E 1 - C は、D N A ワクチンカセットとして、C T L 応答の大きさと幅の両方を増大させ、このことは、H I V ワクチン混合物において成分抗原となるコンセンサス免疫原の能力が、さらなる実験に値することを示唆している。

【 0 2 0 1 】

幅広い遺伝子多様性、迅速な変異、および既存の株の組み換えのために、有効なワクチンの作成の難しさはとてつもない。個々の単離物由来の候補の D N A ワクチンは、多様な流行している H I V - 1 株に対する防御に不可欠な交差反応性を誘発できない可能性がある。

【 0 2 0 2 】

加えて、H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質を発現している D N A ワクチンは、極めて免疫原性が低いことが報告されている。

【 0 2 0 3 】

本発明者らは、D N A ワクチンによって誘発された C T L 応答の効力を増大させるために多工程のストラテジーを使用して、流行しているウイルス株に対する防御を提供することができた。

【 0 2 0 4 】

10

20

30

40

50

最近の実験は、コンセンサス免疫原が、迅速に進化している HIV - 1 ウイルスによって作成される多様性の障害を克服できる可能性があることを示している。

【0205】

Derdeynらは、より短いV1～V4領域が、初期感染性サブタイプCウイルスの特徴であることを明らかにしており、本発明者らの構築物は、初期に感染したウイルスによって生じる免疫応答を生じることに有用である可能性があるこの特徴を有するように設計されている。

【0206】

さらに、本発明者らのDNAワクチンの発現レベルは、コドン最適化、RNA最適化、および免疫グロブリンリーダー配列の付加によって増大させられている。

【0207】

HIV - 1 特異的CTL応答は、急性感染および無症候性感染、ならびに、AIDSの発症の間のウイルス量を管理することにおいて重要であることが示されており、したがって、以下のデータは、本発明者らの新規の免疫原によって誘発されたCTL応答に焦点が当てられる。

【0208】

図13は、誘発された細胞性免疫応答の多様性と幅を増大させる、新規の操作されたHIV - 1クレードCエンベロープDNAワクチンの開発のための免疫原の設計を示す。

【0209】

図14は、系統発生的関係を示す；36個のHIV - 1サブタイプCエンベロープ配列、EY3E1 - C、EK3P - C、2つのサブタイプB、1つのサブタイプA、および1つのサブタイプD配列（外集団）を、系統発生的分析に含めた。幅広い試料多様性を示したサブタイプCエンベロープ配列は12の国に由来した。

【0210】

表3は、可能性のあるエンベロープワクチン候補とサブタイプCエンベロープ配列のアラインメントとの間での類似性の割合（％）のスコアの平均と範囲を示す。

【0211】

【表3】

表 3

	平均%類似性スコア	%類似性スコアの範囲
pEY3E1-C	85.3	82.7-93.1
pEK3P-C	87.4	83.6-90.2

3匹のBalB/Cマウスの3つのグループを、免疫化の間に2週間の間隔を空けて、100μgのDNAで3回免疫化した。7週目に、細胞実験のために脾臓を回収した。

【0212】

図15のパネルAおよびBに示すように、強い細胞性応答がpEY3E1 - Cによって誘発された。

【0213】

図16は、pEY3E1 - Cによって誘発された、強い、そして幅広い細胞性応答を示す。コンセンサスCenvペプチドの29のプールで刺激した場合には、pEY3E1 - Cをワクチン接種したマウスは、23のプールから、100万個の脾細胞あたり50個を越えるスポットを誘発し；pEK3P - Cをワクチン接種したマウスは、2つのプールから、100万個の脾細胞あたり50個を越えるスポットを誘発した。

【0214】

図17のパネルA～Dは、同じクレードにおいて、pEY3E1 - Cによって誘発された、強い交差反応性の細胞性応答を示す。

【0215】

図18のパネルAおよびBは、pEY3E1-Cによって誘発された、強く、そして幅広い交差反応性の細胞性応答を示す。パネルAは、サブタイプC(ウルグアイ)env-特異的IFN-ELISPOTによるデータを示す。クレードC(ウルグアイ)envペプチドの29のプールで刺激した場合には、pEY3E1-Cをワクチン接種したマウスは、12個のプールから、100万個の脾細胞あたり50個を超えるスポットを誘発した；pEK3P-Cをワクチン接種したマウスは、3つのプールから、100万個の脾細胞あたり50個を超えるスポットを誘発した。パネルBは、サブタイプC(南アフリカ)env-特異的IFN-ELISPOTによるデータを示す。クレードC(南アフリカ)envペプチドの29のプールで刺激した場合には、pEY3E1-Cをワクチン接種したマウスは、13のプールから、100万個の脾細胞あたり50個を超えるスポットを誘発した；pEK3P-Cをワクチン接種したマウスは、5のプールから、100万個の脾細胞あたり50個を超えるスポットを誘発した。

10

【0216】

図19のパネルA~fは、クレード間で、pEY3E1-Cによって誘発された、強い交差反応性の細胞性応答を示す。

【0217】

EOC免疫原によって誘導された細胞性免疫応答の幅と大きさは、有意に増大した。より幅広い交差クレードの反応性が、この免疫原のさらなる利点として現れる。

【0218】

(実施例3)

E6/E7融合タンパク質をコードする新規の操作されたHPV-16 DNAワクチンの効力

免疫原を、E6とE7の配列がタンパク質分解的切断によって分離されるようなポリタンパク質として発現されるように設計した。ポリタンパク質はまた、IgEリーダー配列とともに発現させた。ポリタンパク質の設計には、p53の結合と分解に重要なE6配列の中に欠失または変異を、そしてE7タンパク質上のRb結合部位の中に変異を含めた。図23は、免疫原の設計の説明を提供する。

20

【0219】

ポリタンパク質をコードするコード配列をベクターpVAXに挿入して、プラスミドp1667を得た。図24は、pVaxとp1667のマップを示す。

30

【0220】

TC1腫瘍細胞を、HPV-16E7で不死化させ、そしてc-Ha-ras腫瘍遺伝子で形質転換した。これらの細胞は、E7を低レベルで発現し、極めて発ガン性が高い。

【0221】

マウスでの免疫原性実験においては、3匹のマウス/グループのC57BL6マウスに、100µgのDNA/マウスを投与した。グループには以下を含めた：1) pVAX-対照ベクターを投与した対照、および2) p1667を投与した試験。マウスは、0日目、14日目、および28日目にワクチン接種した。35日目にマウスを殺し、ELISPOTを行った(Focus on CMI)。

40

【0222】

DNA免疫原p1667によって誘導された細胞性免疫応答についてのデータを図25に示す。HPV16コンセンサスE6およびE7ペプチド(9アミノ酸が重複している37、15-マー)を、2つのプール-プール1:18ペプチド；プール2:19ペプチドにおいて使用した。パネルAおよびCは、脾細胞全てによるデータを示す。パネルBおよびDは、CD8を枯渇させた試料によるデータを示す。

【0223】

図26は、免疫優勢エピトープマッピングの結果を示す。2つの配列が記載される。

【0224】

マウスでの予防的実験においては、5匹のマウス/グループのC57BL6マウスに、1

50

00 µg の DNA / マウスを投与した。グループには以下を含めた：1) 未処置 (PBS を注射した)、2) pVAX - 対照ベクターを投与した対照、および 3) p1667 を投与した試験。マウスは、0 日目、14 日目、および 28 日目にワクチン接種した。35 日目に、マウスを TC - 1 細胞でチャレンジし、その後、腫瘍の大きさの測定を行った。結果を図 27 に示す。IL - 15 構築物を同時投与したグループによるデータもまた示す。

【0225】

マウスでの腫瘍退縮実験においては、5 匹のマウス / グループの C57BL6 マウスに、100 µg の DNA / マウスを投与した。グループには以下を含めた：1) 未処置 (PBS を注射した)、2) pVAX - 対照ベクターを投与した対照、および 3) p1667 を投与した試験。マウスを、0 日目に 5 × 10⁴ の TC - 1 細胞でチャレンジした。マウスに、3 日目、10 日目、および 17 日目に DNA ワクチンを投与した。腫瘍を、8 日目に開始して測定した。結果を図 28 に示す。IL - 15 構築物を同時投与したグループによるデータもまた示す。

10

【0226】

脾臓の中の E7 テトラマー陽性リンパ球のレベルを決定した。図 29 は、E7 テトラマー陽性リンパ球の割合 (%) としてデータを示す。DNA ワクチン p1667 は、脾臓の中の CD62L^{lo} である E7 特異的 CD8 + T 細胞の活性化を誘導する。

【0227】

腫瘍の中の E7 テトラマー陽性リンパ球のレベルを決定した。図 30 は、E7 テトラマー陽性リンパ球の割合 (%) としてデータを示す。DNA ワクチン p1667 は、腫瘍の中の CD62L^{lo} である E7 特異的 CD8 + T 細胞の活性化を誘導する。

20

【0228】

トランスジェニックマウスにおいて、E6 / E7 DNA ワクチン防御実験を行った。未処置のもの、pVAX、p1667、p1667 + IL - 15、および E7 / HisB の間で比較を行った。データを図 31 に示す。p1667 と、p1667 + IL - 15 は完全に防御した。

【0229】

本明細書中に示したデータは、以下の結論をサポートする。p1667 構築物は、IFN - 応答の上昇を媒介する E7 特異的 CD8 + リンパ球を誘導することができる強い細胞性免疫応答を誘導する。本発明者らは、DNA 構築物の投与後にそれに対して抗原特異的 CTL が生じる、優勢、および新規のサブドミナント HPV - 16 エピトープの両方を同定した。p1667 構築物は、腫瘍の増殖を妨げ、そして C57 / BL6 およびトランスジェニックマウスのいずれにおいても腫瘍の退縮を引き起こすことができる。DNA ワクチン p1667 は、HPV が関係している微視的なガンを標的化するための新規の治療戦略の大きな可能性を示す。

30

【0230】

(実施例 4)

HIV Env コンセンサス配列をコードする核酸配列は、様々な他の HIV タンパク質 (例えば、Gag、Pol、Gag / Pol、Nef、Vif、および Vpr) をコードする核酸配列と組み合わせた DNA ワクチンとして、例えば、筋肉内または皮内送達のためのエレクトロポレーション技術を使用して投与することができる。多価 (multivalent) / 多価 (polyvalent) HIV ワクチン構築物は、免疫応答の増強を提供することができ、特に有用であり得る。いくつかの実施形態においては、IL - 12 コード配列がさらに提供される。米国特許出願公開番号 20070106062 (これは、引用により本明細書中に組み入れられる) には、HIV Vif DNA ワクチンが開示されている。米国特許出願公開番号 20040106100 (これは、引用により本明細書中に組み入れられる) には、HIV アクセサリータンパク質と、加えてさらに別のワクチン構築物を調製するために使用することができるそのようなタンパク質の配列が含まれている HIV ワクチンが開示されている。米国特許第 6,468,982 号、同第 5,817,637 号、および同第 5,593,972 号 (これらは、引用により本明細書中

40

50

に組み入れられる)には、H I V g a g、H I V p o l、およびH I V g a g / p o l構築物が含まれているDNAワクチンが開示されている。エレクトロポレーションは、米国特許第7,245,963号(これは、引用により本明細書中に組み入れられる)に記載されている。P C T出願番号P C T / U S 9 7 / 1 9 5 0 2(これは、引用により本明細書中に組み入れられる)には、I L - 1 2構築物が開示されている。米国特許出願公開番号20070041941(これは、引用により本明細書中に組み入れられる)には、I L - 1 5をコードする構築物が開示されている。

【0231】

(実施例5)

アカゲザルの2つのグループを、最適化したプラスミドg a gおよびe n v構築物を用いて、プラスミドI L - 1 2を伴って、またはこれを伴わずに、3回I M免疫化した。同じ免疫化ストラテジーを、2つのさらに別のグループについて使用したが、プラスミドは、インビボでのエレクトロポレーションで、またはインビボでのエレクトロポレーションを用いることなく送達した。

10

【0232】

細胞性応答を、それぞれの免疫化後と、メモリー応答については5ヶ月後に、I F N E L I S p o tによって決定した。実験全体を通じて、体液性応答を、組み換え体p 2 4およびg p 1 6 0 E L I S Aによって評価した。抗原特異的T細胞の増殖能力を、C F S E染色によって決定した。細胞内サイトカイン染色を、誘導されたT細胞応答の機能的特徴をさらに特性決定するために行った。

20

【0233】

プラスミドI L - 1 2は、本発明者らの最適化した構築物に対する細胞性応答を増大させた。しかし、プラスミドの送達を増強するためのエレクトロポレーションの使用によって、プラスミドI L - 1 2を用いたI M免疫化と比較して、細胞性応答と体液性応答の両方を改善することができた。様々なパラメーターによって測定すると、プラスミドI L - 1 2とエレクトロポレーションの組み合わせにより、一次応答およびメモリー応答の両方において最良の免疫応答が生じた。

【0234】

アカゲザルにおいて、DNAアジュバントとしてのプラスミドI L - 1 2の存在下およびプラスミドI L - 1 2が存在しない条件下で、H I V g a gおよびe n vをコードする最適化したDNA構築物を比較した。I L - 1 2は、定量的E L I S p o t形式で、T細胞応答を実質的に5倍増大させることができ、これにより、実質的に良好なメモリーT細胞応答が生じた。しかし、E Pに由来するDNAは、T細胞応答およびメモリー応答を生じることに比べてより効果的であった。これは、I L - 1 2 I Mアジュバント化DNAワクチンと比較して、2倍大きかった。最良の応答は、E P + I L - 1 2アジュバントの併用療法群において観察された。この併用療法におけるメモリー応答は、I M DNAだけの場合よりも10倍大きく、E Pだけの場合よりもほぼ2倍大きかった。本発明者らはまた、E Pだけの場合と比較して、E P + I L - 1 2併用療法においてはC F S Eによって4倍良好な免疫の拡大を観察した。多機能T細胞の存在もまた、DNA + サイトカイン + E P併用療法が最も有効であることを示唆していた。

30

40

【0235】

材料および方法

動物：

アカゲザル(Macaco mulatto)は、American Association for Accreditation of Laboratory Animal Careの基準にしたがって、BIOQUAL, Inc. (Rockville, MD)において飼育した。動物は、いずれの実験の前にも、少なくとも30日間、隔離して順応させた。

【0236】

免疫化：

50

5匹のアカゲザルは、1.0mgのpGag4YおよびpEY2E1-Bで、0週目、4週目、および11週目に免疫化した。それぞれの免疫化の時点で、DNAを2つの注射部位（それぞれの大腿四頭筋の中に1つ）に送達した。アカゲザルのうちの3匹は、IM注射後にエレクトロポレーションした。5匹のアカゲザルの別のグループは、1.0mgのpGag4Y、pEY2E1-B、およびWLV104で、0週目、4週目、および8週目に免疫化した。5匹の動物のうち、2匹の動物にはIM注射によって免疫を投与し、3匹の動物にはIM注射後にエレクトロポレーションを行った。全てのエレクトロポレーション手順は、定電流Cellecra（登録商標）デバイス（VGX Immune Therapeutics Division of VGX Pharmaceuticals, The Woodlands, TX）を使用して行った。エレクトロポレーションの条件は、0.5Amps、3パルス、1秒のパルス間隔で52msecのパルス長であった。このソフトウェアによって制御されるデバイスを、プラスミドの送達と定電流方形波パルスの作成の直前に組織抵抗を測定するように設計し、それにより筋肉組織の外側への送達のリスクとプラスミドの喪失の可能性を排除した。

10

【0237】

血液の回収：

動物を、実験の期間中、2週間ごとに採血した。10mLの血液をEDTAチューブの中に回収した。PBMCを標準的なFicoll-hypaque遠心分離によって単離し、その後、完全培養培地（10%の熱不活化ウシ胎児血清、100IU/mLのペニシリン、100µg/mLのストレプトマイシン、および55µM/Lのβ-メルカプトエタノールを補充した、2mM/LのL-グルタミンを含むRPMI1640）の中に再懸濁した。RBCを、ACK溶解緩衝液（Cambrex Bio Science, East Rutherford, NJ）で溶解させた。

20

【0238】

プラスミドとプラスミド産物：

Gag4Yは、以下を含むいくつかの改変を有している、HIVクレードA、B、C、およびDのgagタンパク質のコンセンサス配列をコードしている発現カセットを含む：kozak配列の付加、置換されたIgEリーダー配列、哺乳動物細胞の中での発現のためのコドン最適化とRNA最適化（配列番号11に、HIV Gagコンセンサス配列を開示する）。さらなる実験のために、Gag4Y遺伝子を、発現ベクターpVaxの中にサブクローニングした。pEY-2E1-Bには、HIVクレードBのエンベロープのコンセンサス配列をコードする発現カセットが含まれる（配列番号3に、HIV Envコンセンサス配列を開示する）。WLV104Mは、アカゲザルIL-12遺伝子をコードするプラスミドである。プラスミドは、Aldevron（Fargo, ND）で生産し、そしてVGX Immune Therapeutics（The Woodlands, TX）で、低分子量の0.1%のポリ-L-グルタミン酸ナトリウム塩を含む注射用滅菌水の中に再度処方した。

30

【0239】

凍結保存したPBMCのCFSE

凍結保存したPBMCを、37°Cの水浴中で迅速に解凍し、完全培地で洗浄した。細胞を、37°Cのインキュベーターの中で一晩インキュベートし、翌日、細胞数を得た。細胞をペレットとし、PBS中の1mLのCFDA SE（Molecular Probes, Eugene, OR）（1:2000希釈）の中に再懸濁した。細胞を、37°Cで10分間インキュベートした。細胞を完全培地で洗浄し、 1×10^6 細胞/100µlの濃度になるように再懸濁し、100µlの2µg/mLの組み換え体HIV-1 gp120またはgp120（ImmunoDiagnostics, Woburn, MA）+ペプチドプールを含む96ウェル丸底プレートの中にプレートした。5µg/mLのコンカナバリンA（陽性）および完全培地（陰性）を対照として使用した。培養物を5日間インキュベートした。細胞を、最初にVivid dye violet（生存/死滅細胞マーカー）で、氷上で15分間染色した。細胞を、PBSで1回洗浄した。その後、細胞を、抗ヒトC

40

50

D3 - PE (クローン SP34 - 2) (BD Pharmingen) および抗ヒト CD4 - PerCP (クローン L200)、抗ヒト CD8 - APC (SK1) を使用して、4 で1時間染色した。その後、細胞を PBS で2回洗浄し、1%のパラホルムアルデヒドで固定した。データを、LSRIIFローサイトメーター (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) を使用して回収した。フローサイトメリーのデータを、FlowJoソフトウェア (Tree Star, Ashland, OR) を使用して、CD3 + リンパ球をゲートした。1つの試料あたり3万個から5万個の CD3 + リンパ球を回収した。

【0240】

酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) :

96 ウェルプレートに、HIV gag および env 応答をそれぞれ決定するために、100 ng / ウェルの組み換え体 HIV - 1 IIB p24 または gp120 (Immuno Diagnostics) で一晩コーティングした。100 ng / ウェルのウシ血清アルブミンでコーティングしたプレートを、陰性対照とした。プレートを、3%の BSA - PBST で、37 で1時間ブロックした。その後、プレートを、4倍希釈の血清の段階希釈物とともに、37 で1時間インキュベートした。次いで、ヤギ抗サル IgG 西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体を、1 : 10,000 希釈 (MP Biomedicals, Aurora, OH) でプレートに添加して、37 で1時間インキュベートした。テトラメチルベンジジン (R&D systems, Minneapolis, MN) を使用してプレートを発色させ、2Nの H₂SO₄ を用いて反応を停止させた。その後、光学密度 (OD) を測定した。

【0241】

IgG 終点力価 (end - point titer) を、BSA のウェルの平均の OD 値の2倍を超える OD 値を生じた、血清希釈率の逆数と定義した。

【0242】

酵素結合免疫スポットアッセイ (ELISpot)

抗原特異的応答を、ペプチドを含むウェルから、陰性対照であるウェルの中のスポットの数を減算することによって決定した。結果は、3連のウェルについて得られた平均値として示す (スポットの数 / 100万個の脾細胞)。

【0243】

1. 細胞内サイトカインの染色

抗体試薬

直接結合させた抗体は以下から入手した: BD Biosciences (San Jose, CA) : IL - 2 (PE)、CD3 (Pacific Blue)、IFN - (PE - Cy7)、および TNF - (Alexa Fluor 700)、CD8 (APC)、および CD4 (PerCP)。

【0244】

細胞の刺激と染色

PBMC を、完全 RPMI 中に 1×10^6 細胞 $s / 100 \mu l$ になるように再懸濁し、 $100 \mu l$ の 1 : 200 希釈物の刺激ペプチドを含む 96 ウェルプレートにプレートした。刺激していない対照と陽性対照 (Staphylococcus エンテロトキシン B、 $1 \mu g / mL$; Sigma - Aldrich) を、それぞれのアッセイに含めた。細胞を、37 で5時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を洗浄し (PBS)、表面抗体で染色した。細胞を洗浄し、Cytotfix / Cytoperm キット (BD Pharmingen, San Diego, CA) を使用して説明書にしたがって固定した。固定後、細胞を、パーム緩衝液で2回洗浄し、細胞性マーカーに対する抗体で染色した。染色後、細胞を洗浄し、固定し (1%のパラホルムアルデヒドを含む PBS)、そして分析するまで4 で保存した。

【0245】

フローサイトメトリー

細胞を、改良型LSRIIFローサイトメーター(BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA)で分析した。1つの試料あたり5万個のCD3+事象を回収した。データ分析を、FlowJoバージョン8.4.1(TreeStar, San Carlos, CA)を使用して行った。最初のゲーティングには、高さ(FSC-H)に対する前方散乱面積(FSC-A)のプロットを使用して、二重項を除去した。事象について、SSCに対するFSC-Aのプロットによってリンパ球のゲーティングを行った。この後、事象を連続して、ダウンレギュレーションの原因であるIFN- γ に対する、CD3+、CD8+、およびCD4-事象に対してゲートした。CD8+T細胞の同定の後、ゲートを、最適な分離が提供される組み合わせを使用して個々のそれぞれの機能について作成した。それぞれの機能についてのゲートを作成した後、本発明者らは、Booleanゲートプラットフォームを使用して、3つの機能を試験する場合の8個の応答パターンに等しい、可能な組み合わせについての完全なアレイを作成した。データは、バックグラウンドの補正後を報告する。陽性な応答についての閾値は、10事象または0.05%であった。

【0246】

統計分析

データを、Prism Graphpadソフトウェアを使用して分析し、平均 \pm SEMとして表した。

【0247】

結果

ELISpot分析

細胞性免疫応答の誘導を、IFN- γ ELISpotによるそれぞれの免疫化の後に評価した。1回の免疫化後(図1)、IM注射によってプラスミドDNAを投与したグループだけが、弱い細胞性免疫応答を示した(74 ± 29 SFU/ 10^6 PBMC)。アカゲザルのIL-12プラスミドとの同時免疫化によっては、より高い応答が生じた(136 ± 51.4 SFU/ 10^6 PBMC)。エレクトロポレーションした(EP)グループは、IMグループよりも6倍高い平均応答を有していた(482 ± 181 SFU/ 10^6 PBMCs)。EPとのIL-12の同時免疫化の組み合わせは、IFN- γ 生産細胞の数をさらに2倍にした(1030 ± 494 SFU/ 10^6 PBMCs)。

【0248】

2回の免疫化の後(図1)、IMおよびIM+IL-12のグループは、ELISpotの数において中程度の増加を有していた(それぞれ、 104 ± 67.9 SFU/ 10^6 PBMCおよび 223 ± 76.6 SFU/ 10^6 PBMC)。EPグループは、以前の免疫化よりもほぼ4倍大きく(1924 ± 417 SFU/ 10^6 PBMC)、そしてEP+IL-12グループは、再び、EP療法だけの場合と比較して、2倍の数のIFN- γ 生産細胞(2819 ± 872 SFU/ 10^6 PBMC)を有していた。

【0249】

3回目の免疫化の後(図1)、EPグループの抗原特異的細胞の数は、IMグループの抗原特異的細胞の数よりも1対数多かった(それぞれ、 53000 ± 3781 、および 370 ± 110 SFU/ 10^6 PBMC)。IM+IL-12グループもまた、ELISpot数を用いた細胞応答において劇的な増大を有しており、これは、以前の免疫化よりも、ほぼ1対数大きかった(2042 ± 311 SFU/ 10^6 PBMC)。他の2回の免疫化を用いた場合には、EP+IL-12グループは、ワクチン接種を行ったグループ全てのうちで最も強力であった(7228 ± 2227 SFU/ 10^6 PBMC)。

【0250】

交差反応性のエンベロープ応答の誘導

良好なHIVワクチンには、交差反応性の免疫応答の誘導が必要であろう。これに関しては、EP+IL-12が、不一致なペプチドライブラリーに対する交差反応性の大きさを改善できるかどうかを観察することに関心が集まった。本発明者らは、コンセンサスグループMに由来するペプチドライブラリーを使用して、env抗原によって誘導された交差

10

20

30

40

50

反応性のCTL応答を比較した。交差反応性は全てのグループにおいて観察された。しかし、結果は、サブタイプB ELISpot分析において観察されたものと同じ大きさの相違を示した(図2)。3回の免疫化の後では、IMグループは、グループMエンベロープペプチドに対して最も低い応答を有していた($222 \pm SEM$ SFU/ 10^6 PBMC)。IL-12の添加によっては、応答が2倍になった($540 \pm SEM$ SFU/ 10^6 PBMC)。より高いグループMエンベロープ応答は、EPを用いた場合に誘導され($830 \pm SEM$ SFU/ 10^6 PBMC)、これは、IL-12の同時注射を用いた場合にさらに増強された($1238 \pm SEM$ SFU/ 10^6 PBMC)。

【0251】

1. メモリーT細胞応答

重要なことは、DNAプラットフォームを用いた場合のメモリー応答の発生を改善できることである。本発明者らは、最後のDNAワクチン接種の後5ヶ月間、ELISpot分析を行った(図3)。IMグループにおいては、プラスミドIL-12の添加によって、メモリー細胞のほぼ10倍の増大が生じた(751 ± 11.1 、および 78.6 ± 16.9 SFU/ 10^6 PBMC)。IL-12が、この重要なT細胞の表現形に対して陽的な影響を及ぼし得ることは明白である。さらに、抗原特異的IFN 生産細胞の数は、EPグループにおいては相当数存在していたが、IL-12アジュバント+EPによっては、最も活発なメモリー応答が生じ(それぞれ、 1231 ± 523.5 、および 3795 ± 1336 SFU/ 10^6 PBMC)、応答は、複合技術によって極めて強いT細胞メモリー応答が駆動されたことを示している。

【0252】

DNAワクチンに対する体液性免疫応答

IM DNAワクチン技術の弱さは、ヒト以外の霊長類と、ヒトでの臨床試験において、明確な抗体応答を誘導することができなかつたその能力に原因がある。本発明者らは、ELISA形式において、組み換え体p24およびgp160抗原に対するHIV-1 gagおよびenv特異的抗体力価の両方を誘導するそれぞれのグループの能力を評価した。いずれの抗原についても、IMおよびIM+IL-12のグループは、有意な抗体力価は示さなかつた($< 1:50$ の終点力価)。エレクトロポレーションしたグループは、組み換え体p24に結合することができる劇的に高いgag抗体力価を示した。EPとEP+IL-12グループはいずれも、12週目では、同様の終点力価を有していたが(それぞれ、22,400および12,800)、EP+IL-12グループは、より効率的な抗体応答を生じた。その応答は、免疫化の図式よりも速く現れ、最も迅速に最大レベルにまで上昇した。env抗体応答もまた、gag抗原を用いた場合に、より低い終点力価で作用するという本発明者らが観察した結果を反映していた。

【0253】

CD4⁺およびCD8⁺ T細胞の増殖

相当数のELISpot応答を観察したので、本発明者らは次に、細胞性免疫のさらなるパラメーターを試験した。本発明者らは、様々な免疫療法の間で、ペプチド刺激後にインビトロで増殖する、gag特異的CD4⁺およびCD8⁺T細胞の能力を試験した。最後の免疫化の2週間後に回収した凍結保存した試料を刺激し、CFSEアッセイによって分析した。平均のCD4⁺応答は、ELISpotアッセイにおいて観察されたものと同様に増大した。比較すると、CD8増殖の誘導は、大きさに関してはるかに大きかった。本発明者らは、IL-12が、IMだけを用いた場合よりもCD8⁺T細胞の増殖を増大させ、そしてEPが実質的に高かったことを観察した。EP+IL-12グループは、インビトロでの刺激の後に増殖することができるCD8⁺細胞について最も高い割合(%)を有していた(それぞれ、 $2.51 \pm SEM$ %および $4.88 \pm SEM$ %)。明白なCD8 T細胞の増殖のバンドが、EP+IL-12療法において観察され、これは、この併用免疫の強い増殖させる能力を明らかに示している。

【0254】

多機能CD8⁺ T細胞応答

本発明者らは、EPとIL-12の同時免疫化の後の、強いIFN γ エフェクター応答の誘導を明らかに観察したが、本発明者らは、様々な療法における抗原特異的CD8 $^{+}$ T細胞応答の機能をさらに特性決定することを望んだ。最後の免疫化の3ヶ月後に採取した試料をgagペプチドで刺激し、IFN γ 、TNF α 、およびIL-2の細胞内サイトカインの生産について染色した。全てのグループのうち、IM+IL-12のグループにおいてはわずかに1匹の動物、そしてEPだけのグループにおいても1匹の動物が、検出可能なIFN γ 応答を有していた。しかし、EPプラスIL-12で免疫化したグループの3匹の動物のうちの2匹が、gag特異的IFN γ を生産するCD8 $^{+}$ T細胞を有していた。IM+IL-12レスポナーは、3種類のサイトカインの全てについて染色された多機能性の細胞のうちの小さい割合を占めており、さらには、IL-2を生産するその能力を失った集団を有していた。EPレスポナーは、4つの異なる集団からなるわずかにより高度に多機能性の応答を有していた。最も劇的な応答は、第2のEP+IL-12動物において見られた。そのCD8 $^{+}$ T細胞のうちの2%を超えるものが3種類のサイトカインを全て生産することができ、2%が、IFN γ とTNF α の両方を生産することができた。明らかに、それぞれのグループの動物の数が少なく、これらの結果を確認するためのさらなる霊長類での実験が必要である。しかし、まとめると、観察された傾向は明白であるようであり、希望が得られるものである。

【0255】

考察

DNAワクチンアジュバントとしてのIL-12は、ELISpot応答を、プラスミドだけを用いた場合の数倍にまで改善する。加えて、増殖が明らかに増強された。EPグループは、IMだけのグループ、または組み合わせたELISpot応答を示したIM+IL-12療法のいずれよりも高い平均応答を示し、これは、IM+IL-12グループよりも3倍高かった。最良のELISpot応答は、EP+IL-12療法において観察され、これは、IM+IL-12療法のほぼ4倍、IMだけを用いた場合のほぼ19倍であった。

【0256】

それぞれの免疫化の後の、IFN γ ELISpotによる抗原特異的応答の大きさを決定した。EPグループおよびEP+IL-12グループの動物は全て、1回の免疫化の後に検出可能な応答を有していただけでなく、これらは、3回の免疫化の後には、IMグループにおいて見られた平均よりも高い平均を有していた。2回の免疫化の後では、EPグループおよびEP+IL-12グループのIFN γ 応答は、ウイルスベクターを使用した実験において報告されている応答に匹敵した。実質的なメモリー応答が、最後の免疫化の5ヶ月後に、IM+IL-12グループとEPグループの両方において観察された。

【0257】

IM免疫化は、IL-12を用いた場合にも、またIL-12を用いなかった場合にも、有意な量の抗体を生じることにはなかった。エレクトロポレーションは、以前に報告されたように、体液性の免疫応答を増強させることができた。エレクトロポレーションを行ったグループの動物は全て、セロコンバージョンしていた。EPグループとEP+IL-12グループは、3回の免疫化の後には、同様の終点力価を有していたが、抗体誘導の速度論は、EP+IL-12グループにおいてわずかに早かった。

【0258】

CD8 $^{+}$ T細胞の増殖能力は、EPとプラスミドIL-12を用いた場合に増強されることが明らかとなった。このデータは、ELISpotアッセイにおいて観察されたメモリーの拡大をサポートしており、ここでは、抗原特異的T細胞の発現は、おそらく、EP+IL-12療法の増殖能力の増強の結果である。

【数1】

10

20

30

40

50

Page 1

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania
 <120> IMPROVED VACCINES AND METHODS FOR USING THE SAME
 <130> F1-18B1FA20

<150> US 60/833,861
 <151> 2006-07-28

10

<150> US 60/833,856
 <151> 2006-07-28

<150> US 60/890,352
 <151> 2007-02-16

<160> 43

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
 <211> 2142
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Subtype A consensus Envelope DNA sequence construct

20

<400> 1
 ggatccatgg actggacctg gattctgttc ctggtggccg ccgccaccag agtgcacagc 60
 agagtgatgg gcatccagcg gaattgccag cacctgtgga gatggggcac catgatcctg 120
 ggcatgatca tcactgtctc tgccgccgag aacctgtggg tgaccgtgta ctacggcgtg 180
 cctgtgtgga aggacgccga gaccaccctg ttctgcgcca gcgacgcaa ggcttacgat 240
 accgaagtgc acaatgtgtg ggccacccac gcctgcgtgc ctaccgatcc caacccccag 300
 gagatcaacc tggagaacct gaccgaggag ttcaacatgt ggaagaaca catggtggag 360
 cagatgcaca ccgacatcat cagcctgtgg gaccagagcc tgaagcctt cgtgaagctg 420
 acccctctgt gcgtgacct gaactgcagc aacgtgaac tgaccaccaa catcatgaag 480
 ggcgagatca agaactgcag cttcaacatg accaccgagc tgcgggacaa gaagcagaaa 540
 gtgtacagcc tgttctacaa gctggacctg gtgcagatca acaagagcaa cagcagcagc 600
 cagtaccggc tgatcaactg caacaccagc gccatcacc aggcctgccc caaagtgagc 660
 ttcgagccca tccccatcca ctactgcgcc cctgccggct tcgccatcct gaagtgcaag 720
 gacaaggagt ttaacggcac cggcccctgc aagaatgtga gcaccgtgca gtgacccac 780
 ggcatcaagc ccgtggtgtc caccagctg ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggaa 840
 gtgatgatcc ggagcgagaa catcaccaac aacccaaga acatcatcgt gcagctgacc 900
 aagcccgtga agatcaattg caccggccc aacaacaaca cccggaagag catcagaatc 960
 ggccctggcc aggccttcta cgccaccggc gacatcatcg gcgatatcag gcaggcccac 1020
 tgcaatgtga gccggaccga gtggaacgag accctgcaga aagtggccaa gcagctgcgg 1080

30

40

【 数 2 】

Page 2

aagtacttca acaacaagac catcatcttc accaacagca gggcggcag actgagaatc 1140
 accacccaca gcttcaattg tggcggcgag ttcttctact gcaataacctc cggcctgttc 1200
 aacagcacct ggaacggcaa cggcaccaag aagaagaaca gcaccgagag caaccgaccc 1260
 atcacctgc cctgccggat caagcagatc atcaatatgt ggcagagggt gggccaggcc 1320
 atgtacgcc ctcccatcca gggcgtgatc agatgcgaga gcaacatcac cggcctgtctg 1380
 ctgaccagag atggcggcga caacaacagc aagaacgaga ccttcagacc tggcggcggga 1440
 gatcagagg acaactggcg gagcagctg tacaagtaca aagtgtgaa gatcagagccc 1500
 ctggcgttg cccccaccaa ggccaagaga agagtgtgg agcgggagaa gagagctgtg 1560
 ggcacggcg cgtgttctt ggccttctc ggagccgcc gaagcaccat gggagccgcc 1620
 agcatcacc tgaccgtgca ggcagacag ctgctgagcg gcattgtgca gcagcagagc 1680
 aacctgctga gagccatcga ggcccagcag cacctgctga agctgacagt gtggggcatc 1740
 aaacagctgc agcccgctg gctggccgtg gagagatacc tgaaggacca gcagctgctg 1800
 ggcacatgg gctgcagcgg caagctgatc tgcaccacca acgtgcctg gaatagcagc 1860
 tggagcaaca agagccagag cgagatctgg gacaacatga cctggctgca gtgggacaag 1920
 gagatcagca actacaccga tatcatctac aacctgatcg aggagagcca gaaccagcag 1980
 gagaagaac agcaggatct gctggccctg gacaagtggg ccaacctgtg gaactgtgtc 2040
 gacatcagca actggctgtg gtacatcaag atcttcatca tgattgtggg cggcctgatc 2100
 ggctgagaa tctgttctgc cgtgctgtct gtgtgactcg ag 2142

10

<210> 2
 <211> 709
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Subtype A consensus Envelope protein sequence construct

<400> 2

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

30

His Ser Arg Val Met Gly Ile Gln Arg Asn Cys Gln His Leu Trp Arg
 20 25 30

Trp Gly Thr Met Ile Leu Gly Met Ile Ile Ile Cys Ser Ala Ala Glu
 35 40 45

Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Asp Ala
 50 55 60

Glu Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
 65 70 75 80

40

【数 3】

Page 3

Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
85 90 95

Pro Gln Glu Ile Asn Leu Glu Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Met Trp
100 105 110

Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Thr Asp Ile Ile Ser Leu Trp
115 120 125

Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
130 135 140

Leu Asn Cys Ser Asn Val Asn Val Thr Thr Asn Ile Met Lys Gly Glu
145 150 155 160

Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Met Thr Thr Glu Leu Arg Asp Lys Lys
165 170 175

Gln Lys Val Tyr Ser Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val Val Gln Ile Asn
180 185 190

Lys Ser Asn Ser Ser Ser Gln Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser
195 200 205

Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile
210 215 220

His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys
225 230 235 240

Glu Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr Val Gln Cys
245 250 255

Thr His Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly
260 265 270

Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Met Ile Arg Ser Glu Asn Ile Thr Asn
275 280 285

Asn Ala Lys Asn Ile Ile Val Gln Leu Thr Lys Pro Val Lys Ile Asn
290 295 300

Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro
305 310 315 320

Gly Gln Ala Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln
325 330 335

Ala His Cys Asn Val Ser Arg Thr Glu Trp Asn Glu Thr Leu Gln Lys
340 345 350

10

20

30

40

【数 4】

50

Page 4

Val Ala Lys Gln Leu Arg Lys Tyr Phe Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe
355 360 365

Thr Asn Ser Ser Gly Gly Arg Leu Arg Ile Thr Thr His Ser Phe Asn
370 375 380

Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Gly Leu Phe Asn Ser
385 390 395 400

10

Thr Trp Asn Gly Asn Gly Thr Lys Lys Lys Asn Ser Thr Glu Ser Asn
405 410 415

Asp Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp
420 425 430

Gln Arg Val Gly Gln Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Gln Gly Val Ile
435 440 445

Arg Cys Glu Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly
450 455 460

Asp Asn Asn Ser Lys Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met
465 470 475 480

20

Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile
485 490 495

Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu
500 505 510

Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu
515 520 525

Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val
530 535 540

30

Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu
545 550 555 560

Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Lys Leu Thr Val Trp
565 570 575

Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu
580 585 590

Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile
595 600 605

Cys Thr Thr Asn Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln

40

【数 5】

50

Page 5

610 615 620

Ser Glu Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Leu Gln Trp Asp Lys Glu Ile
625 630 635 640

Ser Asn Tyr Thr Asp Ile Ile Tyr Asn Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn
645 650 655

Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Asp Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp Ala
660 665 670

Asn Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Ser Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys
675 680 685

Ile Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe
690 695 700

Ala Val Leu Ser Val
705

10

<210> 3
 <211> 2734
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Subtype B consensus Envelope DNA sequence construct

<400> 3
 ggatccgccca ccatggactg gacctggatt ctgttctctg tggccgccgc caccagagtg 60
 cacagcagag tgaagggcat ccggaagaac taccagcacc tgtggagatg gggcaccatg 120
 ctgctgggca tgcctgatgat ctgttctgcc gccgagaagc tgtgggtgac cgtgtactac 180
 ggctgacctg tctggaagga ggccaccacc acctgttct gccccagcga cggcaaggcc 240
 tacgataccg aagtgcacaa tgtgtgggcc acccacgcct gcgtgcctac cgatcccaac 300
 cctcaggaag tggctctgga gaacctgacc gagaacttca acatgtggaa gaacaacatg 360
 gtggagcaga tgcacgagga catcatcagc ctgtgggacc agagcctgaa gccttgctg 420
 aagctgacct ctctgtgctg gacctgaac tgcaccgacc tgagcggcga gaagatggag 480
 aaggcgaga tcaagaactg cagcttcaac atcaccacct ccatccggga caaagtgcag 540
 aaggagtacg ccctgttcta caagctggac gtgtgcccc tgcacaacga caaccaccgc 600
 taccggctga tcagctgcaa caccagcgtg atcaccagg cctgcccga agtgagcttc 660
 gagccatcc ccatccacta ctgogccct gccggcttcg ccatcctgaa gtgcaacgac 720
 aagaagtca acggcaccgg cccttgacc aatgtgagca ccgtgcagtg caccacggc 780
 atcagaccgg tgggtgccac ccagctgctg ctgaaccgca gcctggccga ggaagaagtg 840
 gtgatccgga gcgagaattt caccaacaac gccaaagacca tcacgtgca gctgaacgag 900
 agcgtggaga tcaactgcac ccggcccaac aacaataacc ggaagagcat ccacatcggc 960

30

40

【 数 6 】

Page 6

cctggccagg ctttctacac caccggcgag atcatcggcg atatcaggca ggcccactgc	1020	
aatatcagcc gggccaagtg gaacaacacc ctgaagcaga togtgaagaa gctgcgggag	1080	
cagttcggca acaagaccat cgtgttcaac cagagcagcg gcggcagacc tagaatcgtg	1140	
atgcacagct tcaactgttg cggcgagttc ttctactgca acacaacca gctgttcaac	1200	
agcaccctgga acgtgaacgg gacctggaac aacaacaccg agggcaacga caccatcacc	1260	
ctgccctgcc ggatcaagca gatcatcaat atgtggcagc aggtgggcaa ggccatgtac	1320	
gcccctccca tcagaggcca gatccggtgc agcagcaata tcaccggcct gctgctgacc	1380	10
agagatggcg gcaacaataa caccaacgag accgagatct ttagacctgg cggcggagac	1440	
atgagggaca actggcggag cgagctgtac aagtacaaag tggtaagat cgagcccctg	1500	
ggcgtggccc ccaccaaggc caagagaaga gtggtgcagc gggagaagag agctgtgggc	1560	
atcggcgcca tgtttctggg ctttctggga gccgccgaa gcaccatggg agccgccagc	1620	
atgaccctga ccgtgcagcc cagacagctg ctgagcggca tcgtgcagca gcagaacaac	1680	
ctgctgagag ccatcagggc ccagcagcac ctgctgcagc tgacagtgtg gggcatcaag	1740	
cagctgcagg ccccgctgct ggccgtggag agatacctga aggaccagca gctgctggga	1800	
atctggggct gcagcggcaa gctgatctgc accaccaccg tgcccctggaa cggcagctgg	1860	20
agcaacaaga gcctggacga gatctgggac aacatgacct ggaatggagtg ggagcgggag	1920	
atcgacaact acaccagcct gatctacacc ctgatoagg agagccagaa ccagcaggag	1980	
aagaacgagc aggagctgct ggagctggac aagtgggcca gcctgtggaa ctggttcgac	2040	
atcaccaact ggctgtggtg catcaagatc ttcatcatga ttgtggcgg cctgatcggc	2100	
ctgagaatcg ttttcgccgt gctgagcacc taccctacc acgtgcccga ttaccctga	2160	
gaattcgtaa gtaagtgtca tatgggagag ctcgactaga ctggacagcc aatgacgggt	2220	
aagagagtga cttttctcac taacctaaaga caggagggcc gtcaaagcta ctgcctaatac	2280	
caatgacggg taatagtgc aagaaatgta tcaactcaac ctaagacagg cgcagcctcc	2340	
gagggatgtg tctttgtttt tttataatta aaaagggtga catgtccgga gccgtgctgc	2400	30
ccggatgatg tcttggcctc tgtttgctac cggtatcgat gttaacgtcg accccgggct	2460	
cgaggtaagt aagtgtcata tgggagagct cgactagact ggacagccaa tgacgggtaa	2520	
gagagtgaca tttctacta acctaagaca ggagggccgt caaagctact gcctaatacca	2580	
atgacgggta atagtgacaa gaaatgtatc actccaacct aagacaggcg cagcctccga	2640	
gggatgtgtc tttgttttt tataattaaa aagggtgaca tgtccggagc cgtgctgccc	2700	
ggatgatgtc ttggcctctg tttgctgcgg ccgc	2734	
<210> 4		
<211> 715		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		40

【数 7】

Page 7

<220>

<223> Subtype B consensus Envelope protein sequence construct

<400> 4

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15His Ser Arg Val Lys Gly Ile Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg
20 25 30Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Ala Glu
35 40 45Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
50 55 60Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
65 70 75 80Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
85 90 95Pro Gln Glu Val Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
100 105 110Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
115 120 125Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
130 135 140Leu Asn Cys Thr Asp Leu Ser Gly Glu Lys Met Glu Lys Gly Glu Ile
145 150 155 160Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Ile Arg Asp Lys Val Gln
165 170 175Lys Glu Tyr Ala Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Asn
180 185 190Asp Asn Thr Ser Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr
195 200 205Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys
210 215 220Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asp Lys Lys Phe Asn
225 230 235 240Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly
245 250 255

10

20

30

40

【数 8】

50

Page 8

Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala
260 265 270

Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Glu Asn Phe Thr Asn Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg
290 295 300

Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Gln Ala
305 310 315 320

Phe Tyr Thr Thr Gly Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys
325 330 335

Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Val Lys
340 345 350

Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Asn Gln Ser
355 360 365

Ser Gly Gly Arg Pro Arg Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly
370 375 380

Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn
385 390 395 400

Val Asn Gly Thr Trp Asn Asn Asn Thr Glu Gly Asn Asp Thr Ile Thr
405 410 415

Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly
420 425 430

Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser
435 440 445

Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn Asn Thr
450 455 460

Asn Glu Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn
465 470 475 480

Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu
485 490 495

Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys
500 505 510

Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala

10

20

30

40

【数 9】

50

Page 9

515 520 525

Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg
 530 535 540

Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala
 545 550 555 560

Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys
 565 570 575

Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln
 580 585 590

Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr
 595 600 605

Thr Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Glu Ile
 610 615 620

Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr
 625 630 635 640

Thr Ser Leu Ile Tyr Thr Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu
 645 650 655

Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp
 660 665 670

Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile
 675 680 685

Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu
 690 695 700

Ser Ile Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 705 710 715

10

20

30

<210> 5
 <211> 2140
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Subtype C consensus Envelope DNA sequence construct

<400> 5
 ggatccgccca ccatggattg gacctggatt ctgttcctgg tggccgccgc cacaagagt 60
 cacagcagag tgcggggcat cctgagaaat tgccagcagt ggtggatctg ggcattctg 120
 gggttctgga tgctgatgat ctgcaacgtg atgggcaacc tgtgggtgac cgtgtactac 180
 ggctgocctg tgtggaagga ggccaagacc accctgttct gtgccagcga tgccaaggcc 240

40

【数 1 0】

50

Page 10

tacgagaccg aggtgcacaa tgtgtgggcc acccacgcct gtgtgcccac cgatcccaac 300
cctcaggaga tgggtctgga gaacgtgacc gagaacttca acatgtggaa gaacgacatg 360
gtggaccaga tgcacgagga catcatcagc ctgtgggacc agagcctgaa gccttgctgtg 420
aagctgaccg ctctgtgctg gacctgaac tgccggaaca acgtgaacaa caacaacacc 480
atgaaggagg agatcaagaa ctgcagcttc aacatcacca ccgagctgcg ggacaagaag 540
cagaagggtg acgccctggt ctaccggctg gacatcgtgc ccctgaacga gaagaacaac 600
agcaacgact accggctgat caactgcaac accagcgcca tcaccaggc ctgtcccaag 660
gtgtccttcg accccatccc catccactat tgtgcccctg ccggctacgc catcctgaag 720
tgcaacaaca agaccttcaa cggcaccggc ccctgcaata atgtgagcac cgtgcagtgt 780
accacgggca tcaagcctgt ggtgtccacc cagctgtgct tgaatggcag cctggccgag 840
gaggagatta tcatccggag cgagaacctg accaacaacg ccaagaccat cattgtgcac 900
ctgaatgaga gcgtggagat cgtgtgtacc cggcccaaca acaataccg gaagagcatc 960
agaatcggcc ctggccagac cttttacgcc accggcgaca tcatcggcga tatcaggcag 1020
gcccactgca atatcagcga ggagaagtgg aacaagacc tgacgagggt gtccgagaag 1080
ctgaaggagc acttcccaaa taagaccatc aagttcgccc ctagcagcgg cggcagactg 1140
gagatcacca cccacagctt caactgcagg ggcgagtctt ttactgcaa taccagcaag 1200
ctgttcaaca gcacctacat gcccaacagc accaacaata ccaacaccac catcacctg 1260
ccctgccgga tcaagcagat catcaatatg tggcaggaag tgggcagagc catgtacgcc 1320
cctcccatcg agggaacat caoctgcaag tccaacatca ccggcctgct gctgacaaga 1380
gatggcggca agaacgacac caatgacacc gagaccttca gacctggcgg cggagacatg 1440
agggacaact ggccggagcga gctgtacaag tacaaggtgg tggagatcaa gcctctgggc 1500
gtggccccta ccaaggccaa gaggagagtg gtggagaggg agaagagagc cgtgggcatc 1560
ggcgcctgtg ttctggcctt tctgggagcc gccggatcta caatgggagc cgcagcatc 1620
aactgaccg tgcaggccag acagctgctg agcggcatcg tgcagcagca gagcaatctg 1680
ctgagagcca tcgaggccca gcagcacatg ctgcagctga cagtgtgggg catcaagcag 1740
ctgcagacca gagtgtctggc catcagcgc tacctgaagg atcagcagct gctgggcatc 1800
tgggctgta gcggcaagct gatctgtacc accgccgtgc ctggaatag cagctggagc 1860
aacaagacc aggaggacat ctgggacaac atgacctgga tgcagtggga ccgggagatc 1920
agcaactaca ccgacaccat ctacaggctg ctggaggaca gccagaacca gcaggagaag 1980
aacgagaagg acctgctggc cctggacagc tggagaacc tgtggaactg gttcgacatc 2040
accaactggc tgtgtacat caagatcttc atcatgattg tggcggcct gatcggcctg 2100
agaatcatct tcgccgtgct gagcatctga tagcggccgc 2140

10

20

30

<210> 6

40

【数 1 1】

50

Page 11

<211> 705
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Subtype C consensus Envelope protein sequence construct
<400> 6

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Arg Val Arg Gly Ile Leu Arg Asn Cys Gln Gln Trp Trp Ile
20 25 30

Trp Gly Ile Leu Gly Phe Trp Met Leu Met Ile Cys Asn Val Met Gly
35 40 45

Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
50 55 60

Lys Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Glu Thr Glu
65 70 75 80

Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
85 90 95

Pro Gln Glu Met Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
100 105 110

Lys Asn Asp Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
115 120 125

Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
130 135 140

Leu Asn Cys Arg Asn Asn Val Asn Asn Asn Asn Thr Met Lys Glu Glu
145 150 155 160

Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Glu Leu Arg Asp Lys Lys
165 170 175

Gln Lys Val Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg Leu Asp Ile Val Pro Leu Asn
180 185 190

Glu Lys Asn Asn Ser Asn Asp Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser
195 200 205

Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Asp Pro Ile Pro Ile
210 215 220

His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Tyr Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys
225 230 235 240

10

20

30

40

【数 1 2】

50

Page 12

Thr Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Asn Asn Val Ser Thr Val Gln Cys
245 250 255

Thr His Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly
260 265 270

Ser Leu Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asn
275 280 285

10

Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val His Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Val
290 295 300

Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro
305 310 315 320

Gly Gln Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln
325 330 335

Ala His Cys Asn Ile Ser Glu Glu Lys Trp Asn Lys Thr Leu Gln Arg
340 345 350

Val Ser Glu Lys Leu Lys Glu His Phe Pro Asn Lys Thr Ile Lys Phe
355 360 365

20

Ala Pro Ser Ser Gly Gly Arg Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn
370 375 380

Cys Arg Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Lys Leu Phe Asn Ser
385 390 395 400

Thr Tyr Met Pro Asn Ser Thr Asn Asn Thr Asn Thr Thr Ile Thr Leu
405 410 415

Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg
420 425 430

30

Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Glu Gly Asn Ile Thr Cys Lys Ser Asn
435 440 445

Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Lys Asn Asp Thr Asn
450 455 460

Asp Thr Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp
465 470 475 480

Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Glu Ile Lys Pro Leu Gly
485 490 495

Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu Arg Glu Lys Arg

40

【数 1 3】

gaaggaagcc accaccaccc tgttctgcgc cagcgatgcc aagagctaca agaccgaggc	180	
ccacaatata tgggccaccc acgocctcgt gcctaccgat cccaaccctc aggagatcga	240	
gctggagaac gtgaccgaga acttcaacat gtggaagaac aacatggtgg agcagatgca	300	
cgaggacatc atcagcctgt gggaccagag cctgaagcct tgcgtgaagc tgaccocctct	360	
gtgctgacc ctgaactgca ccgacggcat gaggaacgac accaacgata ccaacgtgac	420	
catggaggag ggcgagatga agaactgcag ctcaacatc accaccgaag tgcgggacaa	480	10
gaagaagcag gtgcacgccc tgttctacaa gctggacgtg gtgcccacg acgacaacaa	540	
caccaacaac agcaactacc ggctgatcaa ctgcaacacc agcgcctca cccaggcctg	600	
ccccaaagtg accttcgagc ccatcccat ccactactgc gccocctcgg gcttcgcat	660	
cctgaagtgc aaggataaga agtcaacgg caccggcccc tgcaagaatg ttagcaccgt	720	
gcagtgcacc cacgcatca gacccgtggt gtccaccag ctgctgctga acggcagcct	780	
ggccgaggag gagatcatca tccggagcga gaacctgacc aacaacgcca agatcatcat	840	
tgtcagctg aacgagagcg tgaccatcaa ttgacccgg ccctacaaca ataccggaa	900	
gcgatcccc atcggcctgg gccaggcctt ctacaccacc agaggcatca tggcgacat	960	
cagacaggcc cactgcaata tcagcggagc cgagtggaat aagaccctgc agcaggtggc	1020	20
caagaagctg ggcgacctgc tgaacaagac caccatcatc ttcaagccta gcagcggcgg	1080	
cagacctaga atcaccacc acagcttcaa ttgtggcggc gaggttctt actgcaatac	1140	
cagccggctg ttcaacagca cctggagcaa gaacagcacc agcaactcca ccaaggagaa	1200	
caacaccatc accctgccct gccggatcaa gcagatcatc aatatgtggc agggagtggg	1260	
caaggccatg tacgcccctc ccctcgaggg cctgatcaag tgcagcagca acatcaccgg	1320	
cctgctgctg accagagatg gcggagccaa caactccac aacgagacct tcagacctgg	1380	
cgccggagac atgagggaca actggcggag cgagctgtac aagtacaag tggatgaagat	1440	
cgagcccctg ggcgtggccc ccaccagagc caagagaaga gtggtggagc gggagaagag	1500	
agccatogga ctggcgcca tgttcctggg cttcctggga gccgccgaa gcaccatggg	1560	30
agccgccagc ctgacctga ccgtgcaggc cagacagctg ctgagcggca tegtgcagca	1620	
gcagaacaac ctgctgagag ccattgaggc ccagcagcac ctgctgcagc tgacagtgtg	1680	
ggcattaag cagctgcagg ccaggattct ggccgtggag cgctacctga aggatcagca	1740	
gctgctggga atctggggct gcagcggcaa gcacatctgc accaccaccg tgccttggaa	1800	
tagcagctgg agcaacaaga gcctggacga gatctggaac aacatgacct ggatggagtg	1860	
ggagaggag atcgacaact acaccggcct gatctacagc ctgatcgagg agagccagac	1920	
ccagcaggag aagaacgagc aggagctgct ggagctggac aagtgggcca gcctgtggaa	1980	
ctggttcagc atcaccagc ggctgtgta catcaagatc ttcacatga ttgtggcgg	2040	
cctgatoggc ctgagaatog tgttcgocgt gctgagcctg tgactcgag	2089	40

【数 1 5】

Page 15

<210> 8
<211> 714
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Subtype D consensus Envelope protein sequence construct
<400> 8

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val 10
1 5 10 15

His Ser Arg Val Arg Gly Ile Lys Arg Asn Tyr Gln His Leu Trp Lys
20 25 30

Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Thr Cys Ser Val Ala Glu
35 40 45

Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
50 55 60

Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ser Tyr Lys Thr Glu 20
65 70 75 80

Ala His Asn Ile Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
85 90 95

Pro Gln Glu Ile Glu Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
100 105 110

Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
115 120 125

Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
130 135 140

Leu Asn Cys Thr Asp Gly Met Arg Asn Asp Thr Asn Asp Thr Asn Val 30
145 150 155 160

Thr Met Glu Glu Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr
165 170 175

Glu Val Arg Asp Lys Lys Lys Gln Val His Ala Leu Phe Tyr Lys Leu
180 185 190

Asp Val Val Pro Ile Asp Asp Asn Asn Thr Asn Asn Ser Asn Tyr Arg
195 200 205

Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val 40
210 215 220

【数 1 6】

Page 16

Thr Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala
225 230 235 240

Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys
245 250 255

Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser
260 265 270

Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile
275 280 285

10

Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asn Asn Ala Lys Ile Ile Ile Val Gln Leu
290 295 300

Asn Glu Ser Val Thr Ile Asn Cys Thr Arg Pro Tyr Asn Asn Thr Arg
305 310 315 320

Lys Arg Ile Pro Ile Gly Leu Gly Gln Ala Phe Tyr Thr Thr Arg Gly
325 330 335

Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Gly Ala Glu
340 345 350

20

Trp Asn Lys Thr Leu Gln Gln Val Ala Lys Lys Leu Gly Asp Leu Leu
355 360 365

Asn Lys Thr Thr Ile Ile Phe Lys Pro Ser Ser Gly Gly Arg Pro Arg
370 375 380

Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn
385 390 395 400

Thr Ser Arg Leu Phe Asn Ser Thr Trp Ser Lys Asn Ser Thr Ser Asn
405 410 415

Ser Thr Lys Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln
420 425 430

30

Ile Ile Asn Met Trp Gln Gly Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro
435 440 445

Ile Glu Gly Leu Ile Lys Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu
450 455 460

Thr Arg Asp Gly Gly Ala Asn Asn Ser His Asn Glu Thr Phe Arg Pro
465 470 475 480

Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr
485 490 495

40

【数 1 7】

Page 17

Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Arg Ala Lys
500 505 510

Arg Arg Val Val Glu Arg Glu Lys Arg Ala Ile Gly Leu Gly Ala Met
515 520 525

Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser
530 535 540

Leu Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln
545 550 555 560

Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu
565 570 575

Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala
580 585 590

Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys
595 600 605

Ser Gly Lys His Ile Cys Thr Thr Thr Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp
610 615 620

Ser Asn Lys Ser Leu Asp Glu Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu
625 630 635 640

Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Ser Leu Ile
645 650 655

Glu Glu Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu
660 665 670

Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Ser Ile Thr Gln Trp
675 680 685

Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly
690 695 700

Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Leu
705 710

- <210> 9
- <211> 1049
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Subtype B consensus Nef-Rev DNA sequence construct

<400> 9
ggatccgccacatggactg gacctggatt ctgttcctgg tggccgctgc caccagagtg 60

【数 1 8】

10

20

30

40

50

Page 18

cacagcagca agagaagcgt ggtgggttgg cctacagtgc gggagaggat gagaagagcc 120
gagcctgccg cogatggagt gggcgcctgt tctagagatc tggagaagca cggcgccatc 180
accagcagca ataccgccgc caacaatgcc gactgcgcct ggctggaggc ccaggaggag 240
gaggaagtgg gcttccctgt gagagcccag gtggccctga gagccatgac ctacaaggcc 300
gccctggatc tgagccactt cctgaaggag aagggcggcc tggaggcct gatctacagc 360
cagaagcggc aggacatcct ggatctgtgg gtgtaccaca cccagggcta cttccccgac 420
tggcagaatt acacccttg ccctggcatc agataccctc tgaccttcgg ctggtgcttc 480
aagctggtgc ctgtggagcc tgagaaagtg gaggaggcca acgaggcgga gaacaattct 540
gccccacc ctatgagcct gcacggcatg gacgatcccg agagggaagt gctggtgtgg 600
aagttcagca gcaggctggc cttccaccac atggccagag agctgcacc caggtactac 660
aaggactgcc gggcaggaa gagaagaagc gccggcagaa gcggcgacag cgacgaggag 720
ctgctgaaaa cagtgcggct gatcaagttc ctgtaccaga gcaaccctcc tcccagcccc 780
gaggcacca gacaggcccg gagaaaccgg aggaggcggg ggagagagag gcacggcgag 840
atcagaagca tcagcgagtg gattctgagc acctacctgg gcagaccgcg cgagcccgtg 900
cccctgcagc tgccccctt ggagagactg accctggact gcaacgagga ctgcggcacc 960
agcggcacc agggagtggg cagccccag atcctggtgg agagccctgc cgtgctggag 1020
agcggcacca aggagtgatg agcggccgc 1049

10

<210> 10
<211> 341
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Subtype B consensus Nef-Rev protein sequence construct
<400> 10

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

30

His Ser Ser Lys Arg Ser Val Val Gly Trp Pro Thr Val Arg Glu Arg
20 25 30

Met Arg Arg Ala Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala Val Ser Arg
35 40 45

Asp Leu Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Thr Ala Ala Asn
50 55 60

Asn Ala Asp Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu Val Gly
65 70 75 80

Phe Pro Val Arg Ala Gln Val Ala Leu Arg Ala Met Thr Tyr Lys Ala

40

【数 1 9】

Page 19

85 90 95

Ala Val Asp Leu Ser His Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu Glu Gly
100 105 110

Leu Ile Tyr Ser Gln Lys Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu Trp Val Tyr
115 120 125

His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Pro
130 135 140

10

Gly Ile Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe Lys Leu Val Pro
145 150 155 160

Val Glu Pro Glu Lys Val Glu Glu Ala Asn Glu Gly Glu Asn Asn Ser
165 170 175

Ala Ala His Pro Met Ser Leu His Gly Met Asp Asp Pro Glu Arg Glu
180 185 190

Val Leu Val Trp Lys Phe Asp Ser Arg Leu Ala Phe His His Met Ala
195 200 205

20

Arg Glu Leu His Pro Glu Tyr Tyr Lys Asp Cys Arg Gly Arg Lys Arg
210 215 220

Arg Ser Ala Gly Arg Ser Gly Asp Ser Asp Glu Glu Leu Leu Lys Thr
225 230 235 240

Val Arg Leu Ile Lys Phe Leu Tyr Gln Ser Asn Pro Pro Pro Ser Pro
245 250 255

Glu Gly Thr Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu
260 265 270

Arg Gln Arg Gln Ile Arg Ser Ile Ser Glu Trp Ile Leu Ser Thr Tyr
275 280 285

30

Leu Gly Arg Pro Ala Glu Pro Val Pro Leu Gln Leu Pro Pro Leu Glu
290 295 300

Arg Leu Thr Leu Asp Cys Asn Glu Asp Cys Gly Thr Ser Gly Thr Gln
305 310 315 320

Gly Val Gly Ser Pro Gln Ile Leu Val Glu Ser Pro Ala Val Leu Glu
325 330 335

Ser Gly Thr Lys Glu
340

40

【数 2 0】

50

Page 20

<210> 11
<211> 1863
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Gag consensus DNA sequence of subtype A. B. C and D construct

```

<400> 11
ggatccgccca ccatggactg gacctggatt ctgtttctgg tcgccgccgc cacaagagtg    60
cacagcggcg ccagagccag cgtgctgtcc ggccggcaagc tggaccctg ggagaagatc    120
agactgaggc ctggcggcaa gaagaagtac cggctgaagc accttgtgtg ggccagcaga    180
gagctggaga gattcgccct gaatcctggc ctgctggaga ccagcgaggg ctgtaagcag    240
atcatcggcc agctgcagcc cggcctgcag accggcagcg aggagctgag aagcctgtac    300
aacaccgtgg ccaccctgta ctgctgtcac gagaagatcg aggtgaagga caccaaggag    360
gccctggaca agatcgagga ggagcagaac aagagcaagc agaaggccca gcaggccgcc    420
gccgacaccg gcaacagcag ccagggtgcc cagaactacc coatcgtgca gaatctgcag    480
ggccagatgg tgcaccaggc catcagcccc agaaccctga atgcctgggt gaaggtgatc    540
gaggagaagg ccttcagccc tgaggtgatc cctatgttca gcgccctgag cgaggcgccc    600
acacctcagg acctgaacac catgctgaac acagtggggg gccaccaggc cgccatgcag    660
atgctgaagg ataccatcaa cgaggaggcc gccgagtggg acagactgca ccccgtcac    720
gccggaccta tcgccctgg ccagatgaga gagcccagag gcagcgacat cgccggcacc    780
acctccacc tgcaagagca gatcggctgg atgaccagca accccccc atcctgtgggc    840
gacatctaca agcggtgat catcctgggc ctgaacaaga ttgtgaggat gtacagcccc    900
gtgtccatcc tggatatcag gcagggcccc aaggagccct tcagagacta cgtggaccgg    960
ttcttcaaga cctgagagc cgagcaggcc agccaggagc tgaagaactg gatgaccgag   1020
accctgctgg tgcagaacgc caaccccagc tgtaagacca tcctgagagc cctgggccct   1080
ggcggccccc tggaggagat gatgaccgcc tggcaggagc tggcgggacc cggccacaag   1140
gccagagtgc tggccgaggc catgagccag gccaccaaca gcaacatcat gatgcagcgg   1200
ggcaacttca gagccccag gaggatcgtg aagtgttca actgtggcaa ggagggccac   1260
atgccagaaa actgtagggc ccccaggaag aagggtgctt ggaagtgttg caaagagggg   1320
caccagatga aggactgtac cgagcggcag gccaatctcc tggggaagat ctggcccagc   1380
cacaagggca gacccggcaa tttcctgcag agcagacctg agcccaccgc ccctcccgcc   1440
gagagcttcg gcttcggcga ggagatcacc cccagcccca agcaggagcc caaggacaga   1500
gagctgtacc ctctggccag cctgaagagc ctgttcggca acgatcccct gagccagtac   1560
ccctacgaog tgcccgatta gcctgagaa ttcgtaagta agtgtcatat gggagagctc   1620
gactagactg gacagccaat gacgggtaag agagtgcacat ttctcactaa cctaagacag   1680
gagggccgtc aaagctactg cctaatacaa tgacgggtaa tagtgacaag aaatgtatca   1740

```

【 数 2 1 】

Page 21

ctccaacct agacaggcgc agcctccgag ggatgtgtct tttgtttttt ataattaa 1800
 agggtgacat gtccggagcc gtgctgccc gatgatgtct tggcctctgt ttgotgccc 1860
 cgc 1863

<210> 12
 <211> 524
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Gag consensus protein sequence of subtype A, B, C and D construct
 <400> 12

10

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His Ser Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala
 20 25 30

Trp Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu
 35 40 45

Lys His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn
 50 55 60

20

Pro Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile Gly Gln
 65 70 75 80

Leu Gln Pro Ala Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr
 85 90 95

Asn Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Glu Lys Ile Glu Val Lys
 100 105 110

Asp Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser
 115 120 125

Lys Gln Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly Asn Ser Ser Gln
 130 135 140

30

Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val
 145 150 155 160

His Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Ile
 165 170 175

Glu Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu
 180 185 190

Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val
 195 200 205

40

【数 2 2】

Page 22

Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Asp Thr Ile Asn Glu
210 215 220

Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Ile
225 230 235 240

Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr
245 250 255

Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Ser Asn Pro Pro
260 265 270

Ile Pro Val Gly Asp Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn
275 280 285

Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln
290 295 300

Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Phe Lys Thr
305 310 315 320

Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Trp Met Thr Glu
325 330 335

Thr Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Arg
340 345 350

Ala Leu Gly Pro Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln
355 360 365

Gly Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met
370 375 380

Ser Gln Ala Thr Asn Ser Asn Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
385 390 395 400

Gly Pro Arg Arg Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
405 410 415

Ile Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
420 425 430

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
435 440 445

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser His Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
450 455 460

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ser Phe Gly

10

20

30

40

【数 2 3】

50

Page 23

465 470 475 480

Phe Gly Glu Glu Ile Thr Pro Ser Pro Lys Gln Glu Pro Lys Asp Arg
485 490 495

Glu Leu Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Lys Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro
500 505 510

Leu Ser Gln Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
515 520

10

<210> 13
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IgE Primer Sequence 1

<400> 13
gtcgcctccgc tagcttgtgg gtcacagtct attatggggt acc 43

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> IgE Primer Sequence 2

<400> 14
ggtcggatcc ttactccacc actotccttt ttgcc 35

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IgE leader sequence

<400> 15 30

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His

<210> 16
<211> 692
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Subtype A consensus Envelope protein sequence

<400> 16 40

【数 2 4】

Page 24

Ser Arg Val Met Gly Ile Gln Arg Asn Cys Gln His Leu Trp Arg Trp
1 5 10 15

Gly Thr Met Ile Leu Gly Met Ile Ile Ile Cys Ser Ala Ala Glu Asn
20 25 30

Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Asp Ala Glu
35 40 45

Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val
50 55 60

10

His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro
65 70 75 80

Gln Glu Ile Asn Leu Glu Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Met Trp Lys
85 90 95

Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Thr Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp
100 105 110

Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu
115 120 125

20

Asn Cys Ser Asn Val Asn Val Thr Thr Asn Ile Met Lys Gly Glu Ile
130 135 140

Lys Asn Cys Ser Phe Asn Met Thr Thr Glu Leu Arg Asp Lys Lys Gln
145 150 155 160

Lys Val Tyr Ser Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val Val Gln Ile Asn Lys
165 170 175

Ser Asn Ser Ser Ser Gln Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Ala
180 185 190

Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His
195 200 205

30

Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys Glu
210 215 220

Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr
225 230 235 240

His Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser
245 250 255

Leu Ala Glu Glu Glu Val Met Ile Arg Ser Glu Asn Ile Thr Asn Asn
260 265 270

40

【数 2 5】

Page 25

Ala Lys Asn Ile Ile Val Gln Leu Thr Lys Pro Val Lys Ile Asn Cys
275 280 285

Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly
290 295 300

Gln Ala Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala
305 310 315 320

His Cys Asn Val Ser Arg Thr Glu Trp Asn Glu Thr Leu Gln Lys Val
325 330 335

Ala Lys Gln Leu Arg Lys Tyr Phe Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Thr
340 345 350

Asn Ser Ser Gly Gly Arg Leu Arg Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys
355 360 365

Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Gly Leu Phe Asn Ser Thr
370 375 380

Trp Asn Gly Asn Gly Thr Lys Lys Lys Asn Ser Thr Glu Ser Asn Asp
385 390 395 400

Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln
405 410 415

Arg Val Gly Gln Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Gln Gly Val Ile Arg
420 425 430

Cys Glu Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asp
435 440 445

Asn Asn Ser Lys Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg
450 455 460

Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu
465 470 475 480

Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu Arg
485 490 495

Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly
500 505 510

Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val Gln
515 520 525

Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu
530 535 540

10

20

30

40

【数 2 6】

50

Page 26

Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Lys Leu Thr Val Trp Gly
545 550 555 560

Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys
565 570 575

Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
580 585 590

10

Thr Thr Asn Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln Ser
595 600 605

Glu Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Leu Gln Trp Asp Lys Glu Ile Ser
610 615 620

Asn Tyr Thr Asp Ile Ile Tyr Asn Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln
625 630 635 640

Gln Glu Lys Asn Glu Gln Asp Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp Ala Asn
645 650 655

Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Ser Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile
660 665 670

20

Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala
675 680 685

Val Leu Ser Val
690

<210> 17
<211> 697
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Subtype B consensus Envelope protein sequence

30

<400> 17

Arg Val Lys Gly Ile Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly
1 5 10 15

Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Ala Glu Lys Leu
20 25 30

Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr
35 40 45

Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His
50 55 60

40

【数 2 7】

Page 27

Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln
65 70 75 80

Glu Val Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn
85 90 95

Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln
100 105 110

Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn
115 120 125

Cys Thr Asp Leu Ser Gly Glu Lys Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn
130 135 140

Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Ile Arg Asp Lys Val Gln Lys Glu
145 150 155 160

Tyr Ala Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Asn Asp Asn
165 170 175

Thr Ser Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala
180 185 190

Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro
195 200 205

Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asp Lys Lys Phe Asn Gly Thr
210 215 220

Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg
225 230 235 240

Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu
245 250 255

Glu Val Val Ile Arg Ser Glu Asn Phe Thr Asn Asn Ala Lys Thr Ile
260 265 270

Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn
275 280 285

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr
290 295 300

Thr Thr Gly Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile
305 310 315 320

Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Val Lys Lys Leu
325 330 335

10

20

30

40

【数 2 8】

50

Page 28

Arg Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Asn Gln Ser Ser Gly
340 345 350

Gly Arg Pro Arg Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe
355 360 365

Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Asn
370 375 380

10

Gly Thr Trp Asn Asn Asn Thr Glu Gly Asn Asp Thr Ile Thr Leu Pro
385 390 395 400

Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala
405 410 415

Met Tyr Ala Pro Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile
420 425 430

Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn Asn Thr Asn Glu
435 440 445

Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg
450 455 460

20

Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val
465 470 475 480

Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala
485 490 495

Val Gly Ile Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser
500 505 510

Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu
515 520 525

30

Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu
530 535 540

Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu
545 550 555 560

Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu
565 570 575

Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Thr Val
580 585 590

Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Glu Ile Trp Asp

40

【数 2 9】

Page 29

595 600 605

Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Ser
610 615 620

Leu Ile Tyr Thr Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn
625 630 635 640

Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp
645 650 655

Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met Ile
660 665 670

Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Ile
675 680 685

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
690 695

10

<210> 18
<211> 687
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Subtype C consensus Envelope protein sequence

<400> 18

Arg Val Arg Gly Ile Leu Arg Asn Cys Gln Gln Trp Trp Ile Trp Gly
1 5 10 15

Ile Leu Gly Phe Trp Met Leu Met Ile Cys Asn Val Met Gly Asn Leu
20 25 30

Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Lys Thr
35 40 45

Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Glu Thr Glu Val His
50 55 60

Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln
65 70 75 80

Glu Met Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn
85 90 95

Asp Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln
100 105 110

Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn
115 120 125

30

40

【数 3 0】

50

Page 30

Cys Arg Asn Asn Val Asn Asn Asn Asn Thr Met Lys Glu Glu Ile Lys
130 135 140

Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Glu Leu Arg Asp Lys Lys Gln Lys
145 150 155 160

Val Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg Leu Asp Ile Val Pro Leu Asn Glu Lys
165 170 175

Asn Asn Ser Asn Asp Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Ala Ile
180 185 190

Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Asp Pro Ile Pro Ile His Tyr
195 200 205

Cys Ala Pro Ala Gly Tyr Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe
210 215 220

Asn Gly Thr Gly Pro Cys Asn Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His
225 230 235 240

Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu
245 250 255

Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asn Asn Ala
260 265 270

Lys Thr Ile Ile Val His Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Val Cys Thr
275 280 285

Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln
290 295 300

Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His
305 310 315 320

Cys Asn Ile Ser Glu Glu Lys Trp Asn Lys Thr Leu Gln Arg Val Ser
325 330 335

Glu Lys Leu Lys Glu His Phe Pro Asn Lys Thr Ile Lys Phe Ala Pro
340 345 350

Ser Ser Gly Gly Arg Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys Arg
355 360 365

Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Lys Leu Phe Asn Ser Thr Tyr
370 375 380

Met Pro Asn Ser Thr Asn Asn Thr Asn Thr Thr Ile Thr Leu Pro Cys

10

20

30

40

【数 3 1】

50

Page 31

385 390 395 400

Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala Met
405 410 415

Tyr Ala Pro Pro Ile Glu Gly Asn Ile Thr Cys Lys Ser Asn Ile Thr
420 425 430

Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Lys Asn Asp Thr Asn Asp Thr
435 440 445

10

Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser
450 455 460

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Glu Ile Lys Pro Leu Gly Val Ala
465 470 475 480

Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu Arg Glu Lys Arg Ala Val
485 490 495

Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr
500 505 510

20

Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu
515 520 525

Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala
530 535 540

Gln Gln His Met Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln
545 550 555 560

Thr Arg Val Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu
565 570 575

Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro
580 585 590

30

Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln Glu Asp Ile Trp Asp Asn
595 600 605

Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Arg Glu Ile Ser Asn Tyr Thr Asp Thr
610 615 620

Ile Tyr Arg Leu Leu Glu Asp Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu
625 630 635 640

Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Ser Trp Lys Asn Leu Trp Asn Trp Phe
645 650 655

40

【数 3 2】

Page 32

Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met Ile Val
660 665 670

Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Ile Phe Ala Val Leu Ser Ile
675 680 685

<210> 19
<211> 696
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Subtype D consensus Envelope protein sequence

<400> 19

Arg Val Arg Gly Ile Lys Arg Asn Tyr Gln His Leu Trp Lys Trp Gly
1 5 10 15

Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Thr Cys Ser Val Ala Glu Asn Leu
20 25 30

Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr
35 40 45

Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ser Tyr Lys Thr Glu Ala His
50 55 60

20

Asn Ile Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln
65 70 75 80

Glu Ile Glu Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn
85 90 95

Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln
100 105 110

Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn
115 120 125

30

Cys Thr Asp Gly Met Arg Asn Asp Thr Asn Asp Thr Asn Val Thr Met
130 135 140

Glu Glu Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Glu Val
145 150 155 160

Arg Asp Lys Lys Lys Gln Val His Ala Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val
165 170 175

Val Pro Ile Asp Asp Asn Asn Thr Asn Asn Ser Asn Tyr Arg Leu Ile
180 185 190

Asn Cys Asn Thr Ser Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Thr Phe

40

【数 3 3】

Page 33

195

200

205

Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu
210 215 220

Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val
225 230 235 240

Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln
245 250 255

10

Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile Arg Ser
260 265 270

Glu Asn Leu Thr Asn Asn Ala Lys Ile Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu
275 280 285

Ser Val Thr Ile Asn Cys Thr Arg Pro Tyr Asn Asn Thr Arg Lys Arg
290 295 300

Ile Pro Ile Gly Leu Gly Gln Ala Phe Tyr Thr Thr Arg Gly Ile Ile
305 310 315 320

20

Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Gly Ala Glu Trp Asn
325 330 335

Lys Thr Leu Gln Gln Val Ala Lys Lys Leu Gly Asp Leu Leu Asn Lys
340 345 350

Thr Thr Ile Ile Phe Lys Pro Ser Ser Gly Gly Arg Pro Arg Ile Thr
355 360 365

Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser
370 375 380

Arg Leu Phe Asn Ser Thr Trp Ser Lys Asn Ser Thr Ser Asn Ser Thr
385 390 395 400

30

Lys Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile
405 410 415

Asn Met Trp Gln Gly Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Glu
420 425 430

Gly Leu Ile Lys Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg
435 440 445

Asp Gly Gly Ala Asn Asn Ser His Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly
450 455 460

40

【数 3 4】

Page 34

Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val
465 470 475 480

Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Arg Ala Lys Arg Arg
485 490 495

Val Val Glu Arg Glu Lys Arg Ala Ile Gly Leu Gly Ala Met Phe Leu
500 505 510

Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Thr
515 520 525

10

Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln
530 535 540

Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu
545 550 555 560

Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu
565 570 575

Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly
580 585 590

20

Lys His Ile Cys Thr Thr Thr Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn
595 600 605

Lys Ser Leu Asp Glu Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu
610 615 620

Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Ser Leu Ile Glu Glu
625 630 635 640

Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp
645 650 655

Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Ser Ile Thr Gln Trp Leu Trp
660 665 670

30

Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg
675 680 685

Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Leu
690 695

- <210> 20
- <211> 323
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Subtype B consensus Nef-Rev protein sequence

40

【数 3 5】

Page 35

<400> 20

Ser Lys Arg Ser Val Val Gly Trp Pro Thr Val Arg Glu Arg Met Arg
1 5 10 15

Arg Ala Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala Val Ser Arg Asp Leu
20 25 30

Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Thr Ala Ala Asn Asn Ala
35 40 45

10

Asp Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu Val Gly Phe Pro
50 55 60

Val Arg Ala Gln Val Ala Leu Arg Ala Met Thr Tyr Lys Ala Ala Val
65 70 75 80

Asp Leu Ser His Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu Glu Gly Leu Ile
85 90 95

Tyr Ser Gln Lys Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu Trp Val Tyr His Thr
100 105 110

20

Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Pro Gly Ile
115 120 125

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe Lys Leu Val Pro Val Glu
130 135 140

Pro Glu Lys Val Glu Glu Ala Asn Glu Gly Glu Asn Asn Ser Ala Ala
145 150 155 160

His Pro Met Ser Leu His Gly Met Asp Asp Pro Glu Arg Glu Val Leu
165 170 175

Val Trp Lys Phe Asp Ser Arg Leu Ala Phe His His Met Ala Arg Glu
180 185 190

30

Leu His Pro Glu Tyr Tyr Lys Asp Cys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
195 200 205

Ala Gly Arg Ser Gly Asp Ser Asp Glu Glu Leu Leu Lys Thr Val Arg
210 215 220

Leu Ile Lys Phe Leu Tyr Gln Ser Asn Pro Pro Pro Ser Pro Glu Gly
225 230 235 240

Thr Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln
245 250 255

40

【数 3 6】

Page 36

Arg Gln Ile Arg Ser Ile Ser Glu Trp Ile Leu Ser Thr Tyr Leu Gly
260 265 270

Arg Pro Ala Glu Pro Val Pro Leu Gln Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu
275 280 285

Thr Leu Asp Cys Asn Glu Asp Cys Gly Thr Ser Gly Thr Gln Gly Val
290 295 300

Gly Ser Pro Gln Ile Leu Val Glu Ser Pro Ala Val Leu Glu Ser Gly
305 310 315 320

10

Thr Lys Glu

<210> 21
<211> 506
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Gag consensus protein sequence of subtype A, B, C and D

<400> 21

Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp Glu
1 5 10 15

20

Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Tyr Arg Leu Lys His
20 25 30

Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro Gly
35 40 45

Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile Gly Gln Leu Gln
50 55 60

Pro Ala Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn Thr
65 70 75 80

30

Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Glu Lys Ile Glu Val Lys Asp Thr
85 90 95

Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys Gln
100 105 110

Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly Asn Ser Ser Gln Val Ser
115 120 125

Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val His Gln
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Ile Glu Glu

40

【数 3 7】

Page 37

145 150 155 160

Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu
165 170 175

Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly
180 185 190

His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Asp Thr Ile Asn Glu Glu Ala
195 200 205

10

Ala Glu Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro
210 215 220

Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser
225 230 235 240

Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Ser Asn Pro Pro Ile Pro
245 250 255

Val Gly Asp Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile
260 265 270

20

Val Arg Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro
275 280 285

Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Phe Lys Thr Leu Arg
290 295 300

Ala Glu Gln Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu
305 310 315 320

Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Arg Ala Leu
325 330 335

Gly Pro Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val
340 345 350

30

Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln
355 360 365

Ala Thr Asn Ser Asn Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Gly Pro
370 375 380

Arg Arg Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Ile Ala
385 390 395 400

Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys
405 410 415

40

【数 3 8】

Page 38

Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn Phe Leu
420 425 430

Gly Lys Ile Trp Pro Ser His Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe Leu Gln
435 440 445

Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ser Phe Gly Phe Gly
450 455 460

Glu Glu Ile Thr Pro Ser Pro Lys Gln Glu Pro Lys Asp Arg Glu Leu
465 470 475 480

10

Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Lys Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro Leu Ser
485 490 495

Gln Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
500 505

<210> 22
<211> 818
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HPV genotype 16 E6-E7 DNA sequence

20

<400> 22
gaattcgcca ccatggactg gacctggatc ctgttctgg tggccgccgc cacacgggtg 60
cacagcttc aggaccccca ggagagcggc agaaagctgc ctgagctgtg taccgagctg 120
cagaccacca tccacgacat catctggag tgtgtgtact gtaagcagca gctgctgagg 180
agagaggtgt acgaccggga cctgtgtatc gtgtacaggg acggcaatcc ctacgccgtg 240
tgtgacaagt gcctgaagtt ctacagcaag atcagcagat accggcacta ctgctacagc 300
ctgtacggca ccaccctgga gcagcagtac aacaagcccc tgtgtgacct gctgatccgg 360
tgtatcaact gccagaagcc cctgcagaga cacctggaca agaagcagcg gttccacaac 420
atcaggggca gatggaccgg cagatgtatg agctgctgcc ggagcagcag aaccagaagg 480
gagaccagc tgagaggccg gaagagaaga agccacggcg atacccccc cctgcacgag 540
tacctgctgg acctgcagcc tgagaccacc gatctgtacg gctacggcca gctgaatgac 600
agcagcgagg aggaggatga gatgcagggc cctgccggcc aggccagacc cgacagagcc 660
cactacaaca togtgacctt ttgctgtaag tgtgacagca ccctgagact gtgcgtgcag 720
agcaccacg tggacatcag aacctggag gatctgctga tgggcaccct gggcatcgtg 780
tgtccatct gctcccagaa accctgatga gcggccgc 818

30

<210> 23
<211> 264
<212> PRT
<213> Artificial sequence

40

【数 3 9】

Page 39

<220>

<223> HPV genotype 16 E6-E7 protein sequence

<400> 23

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Phe Gln Asp Pro Gln Glu Ser Gly Arg Lys Leu Pro Gln Leu
20 25 30

Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
35 40 45

Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Arg Asp Leu
50 55 60

Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys
65 70 75 80

Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser
85 90 95

Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp
100 105 110

Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Gln Arg His Leu
115 120 125

Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg
130 135 140

Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
145 150 155 160

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu
165 170 175

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly
180 185 190

Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala
195 200 205

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
210 215 220

Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
225 230 235 240

Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
245 250 255

10

20

30

40

【数 4 0】

50

Page 40

Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
260

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HPV E6 immunodominant epitope 10
<400> 24

Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
1 5 10 15

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HPV E7 immunodominant epitope 20
<400> 25

Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys
1 5 10 15

<210> 26
<211> 142
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HPV E6 consensus sequence 30
<400> 26

Phe Gln Asp Pro Gln Glu Ser Gly Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr
1 5 10 15

Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys
20 25 30

Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Arg Asp Leu Cys Ile
35 40 45

Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys
50 55 60

Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu
85 90 95 40

【数 4 1】

Page 41

Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Gln Arg His Leu Asp Lys
100 105 110

Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
115 120 125

Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
130 135 140

<210> 27
<211> 97
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HPV E7 consensus sequence

<400> 27

His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro
1 5 10 15

Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu
20 25 30

Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg
35 40 45

Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu
50 55 60

Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp
65 70 75 80

Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys
85 90 95

Pro

<210> 28
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IgE Leader Sequence

<400> 28

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser

【数 4 2】

10

20

30

40

50

Page 42

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Proteolytic Cleavage Sequence

<400> 29

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
1 5

10

<210> 30
<211> 1766
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HCV genotype 1a and 1b consensus E1-E2 DNA sequence

<400> 30

gaattcgcca ccatggactg gacctggatc ctgttcctgg tggccgctgc aacacgggtg 60
cacagctacc aagtgaggaa tagcagcggc ctgtaccacg tgaccaacga ctgctccaac 120
agcagcatcg tgtacgaggc cgccgacatg atcatgcaca cccccggctg tgtgccctgt 180
gtgagagagg gcaacagctc cagatgctgg gtggccctga cccctaccgt ggccgccaga 240
gatggcagcc tgcccaccac caccctgagg agacacgtgg acctgcttgt gggcagcgcc 300
accctgtgta gcgccatgta tgtggcgcat ctgtgtggca gctgtttct tgtggccag 360
ctgttcacct tcagcccag aaggcactgg accgtgcagg actgtaactg ctccatctac 420
cccggccaca tcaccggcca cagaatggcc tgggacatga tgatgaactg gagccctacc 480
accgccttgg tgggtgcca gctgctgaga atccctcagg ccatcgtgga catggtggcc 540
ggagccact gggcgctgct ggccggcacc gacctactca gcatggtggg caactgggcc 600
aaggtgctcg tgggtgctct gctgttcgcc ggctgggacg gcagaggcag gaagagaagg 660
agcgagacc acgtgaccgg cggcaccgcc ggcagaacca cagccggcct tgtgggcctg 720
ttcaccctg gcgccaagca gaacatccag ctgatcaaca ccaacggcag ctggcacatc 780
aacagcaccg ccctgaactg taacgacagc ctgaacaccg gctggctggc cggcctgttc 840
taccagcaca agttcaacag cagcggctgc cccgagagaa tggccagctg tagaccctg 900
gatgagttcg cccagggctg gggccccatc acctacgcca atggcagcgg ccctgaccag 960
agaccctact gctggcacta cgccccaga cctgtggca tcgtgccgc caagagcgtg 1020
tgtggccccg tgtactgctt caccctagc cccgtggtg tgggcaccac cgacagaagc 1080
ggagccccc cctacagctg gggcgagaac gagaccgacg tgctggtgct gaacaacacc 1140
agaccccc tgggcaattg gttcggctgt acctggatga acagaccgg cttcaccaaa 1200
gtgtgtggcg cccctccctg tgtgatcggc ggagtgggca acaacaccct gacctgcccc 1260

20

30

40

【数 4 3】

50

Page 43

accgactgct tcagaaagca ccccgaggcc acctactcca gatgtggcag cggaccttgg 1320
 ctgaccccca gatgtatggt ggactacccc tacaggctgt ggcactaccc ctgtaccgtg 1380
 aacttcacca tottcaaagt gaggatgtat gtggggggcg tggagcacag actggaggcc 1440
 gcctgtaatt ggaccagggg cgagagatgt gacctggagg accgggatag aagcagctg 1500
 tcccctctgc tgctgtccac caccgagtgg caggtgctgc cttgtagctt caccaccctg 1560
 cccgccctga gcaccggcct gatccacctg caccagaaca tcgtggacgt gcagtacctg 1620
 tacggagtgg gctctagcat cgtgtcctgg gccatcaagt gggagtacgt ggtgctgctg 1680
 ttctgtctgc tggccgacgc cagagtgtgt agctgcctgt ggatgatgct gctgatcagc 1740
 caggccgagg cctgatgagc ggccgc 1766

10

<210> 31
 <211> 580
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HCV genotype 1a and 1b consensus E1-E2 protein sequence
 <400> 31

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

20

His Ser Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn
 20 25 30

Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met
 35 40 45

His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ser Ser Arg
 50 55 60

Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Val Ala Ala Arg Asp Gly Ser Leu
 65 70 75 80

30

Pro Thr Thr Thr Leu Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala
 85 90 95

Thr Leu Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe
 100 105 110

Leu Val Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Val
 115 120 125

Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg
 130 135 140

Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val
 145 150 155 160

40

【数 4 4】

Page 44

Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Val Ala
165 170 175

Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val
180 185 190

Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val
195 200 205

Asp Gly Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Glu Thr His Val Thr Gly Gly
210 215

Thr Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu Val Gly Leu Phe Thr Pro Gly
225 230 235 240

Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile
245 250 255

Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu
260 265 270

Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu
275 280 285

Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Leu Asp Glu Phe Ala Gln Gly Trp Gly
290 295 300

Pro Ile Thr Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Pro Asp Gln Arg Pro Tyr Cys
305 310 315 320

Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Lys Ser Val
325 330 335

Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr
340 345 350

Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Glu Asn Glu Thr
355 360 365

Asp Val Leu Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe
370 375 380

Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala
385 390 395 400

Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro
405 410 415

Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly

10

20

30

40

【数 4 5】

50

Page 46

Thr Thr Leu Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu
65 70 75 80

Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val
85 90 95

Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Val Gln Asp
100 105 110

10

Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala
115 120 125

Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser
130 135 140

Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Val Ala Gly Ala
145 150 155 160

His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn
165 170 175

Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly
180 185 190

20

<210> 33
<211> 363
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HCV E2 consensus sequence

<400> 33

Glu Thr His Val Thr Gly Gly Thr Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu
1 5 10 15

Val Gly Leu Phe Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn
20 25 30

30

Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
35 40 45

Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe
50 55 60

Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Leu Asp
65 70 75 80

Glu Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr Tyr Ala Asn Gly Ser Gly
85 90 95

40

【数 4 7】

50

Page 47

Pro Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly
100 105 110

Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro
115 120 125

Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr
130 135 140

Ser Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Val Leu Asn Asn Thr Arg
145 150 155 160

Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly
165 170 175

Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly
180 185 190

Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
195 200 205

Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys
210 215 220

Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn
225 230 235 240

Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
245 250 255

Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu
260 265 270

Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu
275 280 285

Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr
290 295 300

Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr
305 310 315 320

Gly Val Gly Ser Ser Ile Val Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val
325 330 335

Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ser Cys Leu
340 345 350

Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala
355 360

10

20

30

40

【数 4 8】

50

Page 48

<210> 34
<211> 3512
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

<400> 34
ggtagccgaat tcgccacat ggactggacc tggatcctgt tcctgggtggc cgctgccaca    60
agagtgcaca gccccagggc ccccaggtgc agagccgtgc ggagcctgct gcggagccac    120
taccggggagg tgctgccctt ggccacctt cgtcggaggc tgggcccctca ggggtggcgg    180
ctggtgcaga gaggcgacc tcgcccttc agagccctgg tggcccagtg cctggtgtgc    240
gtgccctggg acgccagacc tccccctgcc gccctagct tccggcaggt gtccctgcctg    300
aaagaactgg tggcccgggt gctgcagcgg ctgtgcgaga gggcgccaa gaactgtctg    360
gccttcggct tcgccctgct ggacggcgcc agagcgggcc ctcccaggc cttaccacc    420
tccgtgagaa gctacctgcc caacaccgtg accgacgcc tgagaggcag cggcgcttg    480
ggcctgtgc tcgcagagt gggcgacgac gtgctggtgc acctgctggc cagatgcgcc    540
ctgttcgtgc tggtcgccc cagctgcgcc taccaggtgt gcggcccacc cctgtaccag    600
ctgggagccg ccaccaggc cagaccccct cctcacgct ccggcccag gcggagactg    660
ggctgcgagc gggcctgaa ccacagcgtg cgggagggcc gcgtgccctt gggcctgcc    720
gccctggcg ccagaagaag gggcggcagc gccagcagaa gcctgccctt gcccaagcgg    780
cccagacgcg gagccgccc tgagcccagc agaaccccc tgggcccagg ctcttgggcc    840
cacctggcc ggaccagagg ccccagcagc cggggcttct gcgtggtgtc ccccgcaga    900
cccgccgagg aagccacctc cctggaaggc gccctgagcg gcaccaggca cagccacccc    960
agcgtgggcc gccagacca cgcgggacc cccagcaact ccaggcccc caggccctgg    1020
gacacccctt gccccctgt gtacccgag accaagcact tcctgtacag cagcggcgac    1080
aaagagcagc tcggcccag cttcctgctg tccagcctga ggccctcct gaccggcgct    1140
aggcgcttg tggagacat ctttctggc agccggcctt ggatgcccg cacccccagg    1200
cggctgcccc ggctgcccc gcggtactgg cagatgaggc ctctgttctt ggaactgctg    1260
ggcaaccacg cccagtgcc ctacggcgtg ctgctgaaaa cccactgcc cctgagagcc    1320
gccgtgacc cagcccgcc agtgtcggc agagagaagc ctgaggcag cgtggccgct    1380
cccgggaa gggacaccga ccccagacgc ctggtgcagc tgctgcggca gcacagcagc    1440
ccttggcagg tgtacggctt cgtcggggc tgctgagaa ggtggtgcc ccctggcctg    1500
tggggcagca ggcacaacga cggcggttt ctgcggaaca ccaagaagt catcagcctg    1560
gggaagcacg ccaagctgtc cctgcaggaa ctgacctgga agatgagcgt gcggggctgc    1620
gcctgctga gaagatccc tggcgtggc tgctgcctg ccgccagca ccggctgcgg    1680
gaggaatcc tggccaagtt cctgcactgg ctgatgagc gtacgtgtt ggagctgctg    1740
agatcctct tctacgtgac cgagaccacc ttccagaaga actacctgtt cttctaccg    1800

```

【数 4 9】

Page 49

aagagcgtgt ggagcaagct gcagagcatc ggcatccggc agcacctgaa gcgggtgcag 1860
 ctgagagagc tgtccgaggc cgaagtgagg cagcaccggg aggccagacc tgccctgctg 1920
 accagccggc tgcggttcat cccaagccc gacggcctgc ggcccatcgt gaacatggac 1980
 tacgtggtgg gcgcaaggac cttccggcgg gagaagcggg ccgagcggct gacctcgagg 2040
 gtgaaggccc tttcagcgt gctgaactac gagcgggcca ggccggccagg cctgctgggc 2100
 gccagcgtgc tgggcctgga cgacatccac cgggcctggc ggaccttctg gctgagagtg 2160
 cgggcccagg accccctcc cgagctgtac ttcgtgaagg tggacgtgac aggcgcctac 2220
 gacaccatcc cccaggaccg gctgaccgag gtgatcgcca gcatcatcaa gcccagaac 2280
 acctactgcg tgcggagata cggcgtggtg cagaaggccg cccacggcca cgtgcggaag 2340
 gccttcaaga gccacgtgag caccctgacc gacctgcagc cctacatgcg gcagtctgtg 2400
 gccacactgc aggaaaccag ccccctgcgg gatgccgtgg tgatcgagca gacgagcagc 2460
 ctgaacgagg ccagcagcgg cctgttcgac gtgttctga gattcatgtg ccaccacgcc 2520
 gtgcggatcc ggggcaagag ctacgtgcag tgccagggca tcccacaggg cagcatcctg 2580
 tccaccctgc tgtctccct gtgctacggc gacatgaaa acaagctgtt cggcggcatc 2640
 aggcgggacg gactgtgctg gagactggtg gacgacttcc tgctggtgac cccccacctg 2700
 acccaccgcca agacctttct gcggaccctg gtgcgcggcg tgcccagta cggctgcgtg 2760
 gtgaacctga gaaagaccgt ggtgaactc cccgtggagg acgaggccct gggcggcaca 2820
 gccttctgtc agatgcctgc ccatggactg ttcccttggg gcgggctgct gctggacacc 2880
 cggaccctgg aagtgcagag cgactacagc agctacgccc ggaccagcat ccgggcctcc 2940
 ctgaccttca acaggggctt caaggccggc aggaacatgc ggcggaagct gtttggcgtg 3000
 ctgcggctga agtgcacag cctgtttctg tacctgcagg tgaacagcct gcagaccgtg 3060
 tgcaccaaca tctacaagat cctgctgctg caggcctacc ggttccacgc ctgctgctg 3120
 cagctgcctt ttaccagca ggtgtggaag aaccctacct tcttctgctg ggtgatcagc 3180
 gacaccgcca gcctgtgcta cagcatcctg aaggccaaga acgcccgat gagcctgggc 3240
 gccaaaggag ccgcccggac tctgccagc gaggccgtgc agtggctgtg ccaccaggcc 3300
 tttctgctga agctgacccc gcaccgggtg acctacgtgc cctgctggg cagcctgcgg 3360
 accgcccaga cccagctgtc ccggaagctg cctggcacca ccctgacagc cctggaagcc 3420
 gccgccaacc ccgccctgcc ctccgactc aagaccatcc tggactacc ctacgacgtg 3480
 cccgactacg cctgatgagc ggcccgagc tc 3512

<210> 35
 <211> 1158
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 35

【数 5 0】

10

20

30

40

50

Page 50

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg
20 25 30

Ser His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu
35 40 45

Gly Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe
50 55 60

10

Arg Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg
65 70 75 80

Pro Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu
85 90 95

Leu Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn
100 105 110

Val Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro
115 120 125

20

Pro Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val
130 135 140

Thr Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg
145 150 155 160

Val Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe
165 170 175

Val Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu
180 185 190

Tyr Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser
195 200 205

30

Gly Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val
210 215 220

Arg Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg
225 230 235 240

Arg Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg
245 250 255

Arg Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser
260 265 270

40

【数 5 1】

Page 51

Trp Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys
275 280 285

Val Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly
290 295 300

Ala Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His
305 310 315 320

His Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr
325 330 335

Pro Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser
340 345 350

Gly Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg
355 360 365

Pro Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly
370 375 380

Ser Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro
385 390 395 400

Gln Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn
405 410 415

His Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu
420 425 430

Arg Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro
435 440 445

Gln Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg
450 455 460

Leu Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly
465 470 475 480

Phe Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly
485 490 495

Ser Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile
500 505 510

Ser Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys
515 520 525

Met Ser Val Arg Gly Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly
530 535 540

10

20

30

40

【数 5 2】

50

Page 52

Cys Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys
545 550 555 560

Phe Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser
565 570 575

Phe Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Tyr Leu Phe Phe
580 585 590

Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln
595 600 605

His Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg
610 615 620

Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
625 630 635 640

Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val
645 650 655

Val Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr
660 665 670

Ser Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg
675 680 685

Arg Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His
690 695 700

Arg Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro
705 710 715 720

Pro Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr
725 730 735

Ile Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro
740 745 750

Gln Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala
755 760 765

His Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr
770 775 780

Asp Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr
785 790 795 800

Ser Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn

10

20

30

40

【数 5 3】

50

Page 53

	805	810	815	
Glu Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His	820	825	830	
His Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile	835	840	845	
Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly	850	855	860	10
Asp Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu	865	870	875	
Leu Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His	885	890	895	
Ala Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly	900	905	910	
Cys Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp	915	920	925	20
Glu Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu	930	935	940	
Phe Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln	945	950	955	
Ser Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr	965	970	975	
Phe Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe	980	985	990	
Gly Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Tyr Leu Gln Val	995	1000	1005	30
Asn Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu	1010	1015	1020	
Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe	1025	1030	1035	
His Gln Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile	1040	1045	1050	
Ser Asp Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn	1055	1060	1065	40

【数 5 4】

Page 54

Ala Gly Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro
1070 1075 1080

Ser Glu Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys
1085 1090 1095

Leu Thr Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu
1100 1105 1110

Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr
1115 1120 1125

10

Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp
1130 1135 1140

Phe Lys Thr Ile Leu Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1145 1150 1155

- <210> 36
- <211> 1707
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Influenza H5N1 HA consensus sequence

20

<400> 36
atggaaaaga tcgtgctgct gttcgcctc gtgagcctgg tgaagagcga ccagatctgc 60
atcggctacc acgccaacaa cagcaccgag cagggtggaca ccatcatgga aaaaaactg 120
accgtgacct acgccaggga catcctggaa aagaccaca acggcaagct gtgcgacctg 180
gacggcgtga agcccctgat cctgcgggac tgcagcgtgg ccggctggct gctgggcaac 240
cccatgtcgc acgagttcat caactgccc gagtggagct acatcgtgga gaaggccaac 300
ccctgaacg acctgtgcta ccccgcgac ttcaacgact acgaggaact gaagcacctg 360
ctgtcccgga tcaaccactt cgagaagatc cagatcatcc ccaagagcag ctggtccagc 420
cacgaggcca gcctgggctg gagcagcgc tgccatacc agggcaagtc cagcttcttc 480
cggaactgtg tgtgctgat caagaagaac agcacctacc ccaccatcaa ggggagctac 540
aacaacacca accaggaaga tctgctggtc ctgtggggca tccaccacc caacgacgcc 600
gccgagcaga ccaagctgta ccagaacccc accacctaca tcagcgtggg caccagcacc 660
ctgaaccagc ggctgggtgc ccggatcgc acccggtcca aggtgaacgg ccagagcggc 720
cggatggaat tcttctggac catcctgaag cccaacgat ccatcaactt cgagagcaac 780
ggcaacttca tcgccccga gtacgcctac aagatcgtga agaaggcgca cagcaccatc 840
atgaagagcg agctggaata cggcaactgc aacaccaagt gccagacccc catgggcgcc 900
atcaacagca gcatgccctt ccacaacatc cccccctga ccatcgcgca gtgccccaaag 960
tacgtgaaga gcaacaggct ggtgctggcc accggcctgc ggaacagccc ccagcggggag 1020

30

40

【数 5 5】

Page 55

cgggcggccg ccgcccgggg cctgttcggc gccatcgccg gcttcatcga gggcggctgg 1080
cagggcatgg tggacgggtg gtacggctac caccacagca atgagcaggg cagcggctac 1140
gcccccgaca aagagagcac ccagaaggcc atcgacggcg tcaccaacaa gtgaacagc 1200
atcatcgaca agatgaacac ccagttcgag gccgtgggcc gggagttaa caacctggaa 1260
cggcggatcg agaacctgaa caagaaaatg gaagatggct tcctggacgt gtggacctac 1320
aacccggagc tgcctgtgct gatggaaaac gagcggaccc tggacttcca cgacagcaac 1380
gtgaagaacc tgtacgaca agtgccggctg cagctgcggg acaacccaa agagctgggc 1440
aacggctgct tcgagticta ccacaagtgc gacaacgagt gcatggaaag cgtgcggaac 1500
ggcacctacg actaccccc gtacagcgag gaagccggc tgaagcggga ggaatcagc 1560
ggcgtgaaac tggaaagcat cggcatctac cagatcctga gcatctacag caccgtggcc 1620
agcagcctgg ccctggccat catgtggcc gccctgagcc tgtggatgtg cagcaacggc 1680
agcctgcagt gccgatctg catctag 1707

10

<210> 37
<211> 568
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Influenza H5N1 HA consensus sequence

<400> 37

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

30

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

40

【数 5 6】

Page 56

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser
130 135 140

Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
180 185 190

10

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
210 215 220

Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
245 250 255

20

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

30

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Ala Ala Ala Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
340 345 350

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
355 360 365

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
370 375 380

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
385 390 395 400

40

【数 5 7】

Page 57

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
405 410 415

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
420 425 430

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
435 440 445

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
450 455 460

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
485 490 495

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
500 505 510

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
530 535 540

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 38
<211> 1466
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Influenza H1N1&H5N1 NA consensus Sequence

<400> 38
ggtagcgaat tcgccaccat ggactggacc tggatcctgt tctggtggc cgctgccacc 60
cgggtgcaca gcatgaacc caaccagaag atcatcacca tcggcagcat ctgcatggtg 120
atcggcacatg tgagcctgat gctgcagatc ggcaacatga tcagcatctg ggtgtccac 180
agcatccaga ccggcaacca gcaccaggcc gagcccatca gcaacaccaa ctttctgacc 240
gagaaggccg tggccagcgt gaccctggcc ggcaacagca gcctgtgccc catcagcggc 300
tgggccgtgt acagcaagga caacagcatc cggatcggca gcaagggcga cgtgttcgtg 360
atccgggagc ctttcatcag ctgcagccac ctggaatgcc ggaccttctt cctgaccacc 420

【数 5 8】

10

20

30

40

50

Page 58

ggggccctgc tgaacgacaa gcacagcaac ggcaccgtga aggacagaag ccctaccgg 480
 accctgatga gctgccccgt gggcgaggcc cccagcccct acaacagccg gttcgagagc 540
 gtggcctggt cggccagcgc ctgccacgac ggcaccagct ggctgaccat cggcatcagc 600
 ggccctgaca acggcgccgt ggccgtgctg aagtacaacg gcatcatcac cgacaccatc 660
 aagagctggc ggaacaacat cctgcggacc caggaaagcg agtgcgcctg cgtgaacggc 720
 agctgcttca cgtgatgac cgacggcccc agcaacggcc aggccagcta caagatcttc 780
 aagatggaaa agggcaaggt ggtgaagagc gtggagctgg acgccccaa ctaccactac 840
 gaggaatgca gctgtaccoc cgacgcgggc gagatcacct gcgtgtgccg ggacaactgg 900
 cacggcagca accggcccctg ggtgtccttc aaccagaacc tggaatacca gatcggctac 960
 atctgcagcg gcgtgttcgg cgacaacccc agggccaacg atggcaccgg cagctgcggc 1020
 cctgtgagcg ccaacggcgc ctacggcgtg aagggttca gcttcaagta cggcaacggc 1080
 gtgtggatcg gccggaccaa gagaccaac agcagatccg gcttcgagat gatctgggac 1140
 cccaacggct ggaccgagac cgacagcagc ttcagcgtga agcaggacat cgtggccatc 1200
 accgactggt cggctacag cggcagcttc gtgcagcacc ccgagctgac cggcctggac 1260
 tgcatccggc cctgcttttg ggtggagctg atcagaggca ggcccaaaga gagcaccatc 1320
 tggaccagcg gcagcagcat cagcttttgc ggogtgaaca gcgacaccgt gagctggtcc 1380
 tggcccagcg gcgccgagct gcccttcacc atcgacaagt acccctacga cgtgcccgac 1440
 tacgcctgat gagcggccgc gagctc 1466

10

<210> 39
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Influenza H1N1&H5N1 NA consensus sequence

<400> 39

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val 30
 1 5 10 15

His Ser Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys
 20 25 30

Met Val Ile Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile
 35 40 45

Ser Ile Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Asn Gln His Gln Ala
 50 55 60

Glu Pro Ile Ser Asn Thr Asn Phe Leu Thr Glu Lys Ala Val Ala Ser
 65 70 75 80

30

40

【数 5 9】

Page 59

Val Thr Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Ser Gly Trp Ala
85 90 95

Val Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Val
100 105 110

Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu Cys Arg
115 120 125

Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn
130 135 140

Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro
145 150 155 160

Val Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala
165 170 175

Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr Ile Gly
180 185 190

Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr Asn Gly
195 200 205

Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu Arg Thr
210 215 220

Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr Val Met
225 230 235 240

Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe Lys Met
245 250 255

Glu Lys Gly Lys Val Val Lys Ser Val Glu Leu Asp Ala Pro Asn Tyr
260 265 270

His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ala Gly Glu Ile Thr Cys
275 280 285

Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val Ser Phe
290 295 300

Asn Gln Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly Val Phe
305 310 315 320

Gly Asp Asn Pro Arg Pro Asn Asp Gly Thr Gly Ser Cys Gly Pro Val
325 330 335

Ser Ala Asn Gly Ala Tyr Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys Tyr Gly
340 345 350

10

20

30

40

【数 6 0】

50

Page 60

Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly
355 360 365

Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Glu Thr Asp Ser Ser
370 375 380

Phe Ser Val Lys Gln Asp Ile Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser Gly Tyr
385 390 395 400

10

Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp Cys Ile
405 410 415

Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys Glu Ser
420 425 430

Thr Ile Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val Asn Ser
435 440 445

Asp Thr Val Ser Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro Phe Thr
450 455 460

20

Ile Asp Lys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
465 470 475

<210> 40
<211> 875
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Influenza H1N1&H5N1 M1 consensus sequence

<400> 40
ggtaccggat cggccaccat ggactggacc tggattctgt tcttggtggc cgctgccacc 60
cgggtgcaca gcatgagcct gctgaccgag gtggagacct acgtgctgtc catcatcccc 120
agcggccctc tgaagccga gatcgcccag cggctggaag atgtgttcgc cggcaagaac 180
accgacctgg aagccctgat ggaatggctg aaaaccggc ccatcctgag ccccctgacc 240
aagggatcc tgggcttcgt gttcacctg accgtgccca gcgagcgggg cctgcagcgg 300
cggagattcg tgcagaacgc cctgaacggc aacggcgacc ccaacaacat ggaccgggcc 360
gtgaagctgt acaagaagct gaagcgggag atcaccttc acggcgccaa agaggtggcc 420
ctgagctaca gcacaggcgc cctggccagc tgcattggcc tgatctacaa ccggatgggc 480
accgtgacca ccgaggtggc cttcggcctg gtgtgcgcca cctgcgagca gatcggcgac 540
agccagcaca gatcccaccg gcagatggcc accaccacca acccctgat cggcagcag 600
aaccggatgg tcttgccctc caccaccgcc aaggccatgg aacagatggc cggcagcagc 660
gagcaggcgc ccgaagccat ggaagtggcc agccaggcca ggcagatggt gcaggccatg 720

30

40

【数 6 1】

Page 61

cggaccatcg gcacccaccc cagcagcagc gccggactgc gggacgacct gctggaaaac 780
 ctgcaggcct accagaaacg gatggcgctg cagatgcagc gttcaagta cccctacgac 840
 gtgcccgact acgcctgatg agcggccgcg agctc 875

<210> 41
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220> 10
 <223> Influenza H1N1&H5N1 M1 consensus sequence

<400> 41

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His Ser Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile
 20 25 30

Ile Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp
 35 40 45

Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu
 50 55 60 20

Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe
 65 70 75 80

Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg
 85 90 95

Phe Val Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp
 100 105 110

Arg Ala Val Lys Leu Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His
 115 120 125

Gly Ala Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser 30
 130 135 140

Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val
 145 150 155 160

Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln
 165 170 175

His Arg Ser His Arg Gln Met Ala Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg
 180 185 190

His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu 40
 195 200 205

【数 6 2】

Page 62

Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala
210 215 220

Ser Gln Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His
225 230 235 240

Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln
245 250 255

Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys Tyr Pro
260 265 270

Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
275

<210> 42
<211> 1700
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Influenza H5N1 M2E-NP consensus sequence

<400> 42
ggtaccgaat tcgccaccat ggactggacc tggatcctgt tcctggtcgc tgcgccacc 60
agggtgcaca gcagcctgct gaccgaggtg gagaccccca cccggaacga gtggggctgc 120
cgggtgcagcg acagcagcga cgggggcagg aagcggagaa gcgccagcca gggcaccaag 180
cggagctacg agcagatgga aacaggcggc gagcggcaga acgccaccga gatccgggcc 240
agcgtgggca gaatggtcgg cggcatcggc cggttctaca tccagatgtg caccgagctg 300
aagctgtccg actacgaggg cggctgatac cagaacagca tcaccatcga gcggatggtg 360
ctgtccgcct tcgacgagcg cgggaacaga tacctggaag agcaccocag cggcggcaag 420
gacccaaga aaaccggcgg acccatctac cggcggaggg acggcaagtg ggtgcgggag 480
ctgatcctgt acgacaaaga ggaaatccgg cggatctggc ggcaggccaa caacggcgag 540
gacgccacag ccggcctgac ccacctgatg atctggcaca gcaacctgaa cgacgccacc 600
taccagcgga caaggctctt ggtccggacc ggcatggacc cccggatgtg cagcctgatg 660
cagggcagca cactgcccag aagaagcggg gccgctggcg cagccgtgaa gggcgtgggc 720
accatggtga tggaaactgat ccggatgata aagcggggca tcaacgaccg gaatttttgg 780
agggcgagaa acggcagcgg gaccgggata gcctacgagc ggatgtgcaa catcctgaag 840
ggcaagticc agacagccgc ccagcgggcc atgatggacc aggtccggga gagccggaac 900
cccggcaacg ccgagatcga ggacctgata ttctggcca gaagcgcctt gatcctgcgg 960
ggcagcgtgg cccacaagag ctgcctgccg gcctgcgtgt acggactggc cgtggccagc 1020
ggctacgact tcgagcggga gggctacagc ctggtcggca tcgaccocct cgggctgctg 1080

10

20

30

40

【数 6 3】

50

Page 63

cagaactccc aggtgttcag cctgatccgg cccaacgaga accccgcca caagtcccag 1140
ctggtctgga tggcctgcc cagcgcgcc ttogaggatc tgagagtgag cagcttcac 1200
cggggcacca gagtgggtgc caggggcccag ctgtccacca ggggcgtgca gatcgccagc 1260
aacgagaaca tggaaagcat ggacagcaac accctggaac tgcggagccg gtactgggcc 1320
atccggacca gaagggcgg caacaccaac cagcagcggg ccagcgcggg acagatcagc 1380
gtgcagccca ccttctccgt gcagcgggaaac ctgcccttcg agagggccac catcatggcc 1440
gccttcaccg gcaacaccga gggccggacc agcgacatgc ggaccgagat catcaggatg 1500
atgaaaagcg ccaggcccga ggactgagc ttccagggca ggggcgtgtt cgagctgtcc 1560
gatgagaagg ccaccaaccc catcgtgccc agcttogaca tgaacaacga gggcagctac 1620
ttcttcggcg acaacccga ggaatacgac aactaccct acgacgtgcc cgactacgcc 1680
tgatgagcgg ccgcgagctc 1700

<210> 43
<211> 554
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Influenza H5N1 M2E-NP consensus sequence

<400> 43

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp
20 25 30

Gly Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
35 40 45

Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Gly Gly
50 55 60

Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met Val
65 70 75 80

Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys Leu
85 90 95

Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu Arg
100 105 110

Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Arg Tyr Leu Glu Glu
115 120 125

His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile Tyr
130 135 140

10

20

30

40

【数 6 4】

50

Page 64

Arg Arg Arg Asp Gly Lys Trp Val Arg Glu Leu Ile Leu Tyr Asp Lys
145 150 155 160

Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp Ala
165 170 175

Thr Ala Gly Leu Thr His Leu Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn Asp
180 185 190

10

Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp Pro
195 200 205

Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser Gly
210 215 220

Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu Leu
225 230 235 240

Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg Gly
245 250 255

Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile
260 265 270

20

Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp Gln
275 280 285

Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu Ile
290 295 300

Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys
305 310 315 320

Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Ala Ser Gly Tyr
325 330 335

30

Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe Arg
340 345 350

Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Phe Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu Asn
355 360 365

Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala Ala
370 375 380

Phe Glu Asp Leu Arg Val Ser Ser Phe Ile Arg Gly Thr Arg Val Val
385 390 395 400

Pro Arg Gly Gln Leu Ser Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn Glu
400

40

【数 6 5】

50

Page 65

405 410 415

Asn Met Glu Ala Met Asp Ser Asn Thr Leu Glu Leu Arg Ser Arg Tyr
420 425 430

Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Arg Ala
435 440 445

Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg Asn
450 455 460

10

Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn Thr
465 470 475 480

Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met Glu
485 490 495

Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe Glu
500 505 510

Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp Met
515 520 525

20

Asn Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Tyr Asp
530 535 540

Asn Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
545 550

30

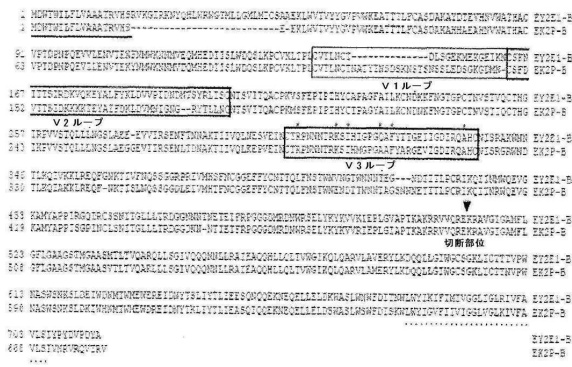
40

50

【図面】

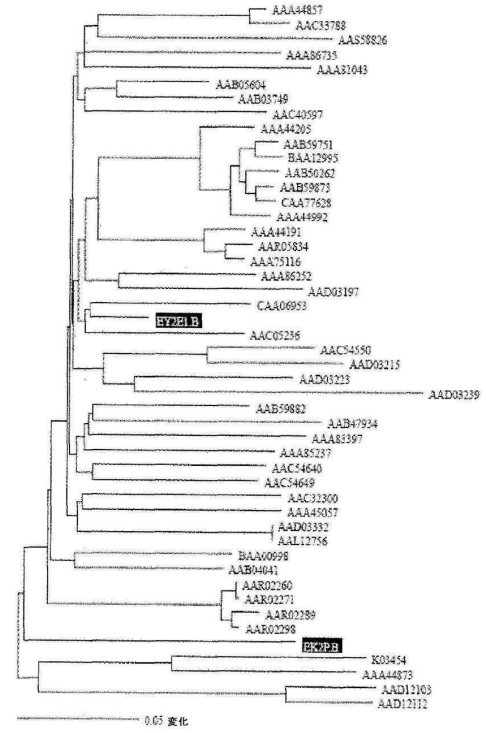
【図 1】

Figure 1



【図 2】

Figure 2

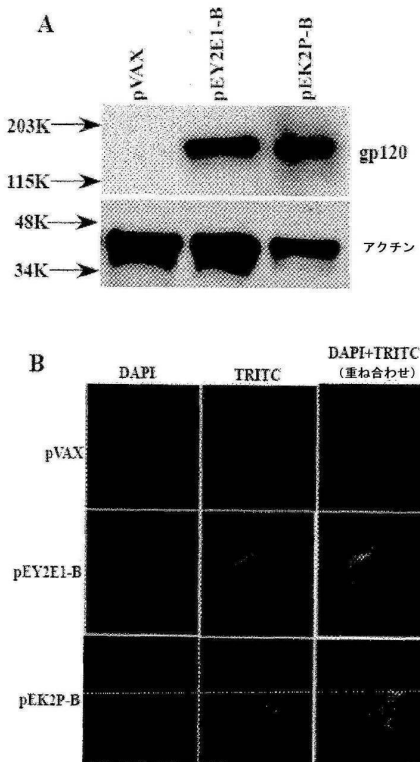


10

20

【図 3】

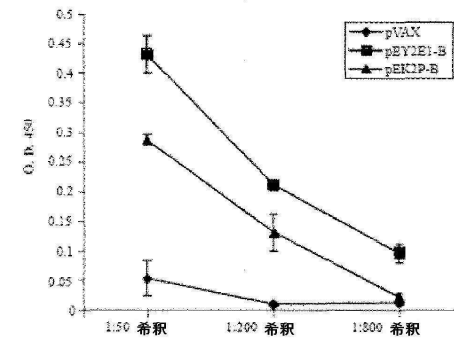
Figure 3, パネルAおよびB



【図 4 - 1】

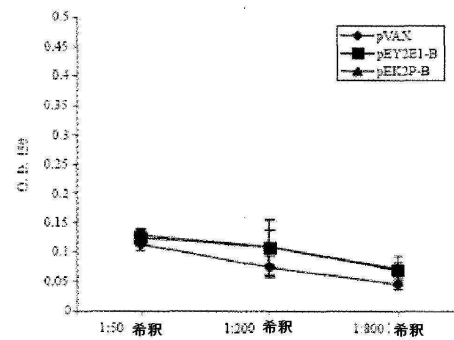
Figure 4

パネル A



30

パネル B

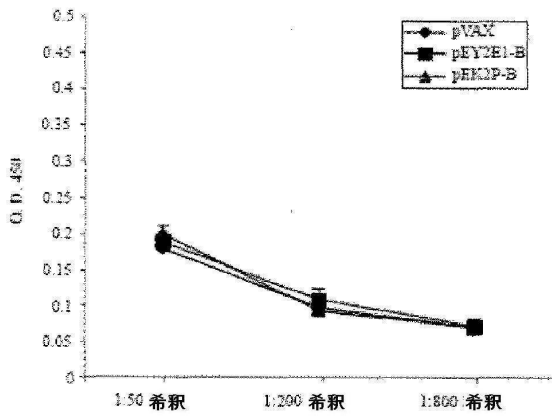


40

50

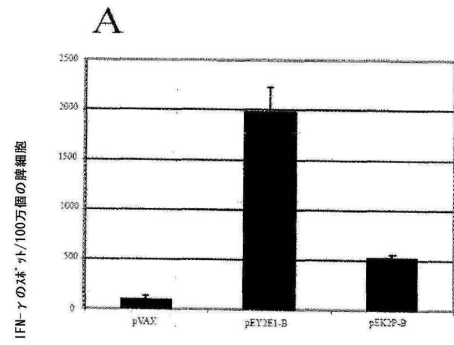
【 図 4 - 2 】

Figure 4
パネル C



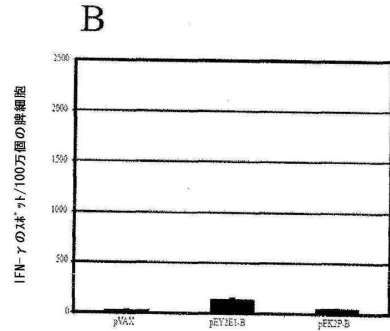
【 図 5 - 1 】

Figure 5
パネル A



10

Figure 5
パネル B



20

【 図 5 - 2 】

Figure 5
パネル C

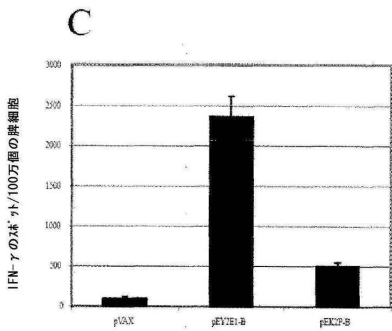
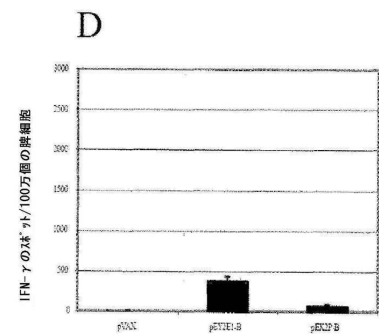
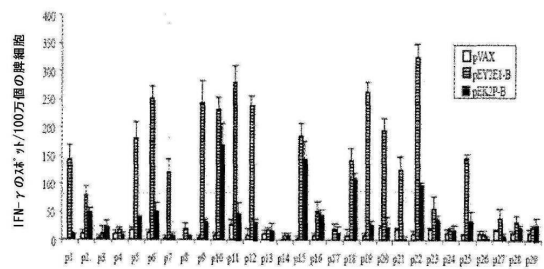


Figure 5
パネル D



【 図 5 - 3 】

Figure 5
パネル E



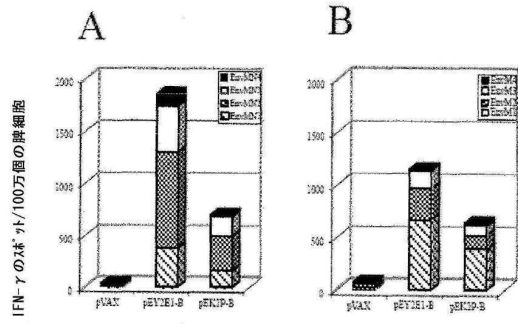
30

40

50

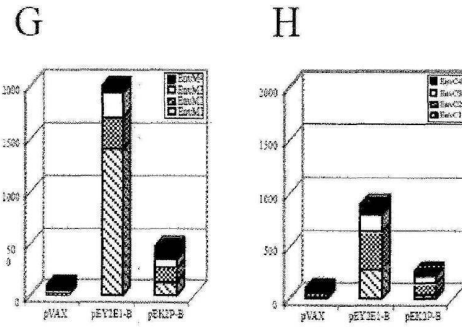
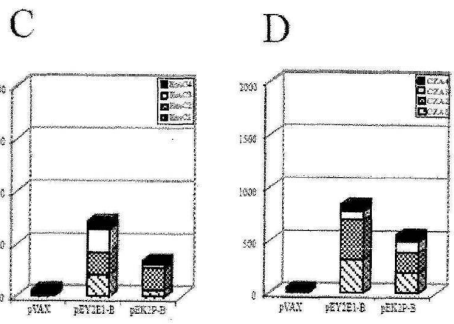
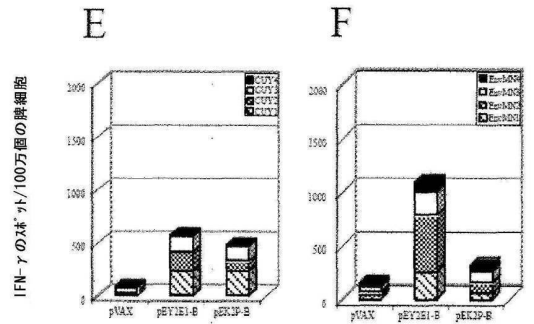
【 図 6 - 1 】

Figure 6
パネル A-D



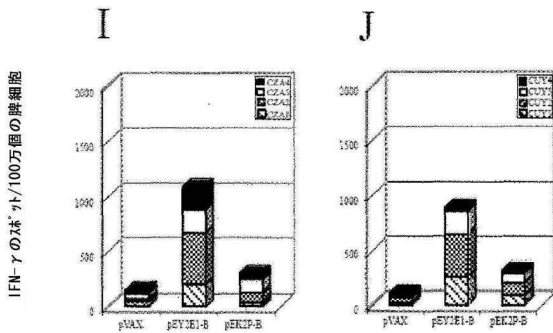
【 図 6 - 2 】

Figure 6
パネル E-H



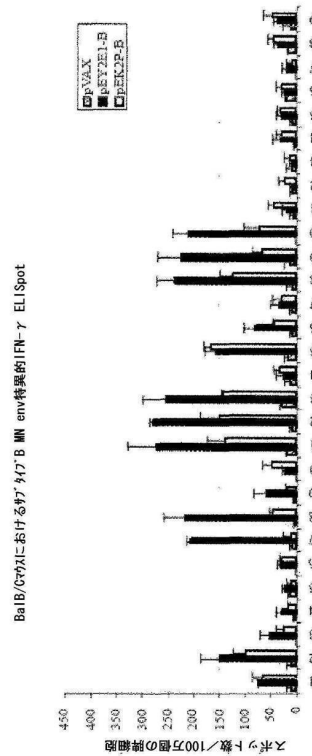
【 図 6 - 3 】

Figure 6
パネル I および J



【 図 7 - 1 】

Figure 7
パネル A



10

20

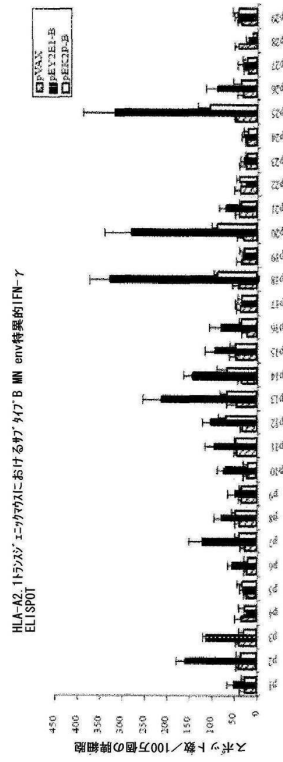
30

40

50

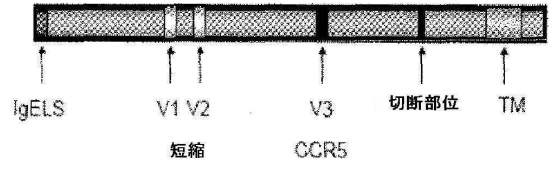
【 図 7 - 2 】

Figure 7
パネル B



【 図 8 】

Figure 8

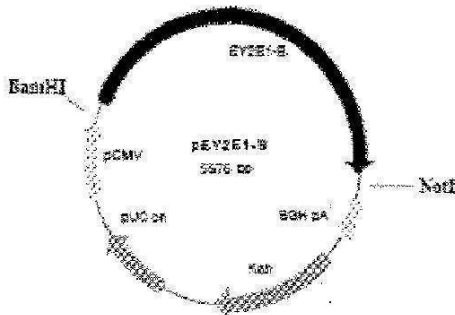


10

20

【 図 9 】

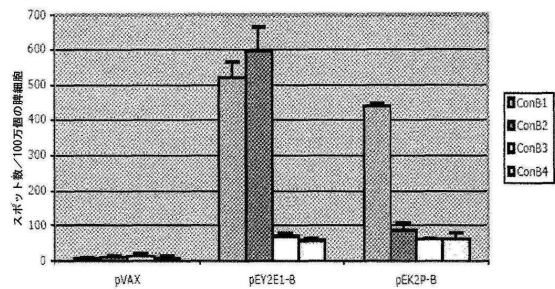
Figure 9



【 図 10 】

Figure 10
パネル A

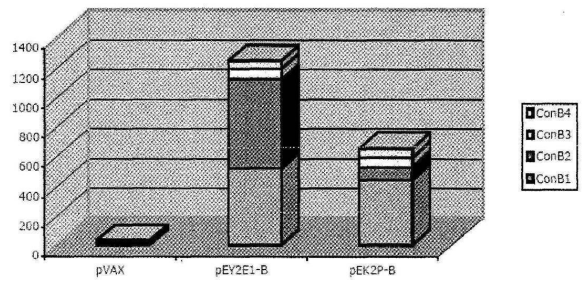
サブタイプ B コンソルザenv-特異的 IFN-γ ELISpot



30

パネル B

サブタイプ B コンソルザenv-特異的 IFN-γ ELISpot

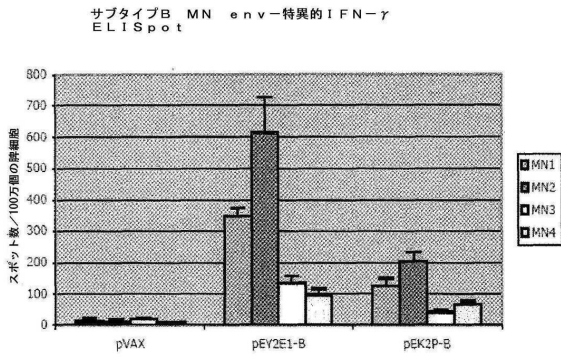


40

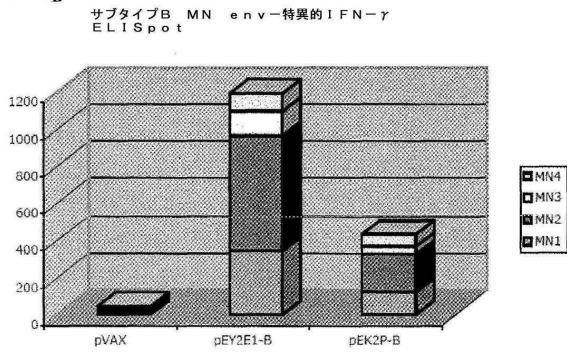
50

【 図 1 1 】

Figure 11
パネル A

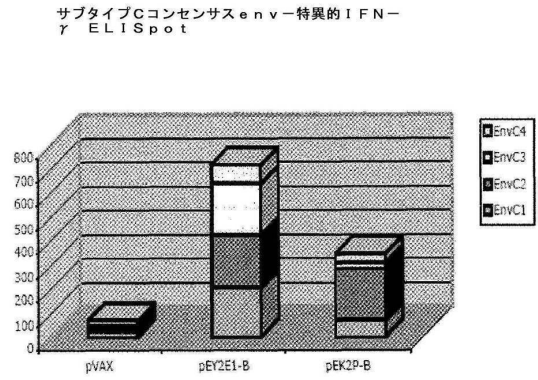


パネル B

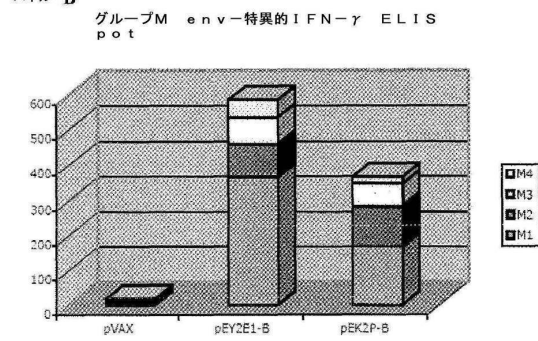


【 図 1 2 - 1 】

Figure 12
パネル A

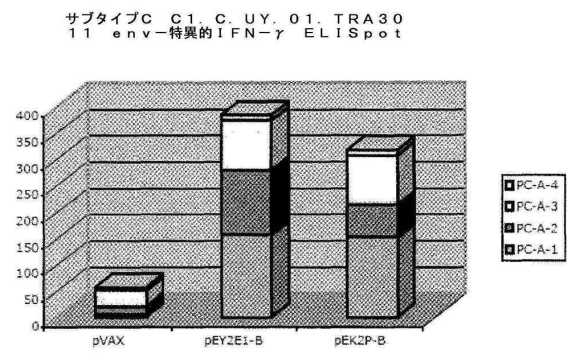


パネル B

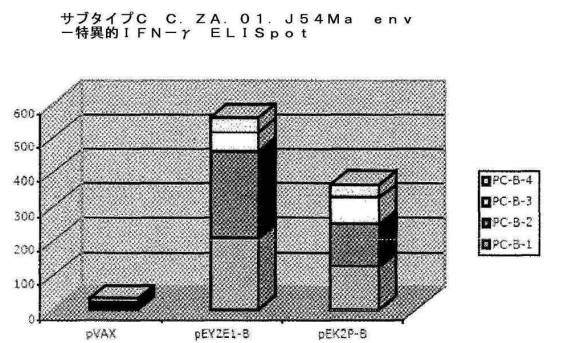


【 図 1 2 - 2 】

Figure 12
パネル C

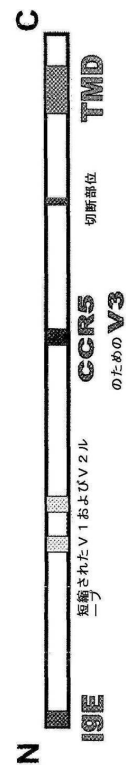


パネル D



【 図 1 3 】

Figure 13



10

20

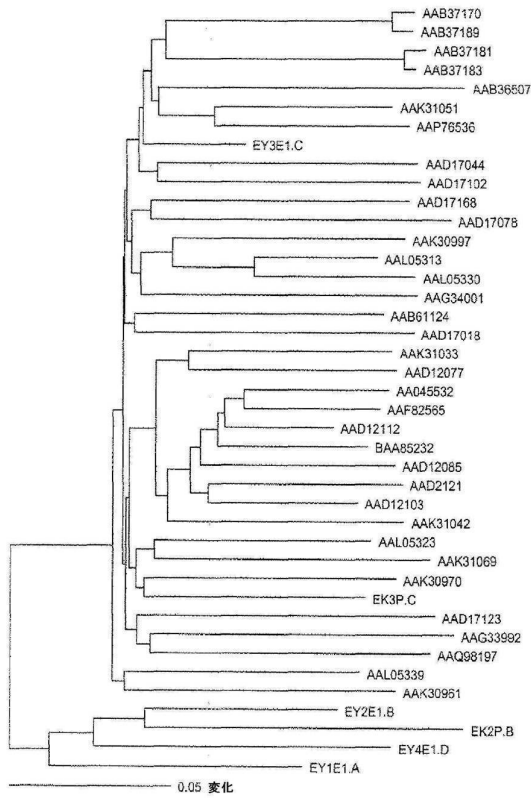
30

40

50

【 図 1 4 】

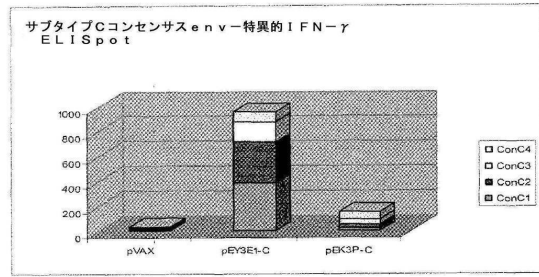
Figure 14



【 図 1 5 】

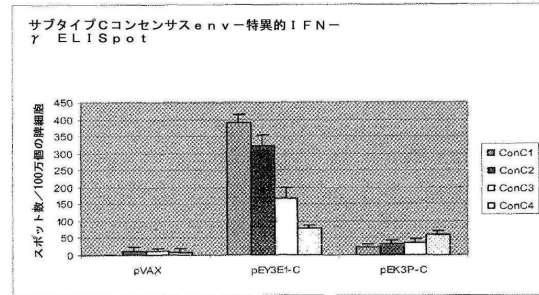
Figure 15

パネル A



10

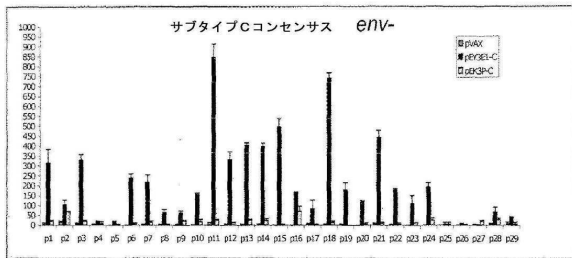
パネル B



20

【 図 1 6 】

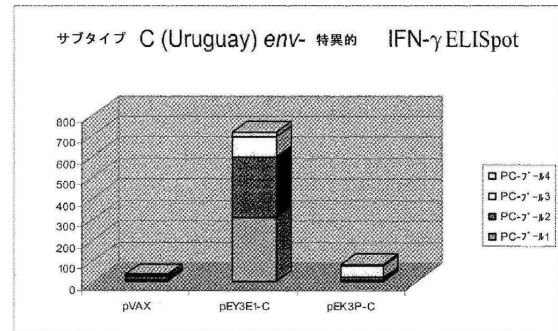
Figure 16



【 図 1 7 - 1 】

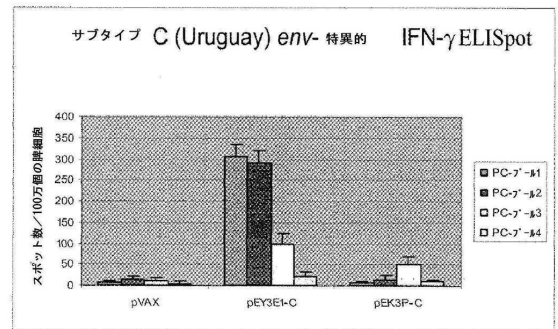
Figure 17

パネル A



30

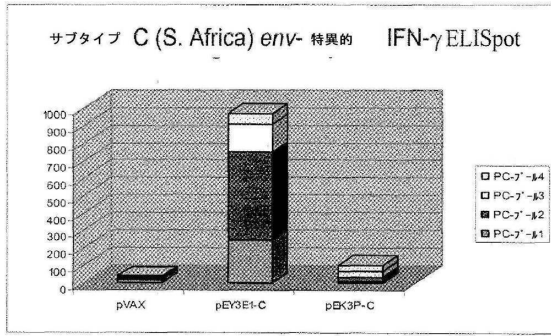
パネル B



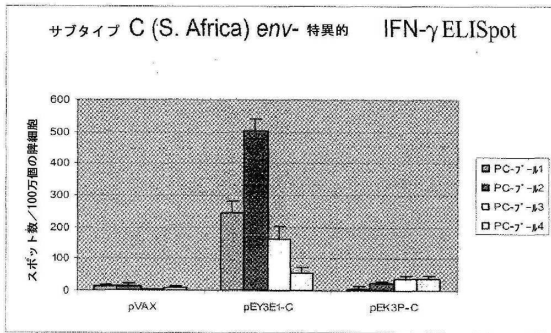
40

【 図 17 - 2 】

Figure 17
パネル C

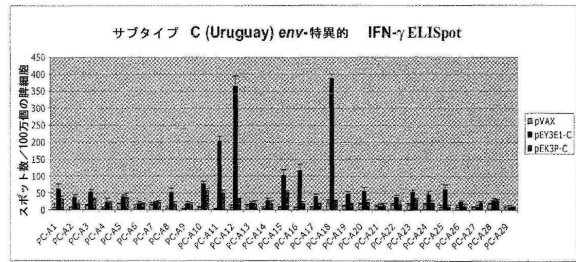


パネル D

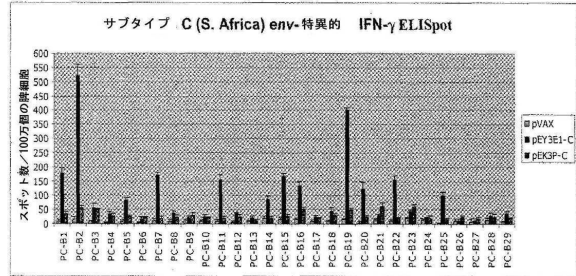


【 図 18 】

Figure 18
パネル A



パネル B

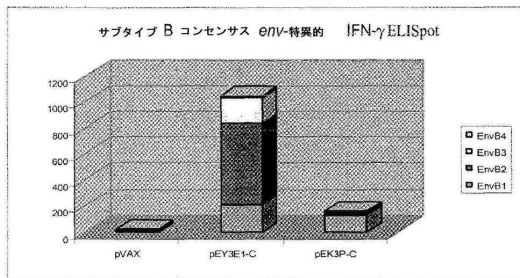


10

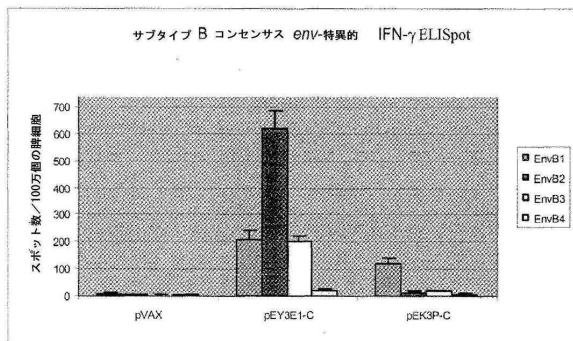
20

【 図 19 - 1 】

Figure 19
パネル A

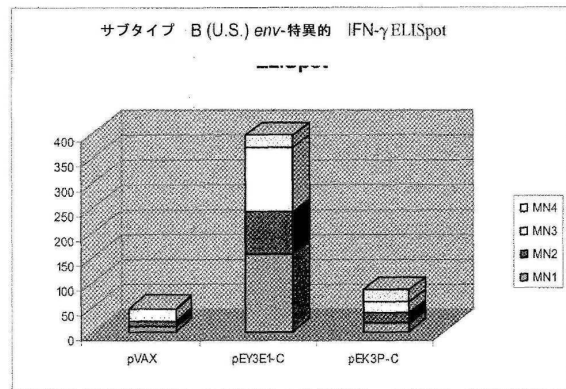


パネル B

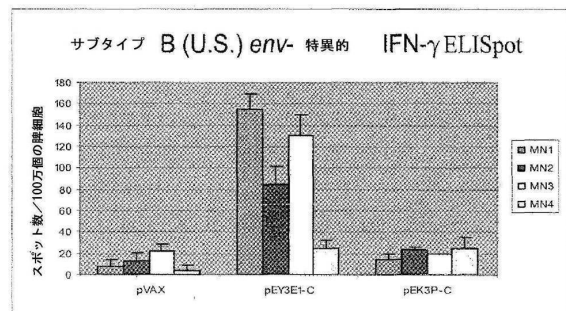


【 図 19 - 2 】

Figure 19
パネル C



パネル D



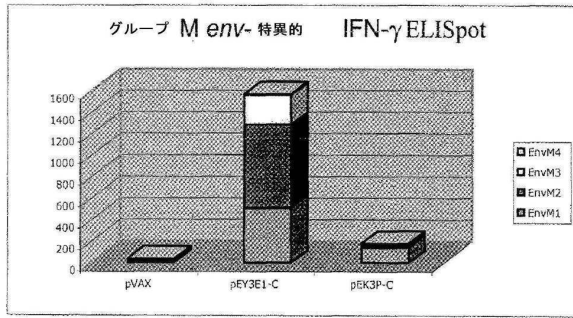
30

40

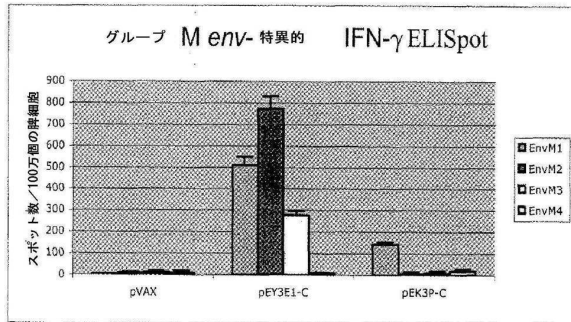
50

【 図 19 - 3 】

Figure 19
パネル E

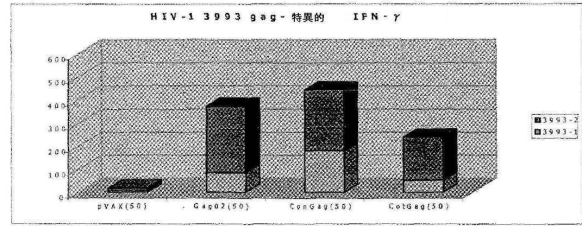


パネル F

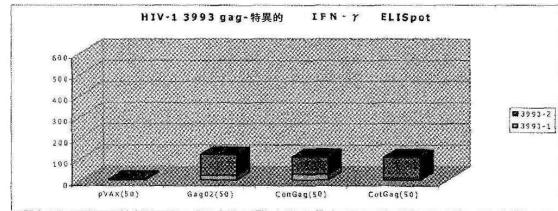


【 図 20 - 1 】

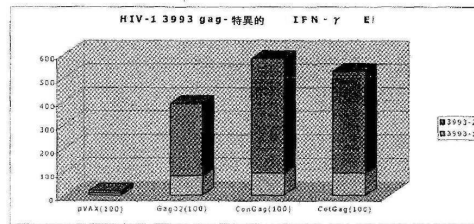
Figure 20
パネル A



パネル B

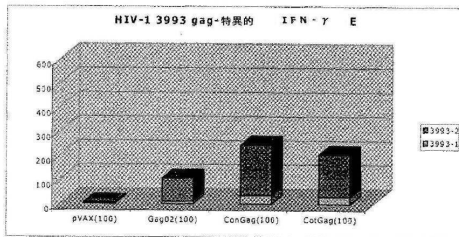


パネル C

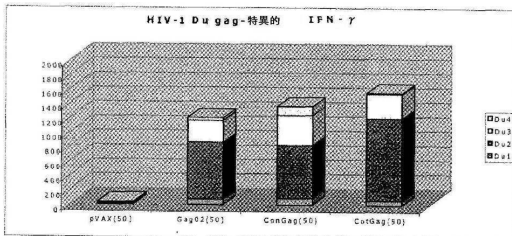


【 図 20 - 2 】

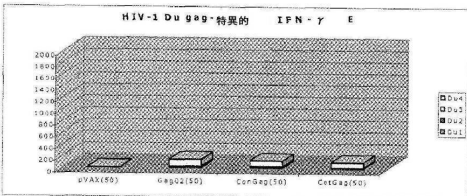
Figure 20
パネル D



パネル E

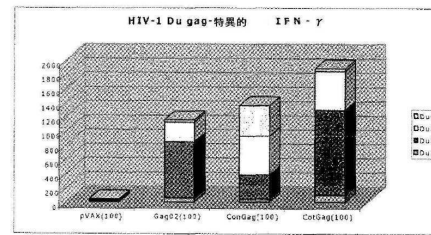


パネル F

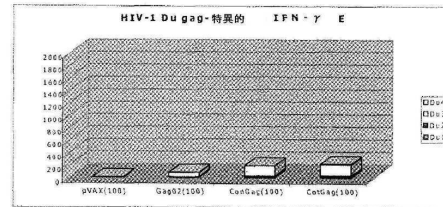


【 図 20 - 3 】

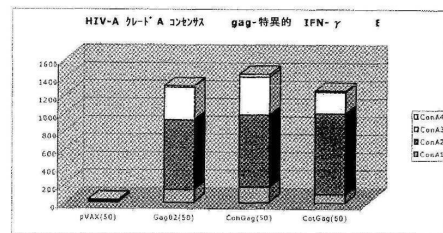
Figure 20
パネル G



パネル H



パネル I



10

20

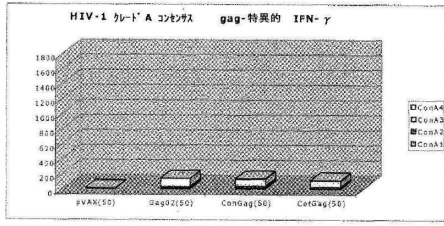
30

40

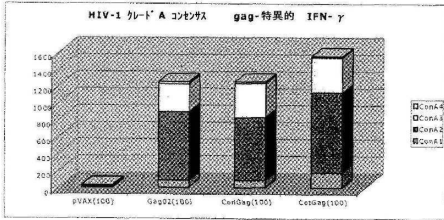
50

【 図 20 - 4 】

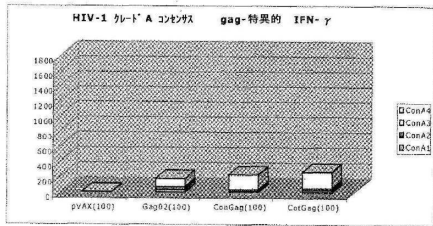
Figure 20
パネル J



パネル K

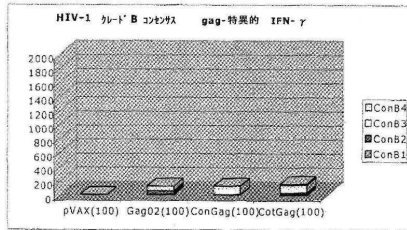


パネル L

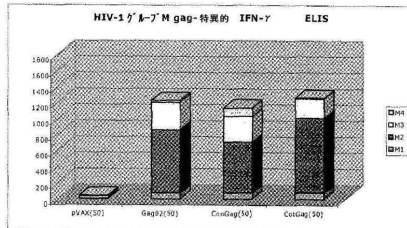


【 図 20 - 6 】

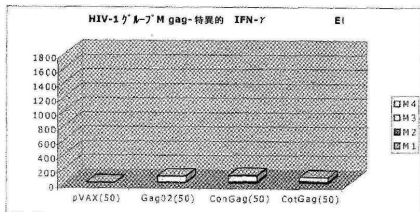
Figure 20
パネル P



パネル Q

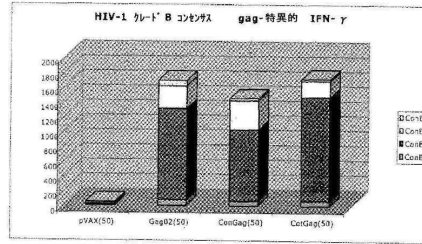


パネル R

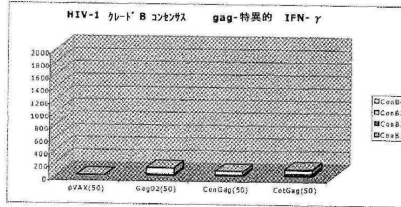


【 図 20 - 5 】

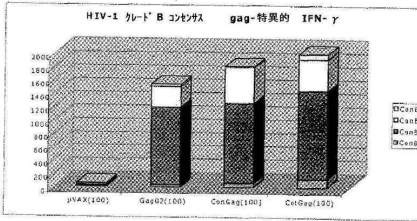
Figure 20
パネル M



パネル N

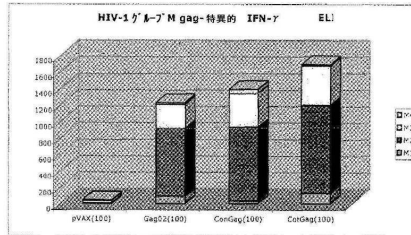


パネル O

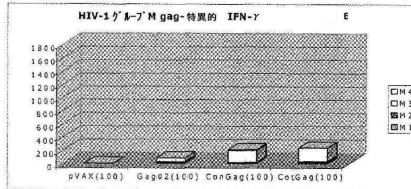


【 図 20 - 7 】

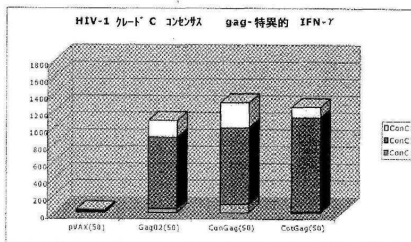
Figure 20
パネル S



パネル T



パネル U



10

20

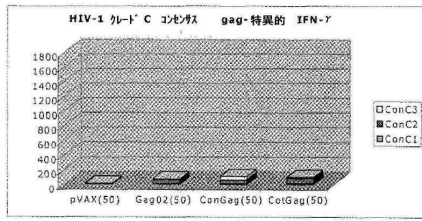
30

40

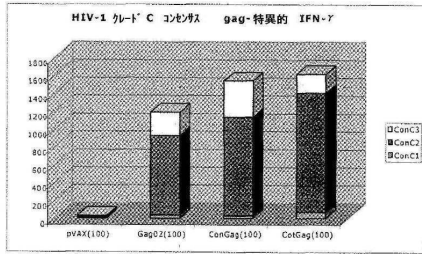
50

【 図 2 0 - 8 】

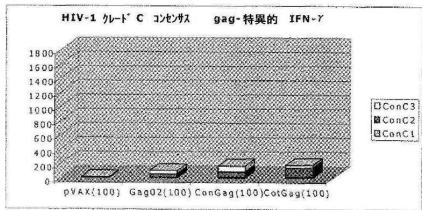
Figure 20
パネル V



パネル W

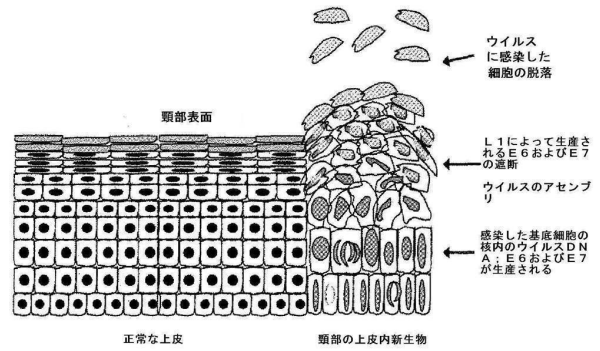


パネル X



【 図 2 1 】

Figure 21

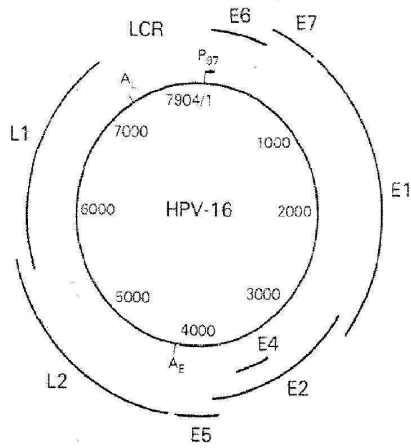


10

20

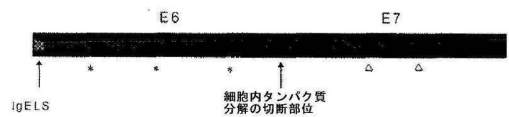
【 図 2 2 】

Figure 22



【 図 2 3 】

Figure 23



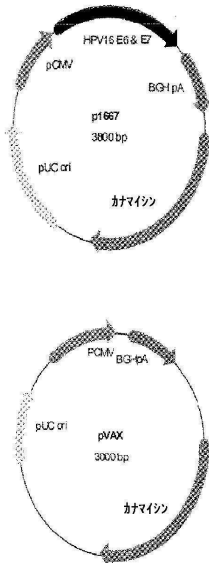
30

40

50

【 図 2 4 】

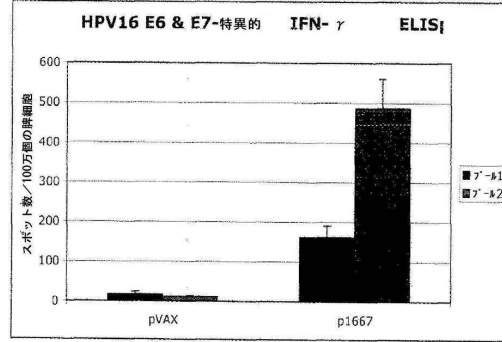
Figure 24



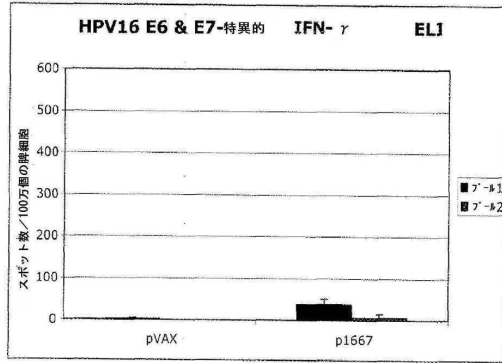
【 図 2 5 - 1 】

Figure 25

パネル A



パネル B



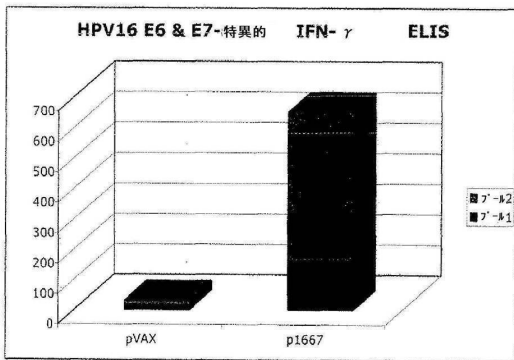
10

20

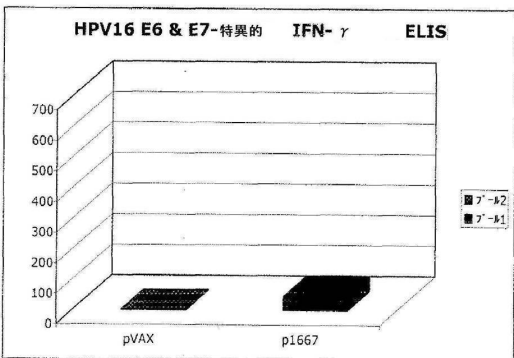
【 図 2 5 - 2 】

Figure 25

パネル C



パネル D

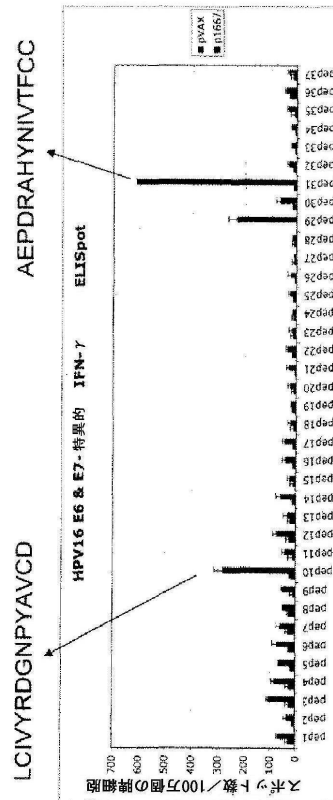


30

40

【 図 2 6 】

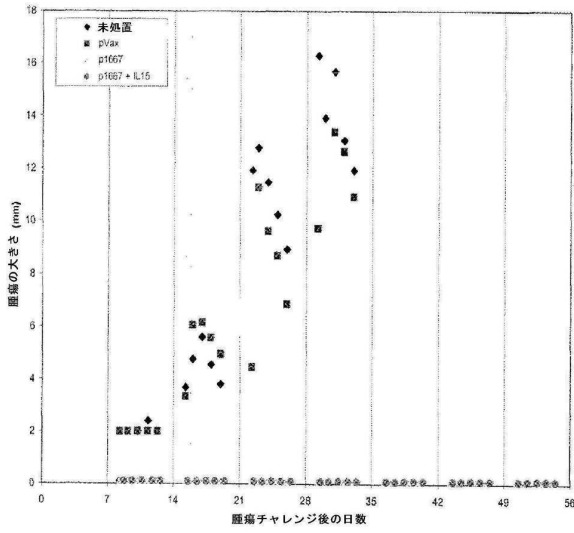
Figure 26



50

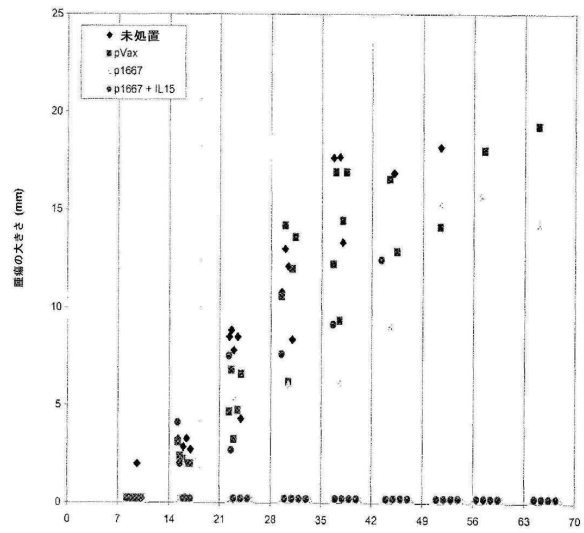
【 図 2 7 】

Figure 27



【 図 2 8 】

Figure 28

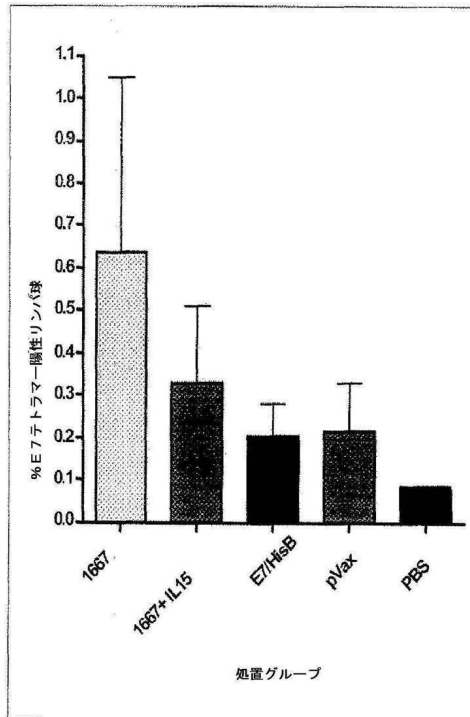


10

20

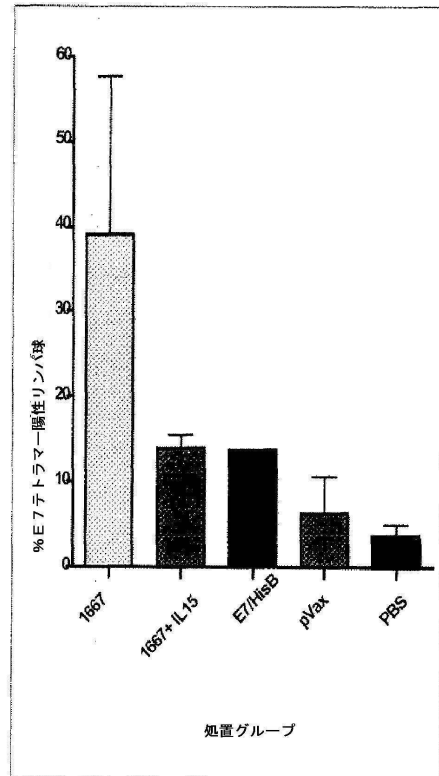
【 図 2 9 】

Figure 29



【 図 3 0 】

Figure 30



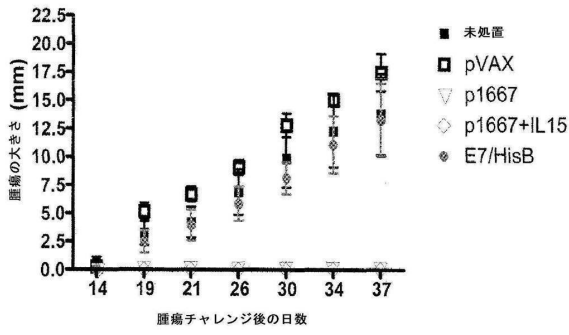
30

40

50

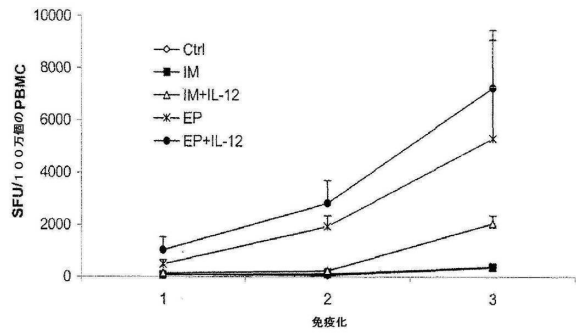
【 図 3 1 】

Figure 31



【 図 3 2 】

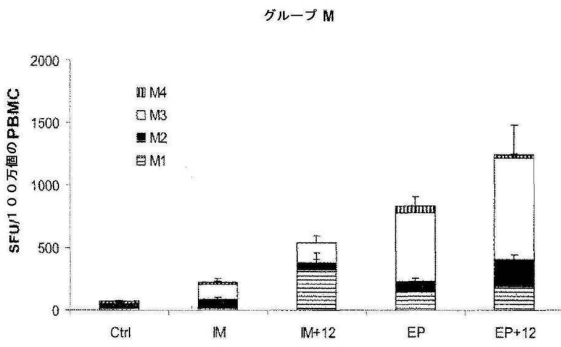
Figure 32



10

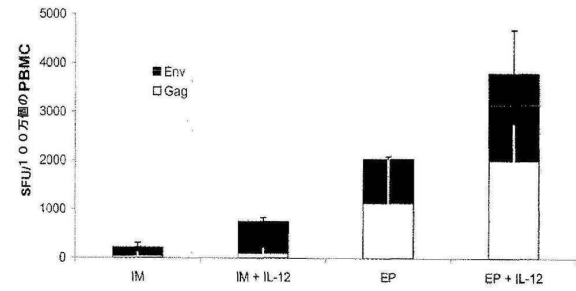
【 図 3 3 】

Figure 33



【 図 3 4 】

Figure 34



20

【 配列表 】

0007030347000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 7/01 (2006.01)
C 1 2 N 7/04 (2006.01)

F I

C 1 2 N 7/01
C 1 2 N 7/04

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 60/890,352

(32)優先日 平成19年2月16日(2007.2.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 ヤン チアン

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19083, ハバータウン, クラマー アベニュー 213

(72)発明者 ドミニク ラディ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19146, フィラデルフィア, クリスチャン ストリート
1933, アpartment 2エー

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 国際公開第2005/028625(WO, A2)

DNA Cell Biol., 2006年07月18日, Vol. 25 No. 7, p. 383-392

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 00 - 15 / 90

C 0 7 K 14 / 16

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq

UniProt / GeneSeq